



HAL
open science

Effets pharmacologiques d'une protéine bactérienne mimétique d'hormones satiétogènes : la protéine ClpB sur le comportement alimentaire

Manon Dominique

► **To cite this version:**

Manon Dominique. Effets pharmacologiques d'une protéine bactérienne mimétique d'hormones satiétogènes : la protéine ClpB sur le comportement alimentaire. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMR072 . tel-02428626

HAL Id: tel-02428626

<https://theses.hal.science/tel-02428626>

Submitted on 6 Jan 2020

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Science de la Vie et de la Santé

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Collaboration CIFRE TargEDys – UMR 1073

Effets pharmacologiques d'une protéine bactérienne mimétique d'hormones satiétogènes : la protéine ClpB sur le comportement alimentaire

**Présentée et soutenue par
Manon DOMINIQUE**

**Thèse soutenue publiquement le 13 Décembre 2019
devant le jury composé de**

| | | |
|----------------------------------|---|-----------------------|
| M. Pierre DECHELOTTE | PU-PH CHU Charles Nicolle de Rouen Directeur INSERM UMR 1073, Normandie Université – Rouen | Directeur de thèse |
| M. Grégory LAMBERT | CEO TargEDys, R&D, INSERM UMR 1073, Normandie Université – Rouen/Lonjumeau | Co-directeur de thèse |
| M ^{me} Muriel THOMAS | Directrice de recherche, INRA, AgroParisTech, UMR 1319, MICALIS / Centre de recherche – Jouy-en-Josas | Rapporteuse |
| M. André BADO | Directeur de recherche, Université Paris Diderot, UMR S1149 – Paris | Rapporteur |
| M ^{me} Florence THIBAUT | PU-PH Hôpital Cochin-Tarnier, Université Paris Descartes, INSERM U894 – Paris | Examinatrice |
| M ^{me} Nathalie CONNIL | MCU, LMSM EA4312 Microbiologie Signaux et Micro-Environnement – Evreux | Examinatrice |

**Thèse dirigée par Mr. Pierre DECHELOTTE, Laboratoire INSERM UMR 1073
Et co-dirigée par le Mr. Grégory LAMBERT, Société TargEDys SA**



Résumé

L'étude du microbiote intestinal et de ses produits de sécrétion est un domaine de recherche en expansion en raison des perspectives thérapeutiques que cela peut ouvrir pour les maladies nutritionnelles telles que l'obésité ou les TCA.

La *Caseinolytic peptidase B* (ClpB) est une protéine bactérienne produite par les entérobactéries qui présente un mimétisme moléculaire avec l' α -MSH, un neuropeptide anorexigène signalant la satiété au niveau de l'hypothalamus. Des études récentes ont cherché à évaluer si la protéine ClpB pouvait induire des effets anorexigènes similaires à ceux de l' α -MSH, en situation physiopathologique et dans des modèles de troubles nutritionnels. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse a été d'étudier les potentiels effets pharmacologiques de la protéine ClpB, intacte ou fragmentée sur les différents mécanismes de régulation de la prise alimentaire impliquant l'axe microbiote-intestin-cerveau et l'influence des nutriments.

La première étude a évalué *in vitro* l'impact de trois macronutriments sur la production et l'expression de la protéine ClpB par les bactéries *E. coli* : seul l'apport protéique augmentait significativement la production de ClpB. Nous avons montré que la ClpB augmentait la sécrétion de PYY par les cellules entéro-endocrines intestinales de rat en culture. La **deuxième étude** a été réalisée chez des souris dans un modèle d'anorexie (ABA). La restriction alimentaire, avec ou sans activité physique, augmentait la concentration plasmatique de ClpB, qui était associée à une augmentation de la proportion d'entérobactéries dans le microbiote, ce qui suggère son implication possible dans la physiopathologie de l'anorexie mentale. Enfin, la **troisième étude** a évalué *in vivo* chez le rongeur, les effets pharmacologiques de la protéine ClpB sur la prise alimentaire. La prise alimentaire était réduite par l'injection de ClpB intacte ou fragmentée, mais pas par son fragment de 25 kDa.

Ces résultats confortent le rôle de la protéine ClpB, produite par les entérobactéries, dans la régulation physiologique de la prise alimentaire et incitent à poursuivre l'étude de son implication dans les troubles anorexiques et son application thérapeutique dans les situations d'excès de poids.

Mots clés : protéine ClpB, troubles du comportement alimentaire, obésité, macronutriments, prise alimentaire, fragments de la protéine ClpB

Pharmacological effects of a mimetic bacterial protein of satietogenic hormones: the ClpB protein on eating behavior

The study of the gut microbiota and especially the effect of its secretory products is an expanding field of research in order to open therapeutic perspectives for nutritional diseases such as obesity or TCA.

Among these molecules, the Caseinolytic peptidase B (ClpB) is a bacterial protein having a molecular mimicry in common with α -MSH, a neuropeptide whose anorectic actions are peripheral and central and possible *via* a microbiota-intestinal-brain communication. Current studies attempt to demonstrate whether this molecular mimicry can confer similar anorectic effects at the ClpB protein. **The aim of this thesis was studied the potential pharmacological effects of ClpB protein** the regulation of eating behavior.

Given that the composition of the gut microbiota is dependent on the food present, **the first study** was evaluated *in vitro* the impact of three types of macronutrients on the production and expression of the ClpB protein by *E. coli* bacteria. Then, it was evaluated whether this protein could influence the secretion of satietogenic peptides like PYY by intestinal enteroendocrine cells using a primary culture of rat intestinal cells.

Previous studies of U 1073 laboratory have shown that this protein has been found at the plasma level, **the second study** was performed in mice submitted to an anorexia model (ABA) to clarify the impact of dietary restriction on the ClpB protein, to better understand its possible involvement in the physiopathology of anorexia nervosa.

Finally, the third study was evaluated the pharmacological effects of ClpB protein on food intake *in vivo* in rodents. The impact of the natural fragmentation of this protein and particularly of one of its fragments on food intake was also evaluated.

Keywords : ClpB protein, eating disorders, obesity, macronutrients, food intake, fragments of ClpB protein

Remerciements

♠ À mon jury,

Madame **Muriel Thomas**, Madame **Florence Thibaut**, Madame **Nathalie Connil** et Monsieur **André Bado**, que je remercie d'avoir accepté de participer à ce jury et d'avoir pris le temps de juger ce travail.

♠ À mes Directeurs de thèse :

Le Professeur **Pierre Déchelotte**, pour m'avoir permis d'intégrer l'Unité 1073 et de m'avoir permis de finaliser cette thèse en acceptant d'être mon Directeur de thèse ;

Le Docteur **Grégory Lambert**, qui m'a permis d'accéder au monde de l'entreprise et qui m'a permis financièrement d'élaborer sans difficulté les projets de cette thèse ;

Le Professeur **Sergueï Fetissov**, pour m'avoir proposé cette thèse et d'avoir été mon Directeur de thèse durant la première année.

♠ À mes encadrants,

Nicolas Lucas, merci pour son honnêteté sur mes goûts musicaux un peu trop « *teenage* ». Et surtout pour avoir « essayé » durant ces années, d'augmenter ma culture filmographique ! Enfin un peu car la liste est encore longue... et puis on part de loin^^.

Romain Legrand, qui a mis une pointe d'honneur à générer une bonne ambiance de travail par son imagination débordante sur de potentielles blagues à faire. La plage TargEDys restera de loin la meilleure et la plus sympa aussi^^ (avec l'aide de Nicolas bien sûr).

Merci à vous deux. Pendant cette thèse, vous avez été mes encadrants, mais vous êtes surtout devenus mes amis. J'aurais aimé que l'on finisse l'aventure ensemble. Cependant, même si cela n'a pas pu être le cas, vous avez toujours été présents pour moi, de la relecture des articles jusqu'à la relecture de ce manuscrit de thèse, ou encore pour programmer des cinémas pour décompresser et se retrouver. Pour tout cela, je ne vous remercierai jamais assez. La thèse n'aurait vraiment pas été pareille sans vous.

♠ À mes collègues,

Sévérine Nobis, rencontré lors de problèmes courants de Western-Blot^^ ; tu es devenue mon alliée durant ces années de thèse mais surtout une amie. Je te remercie de ne pas être partie trop loin en ne changeant que d'un étage ;

Charlène Guérin, cette thèse m'a permis de découvrir une personne avec un grand cœur. Merci pour ces longues discussions et surtout pour ton soutien, ta présence et tes conseils très précieux, durant cette dernière année ;

Marie Galmiche, mon binôme de thèse chez TargEDys, une personne avec une humanité indéniable avec qui j'ai été contente de partager ces trois ans. Comme tu l'as dit « cette thèse on l'a commencée ensemble et on la finira ensemble », le même jour, à un mois près ;

Saïda Azhar, la gentillesse à toutes épreuves ! Une petite perle, polyvalente sur presque toutes les techniques du laboratoire ;

Camille Deroissart, « Madame Princesse » (et oui j'ai osé^^), la reine des Western-Blot ! ;

Marie-Anne Le Solliec, pour ces très bons moments partagés et ces longues discussions et débats sur des sujets souvent improbables^^ ;

Illona Bouleté, qui n'a pas eu peur de m'aider durant les multiples séries animales qui se chevauchaient en même temps ;

Alice Beau, la « Madame Elisabeth » de ce laboratoire. Je te remercie pour ton calme et ta relativité à toutes épreuves. Et il y avait de quoi perdre son calme dans ce bureau^^ ;

Pauline Tirelle, la « Marie-Antoinette » de ce laboratoire ! Avec son indéniable « J'ai trouvé ça rigolo ! » toujours suivie d'une bonne dose de fou-rire ;

Asma Amamou, dont la persévérance et l'acharnement sur son projet ne font aucun doute ; toujours là pour aider les autres ; et surtout la seule personne à comprendre les expressions « originales » du Nord ;

Wafa Bahlouli, pour son caractère unique qu'on adore et sa gentillesse ;

Christine Bôle-Feysot, merci pour son aide sur toutes mes manip « originales ». Et oui « nous allons faire un *Nature* ! »^^ ;

Jonathan Breton, pour sa disponibilité et ses conseils notamment sur mon anglais « *no fluent* » ^^ ;

La team « Nutriset » :

- **Emmeline Salameh**, ma première collègue de bureau quand je suis arrivée au laboratoire ; dont le sifflement d'une chanson transformait souvent le bureau en des airs de « faux karaoké » ;
- **Clément L'huillier**, dont chaque discussion finit toujours par une touche d'humour « noire » dérangeante mais qu'on aime bien ;
- **Marine Jarbeau**, la technicienne aux deux thèses, toujours sources d'histoires improbables à raconter à la pause-café et utilisant des expressions du Nord souvent incompréhensibles^^ ;

Alexis Goignon, pour son expertise en protéomique et ses conseils sur mes analyses 2D ;

Moïse Coëffier, pour sa disponibilité et ses nombreux conseils sur le plan scientifique mais aussi humain, toujours à l'écoute des problèmes des étudiants (et il y en a^^) pour les aider à trouver les solutions les plus adaptées ;

Rachel Marion-Letellier, pour sa joie de vivre communicative mais surtout sa gentillesse et son humanité ;

David Ribet, pour sa pédagogie, son aide et son calme à toute épreuve ;

Sylvie Martins et Sabine Douville, nos deux Secrétaires, pour leurs bonnes humeurs communicatives ; leurs disponibilités, qui se démènent sans cesse à résoudre nos problèmes administratifs ;

Fatima Léon, avec qui les nombreuses séries animales sont presque devenues « un plaisir », de la positivité, de la joie de vivre, une bonne ambiance. Merci pour tout ça Faty ! :)

Liliana Belmonte, pour sa touche de fraîcheur et d'exotisme qui manque au laboratoire ;

Najate Achamrah, la plus présente des Cliniciennes ;

Jean-Claude et Jean-Luc do Rego, pour leurs disponibilités ;

Mais également à l'ensemble des étudiants BTS, L3, M1, M2 qui sont passés par ce laboratoire et qui ont contribué d'une manière ou d'une autre, à l'ambiance de ce laboratoire et aux travaux qui y sont réalisés.

♠ À mes amis depuis un certain nombre d'années,

Marina, Mégane, Angeline, Anne-Sophie, Benjamin, Morgane, Stessy, Meriem et Hélène, de nombreuses villes oui ! Mais qui malgré la distance ont toujours été là. Des soirées improvisées comme à la fac, jusqu'à celles qui étaient programmées ; de nombreuses heures au téléphone pour certains ;

de multiples SMS délirants et rassurants pour d'autres, je vous remercie d'avoir été là et de l'être toujours. Et surtout merci à vous de m'avoir rappelé qu'il existe un monde en dehors du laboratoire.

♠ À mes parents,

Qui m'ont toujours soutenue, dans mes choix professionnels jusqu'à ces trois années de thèse, qui ont toujours eu confiance en moi, et dont la fierté est une réelle source d'énergie. Je suis réellement consciente de la chance que j'ai. Merci d'être là et d'être les personnes que vous êtes !

Abréviations

| | |
|---|--|
| aa : acides aminés | ICV : intra-cérébroventriculaire |
| ABA : <i>activity-based anorexia</i> | Ig : immunoglobuline |
| Acb : noyau accumbens | IMC : indice de masse corporelle |
| ACTH : <i>adreno cortico trophic hormone</i> | IP : intrapéritonéale |
| ADH : hormone anti-diurétique | ISR : <i>recombinant insulin receptor</i> |
| ADP : Adénosine diphosphate | IV : intra veineuse |
| AgRP : <i>agouti-related protein</i> | LCFA : <i>long-chain fatty acids</i> |
| Amg : amygdale | LepR : récepteur à la leptine |
| α -MSH : <i>α-Melanocyte-Stimulating Hormone</i> | LFA : <i>Limited Food Access</i> |
| AN : <i>anorexia nervosa</i> , anorexie mentale | LHA : aire hypothalamique latérale |
| ARC : noyau arqué | LPH : lipotrophe |
| auto-Ac : auto-anticorps | MCH : <i>melanin-concentrating hormone</i> |
| ATP : Adénosine triphosphate | MC-R : récepteur aux mélanocortines |
| AVP : vasopressive | NDB : <i>nucleotide-binding domain</i> |
| BDNF : <i>brain-derived neurotrophic factor</i> | NPY : neuropeptide Y |
| BED : <i>Binge-eating disorders</i> ; hyperphagie boulimique | NTS : noyau du tractus solitaire |
| BN : <i>Bulimia nervosa</i> ; Boulimie nerveuse | OCT : ocytocine |
| BSA : Albumine de sérum bovin | OMS : organisation Mondiale de la Santé |
| CART : <i>cocaine and amphetamine-related transcript</i> | OXM : oxyntomoduline |
| CCK : cholécystokinine | ORX : orexines |
| CI : complexe immunitaire | POMC : pro-opiomélanocortine |
| ClpB : <i>Caseinolytic peptidase B</i> | PBN : noyau parabrachial |
| CPF : cortex préfrontal | PFA : région périfornique |
| CRH : <i>corticotropin-releasing hormone</i> | PL : phospholipides |
| DA : dopamine | PP : polypeptide pancréatique |
| DIO : <i>diet induced obesity</i> | PV : pallidum ventral |
| DMH : noyau dorsomédian | PVN : noyau paraventriculaire |
| DPP-IV : dipeptidyl-peptidase IV | PYY : peptide YY |
| DSM : Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux | SC : sous cutané |
| <i>E. coli</i> : <i>Escherichia coli</i> | SCOFF : <i>Sick, Control, One, Fat, Food</i> |
| EDI : <i>Eating Disorders Inventory</i> | SF1 : <i>steroidogenic factor 1</i> |
| END : endorphines | SFCA : <i>short-chain fatty acids</i> |
| FA : phospholipides | TEER : <i>Trans Epithelial Electrical Resistance</i> |
| FFAR2/3 : <i>free fatty acid receptor 2/3</i> | TCA : Troubles du Comportement Alimentaire |
| GABA : acide γ -aminobutyrique | TG : triglycérides |
| GHRH : <i>growth hormone releasing factor</i> | TRH : <i>thyrotropin-releasing hormone</i> |
| GHS-R : récepteur du sécrétagogue de l'hormone de croissance | T1R2/3 : <i>taste receptor type 2/3</i> |
| GIP : <i>gastric inhibitory polypeptide</i> | TV : aire tegmentale ventral |
| GnRH : <i>gonadotropin releasing hormone</i> | 3V : 3 ^{ème} ventricule |
| GPCR : récepteurs couplés aux protéines G | VMN : noyau ventromédian |
| HFD : <i>High Fat Diet</i> | SNC : système nerveux central |
| Hsp : <i>Heat shock protein</i> | Y1-R : récepteur Y |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1. Localisation et représentation schématique des noyaux de l'hypothalamus sur une coupe frontale de cerveau | 1 |
| Figure 2. Boucle de rétroaction neuronale du noyau arqué..... | 1 |
| Figure 3. Consommation alimentaire et poids corporel après des injections de NPY chez le Rat | 5 |
| Figure 4. Etude du poids corporel et de la prise alimentaire chez des souris <i>knock out</i> pour le neurone AgRP | 6 |
| Figure 5. Traitement post-traductionnel de la pro-opiomélanocortine chez l'homme..... | 3 |
| Figure 6. Effet d'une injection ICV du peptide CART sur la prise alimentaire..... | 3 |
| Figure 7. Implication du PVN dans la régulation des dépenses énergétiques de l'organisme <i>via</i> le complexe hypothalamo-hypophysaire..... | 8 |
| Figure 8. Modèle neuroanatomique des voies par lesquelles les signaux périphériques interagissent avec les circuits centraux autonomes régulant l'appétit. | 10 |
| Figure 9. Circuits de la composante hédonique de la régulation du comportement alimentaire..... | 12 |
| Figure 10. Schéma de l'hypothalamus illustrant les voies neuronales qui stimulent l'appétit et réduisent les dépenses énergétiques (voie orexigène) ou qui inhibent l'appétit et augmentent les dépenses énergétiques (voie anorexigène)..... | 28 |
| Figure 11. Acylation de la ghréline..... | 13 |
| Figure 12. Distribution de PYY au sein du tractus gastro-intestinal humain et concentration plasmatique après un repas..... | 14 |
| Figure 13. Effet du GLP-1 sur la prise alimentaire par une administration ICV | 15 |
| Figure 14. Mécanisme d'action de la leptine. | 19 |
| Figure 15. Mécanisme d'action de l'insuline sur la régulation du glucose <i>via</i> le transporteur GLUT 4 | 20 |
| Figure 16. Comparaison des scores de satiété de plusieurs aliments | 37 |
| Figure 17. Illustration des récepteurs gastro-intestinaux spécifiques des nutriments..... | 22 |
| Figure 18. Évolution de la répartition des principaux types de trouble du comportement alimentaire selon l'évolution de la classification DSM. | 43 |
| Figure 19. Interactions entre les différents troubles du comportement alimentaire | 28 |
| Figure 20. Questionnaire SCOFF pour le dépistage des TCA..... | 30 |
| Figure 21. Composition du microbiote du tractus gastro-intestinal humain..... | 31 |
| Figure 22. Transplantation de microbiote fécal chez l'humain et la souris | 33 |

| | |
|---|----|
| Figure 23. Modèle hypothétique d'activation du MC4-R par le CI : α -MSH/IgG chez les sujets sains et obèses ou souffrant d'anorexie mentale. | 34 |
| Figure 24. Modèle schématique du rôle des IgG anti-ghréline sur le contrôle de l'appétit dans les conditions normales et pathologiques..... | 35 |
| Figure 25. Modèle d'action du système DnaK /DnaJ /GrpE. | 53 |
| Figure 27. Structure de la protéine ClpB..... | 38 |
| Figure 26. Modèle d'action du système GroEL/GroES. | 38 |
| Figure 28. Modèle de désagrégation des protéines par le système DnaK/DnaJ/GprE et la protéine ClpB | 39 |
| Figure 29. Identification protéomique du mimétisme moléculaire entre la protéine ClpB et l' α -MSH | 39 |
| Figure 30. Comparaison des concentrations plasmatiques de ClpB chez les personnes saines (HP) ou souffrant de troubles du comportement alimentaire (ED)..... | 40 |
| Figure 31. Identification et effets de la protéine ClpB sur des paramètres clés de la régulation de la prise alimentaire | 40 |
| Figure 32. Modèle hypothétique des mécanismes physiologiques mis en jeu dans les troubles liés à l'alimentation | 98 |

« L'expérience de beaucoup d'opinions donne à l'esprit beaucoup de flexibilité »
Citation de Joseph Joubert ; Des mœurs, XVII (1866)

Avant-propos

Centrale dans la prise de poids, la faim est un mécanisme extrêmement complexe et multifactoriel.

Depuis les années 80, les études se poursuivent afin de comprendre l'ensemble des mécanismes mis en jeu dans le contrôle de l'appétit et du comportement alimentaire. Cependant, dans le cas de pathologies tels que les troubles du comportement alimentaire (TCA) ces mécanismes sont dérégulés. La nutrition et le microbiote sont deux paramètres importants impliqués dans la compréhension de ces mécanismes par la découverte d'une communication entre le cerveau et l'intestin. C'est cette communication à laquelle s'intéresse particulièrement l'UMR 1073 : « Nutrition, Inflammation et Dysfonctions de l'Axe intestin-cerveau » située à la Faculté de Médecine et Pharmacie à Rouen et dirigée par le Pr. Pierre Déchelotte.

Depuis plusieurs années, diverses hypothèses ont été proposées afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans l'obésité et les TCA. En 2002, une étude de Fetissov et al. a montré l'implication d'autoanticorps (auto-Ac) dirigés contre des neuropeptides dans les TCA (Fetissov et al. 2002). En 2008, les études suivantes ont révélé la présence d'acides aminés (aa) identiques à l' α -MSH (*α -Melanocyte-stimulating hormone*) chez de nombreux microorganismes commensaux (bactéries, champignons, virus, archées) (Fetissov et al. 2005). Et c'est en 2014, qu'une protéine bactérienne produite par *Escherichia coli* (*E. coli*) : la ClpB (*Caseinolytic peptidase B*) a révélé posséder un mimétisme de 6 aa en commun avec l' α -MSH (Tennoune et al. 2014).

C'est donc dans ce contexte scientifique que la société TargEDys (pour « *Targeting Eating Dysfunctions* »), dirigée par le Dr. Grégory Lambert s'est ancrée au sein de l'UMR 1073. Son objectif principal est de mieux comprendre les mécanismes qui existent entre le microbiote intestinal et la régulation du comportement alimentaire afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour agir sur le contrôle du poids.

Dans un objectif final de développer un produit pharmaceutique, cette thèse s'est intéressée à mieux comprendre le mécanisme d'action ainsi que les potentiels effets pharmacologiques de la protéine ClpB dans les pathologies liées à l'alimentation.

Table des matières

| | |
|--|----|
| Résumé..... | 1 |
| Remerciements | 3 |
| Abréviations | 7 |
| Liste des figures..... | 8 |
| Avant-propos..... | 12 |
| Table des matières..... | 12 |
| CHAPITRE 1 | 16 |
| Régulation physiologique du comportement alimentaire | 16 |
| I.1. REGULATION CENTRALE DE LA PRISE ALIMENTAIRE..... | 17 |
| I.1.1. L'Hypothalamus..... | 17 |
| I.1.2. Noyau arqué..... | 17 |
| 1.1.1. <i>Population orexigène</i> | 19 |
| a) Neuropeptide Y | 19 |
| b) Agouti-related peptide | 20 |
| 1.1.2. <i>Population anorexigène</i> | 20 |
| a) Pro-opiomélanocortine / α -MSH..... | 20 |
| b) Cocaine and amphetamine regulated transcript | 21 |
| I.1.3. Noyaux de second ordre | 23 |
| I.1.3.1. <i>Noyau ventromédian de l'hypothalamus</i> | 23 |
| I.1.3.2. <i>Noyau paracentriculaire</i> | 24 |
| I.1.3.3. <i>Noyau dorsomédian de l'hypothalamus</i> | 24 |
| I.1.3.4. <i>Aire hypothalamique latérale</i> | 25 |
| I.2. REGIONS EXTRA-HYPOTHALAMIQUES | 26 |
| I.2.1. Noyau du tractus solitaire | 26 |
| I.2.2. Régions impliquées dans la régulation hédonique | 26 |
| I.3. REGULATION PERIPHERIQUE DE LA PRISE ALIMENTAIRE | 27 |
| I.3.1. Peptides orexigènes | 27 |
| I.3.1.1. <i>Ghréline</i> | 27 |
| c) Acyl-ghréline..... | 29 |
| a) Des-acylghréline | 30 |
| I.3.2. Peptides anorexigènes | 30 |
| I.3.2.1. <i>Peptide YY (PYY)</i> | 30 |

| | |
|---|----|
| 1.3.2.2. Polypeptide pancréatique (PP) | 31 |
| 1.3.2.3. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) | 31 |
| 1.3.2.4. Oxyntomoduline (OXM) | 32 |
| 1.3.2.5. Cholecystokinine (CCK) | 32 |
| 1.3.2.6. Amyline | 33 |
| 1.3.2.7. Leptine | 34 |
| 1.3.2.8. Insuline | 35 |
| CHAPITRE 2 | 36 |
| Implication de l'alimentation sur les mécanismes de l'appétit..... | 36 |
| II.1. GENERALITES | 37 |
| II.2. EFFET D'UN REGIME HYPERPROTEIQUE..... | 37 |
| II.3. EFFETS D'UN REGIME HYPERGLUCIDIQUE | 38 |
| II.3. EFFETS D'UN REGIME HYPERLIPIDIQUE | 39 |
| II.2. EFFETS DES NUTRIMENTS SUR LES SIGNAUX PERIPHERIQUES | 40 |
| CHAPITRE 3 | 42 |
| Rôle du microbiote intestinal dans les troubles du comportement alimentaire | 42 |
| III.1. TROUBLES DU COMPORTEMENT ALIMENTAIRE | 43 |
| III.1.1. Anorexie mentale (AN) | 43 |
| III.1.2. Boulimie nerveuse (BN) | 44 |
| III.1.3. Hyperphagie compulsive (BED) | 45 |
| III.1.4. Outils de diagnostiques des TCA | 46 |
| III.2. OBESITE ET SURPOIDS | 47 |
| III.3. EPIDEMIOLOGIE DES TCA, DE L'OBESITE ET DU SURPOIDS..... | 47 |
| III.4. LE MICROBIOTE INTESTINAL..... | 48 |
| III.4.1. Généralités | 48 |
| III.4.2. Implication du microbiote intestinal dans les TCA et l'obésité | 48 |
| III.5 IMPLICATION DES AUTO-ANTICORPS DANS LES TCA | 50 |
| III.5. Les anti-neuropeptides, une hypothèse physiopathologique..... | 50 |
| CHAPITRE 4 | 52 |
| Implication de la protéine ClpB dans la régulation de la prise alimentaire | 52 |
| IV.1. FONCTION CHAPERONNE DE LA PROTEINE CLPB | 53 |
| IV.1.1. Généralités | 53 |
| IV.1.2. Le système DnaK/DnaJ/GrpE (Hsp70) | 53 |
| IV.1.3. Le système GroEL/ES (Hsp60) | 54 |
| IV.1.4. La protéine de désagrégation ClpB | 54 |
| IV.2. PROTEINE CLPB ET REGULATION DE LA PRISE ALIMENTAIRE | 55 |

| | |
|---|-----|
| IV.2.1. Spécificité de la protéine ClpB et α -MSH | 55 |
| IV.2.2. Effets de la protéine ClpB sur la prise alimentaire <i>via</i> les Ac..... | 55 |
| IV.2.3. Effets de protéines bactériennes contenant la protéine ClpB sur la prise alimentaire | 56 |
| Objectifs de la thèse | 58 |
| RESULTATS..... | 59 |
| ARTICLE 1..... | 60 |
| Effets des macronutriments sur la production <i>in vitro</i> de ClpB, une protéine mimétique bactérienne de l' α -MSH et son rôle éventuel dans la signalisation de la satiété | 60 |
| ARTICLE 2..... | 74 |
| Modifications du microbiote et de la protéine bactérienne <i>Caseinolytic peptidase B</i> pendant la restriction alimentaire chez la souris : intérêt pour l'apparition et la perpétuation de l'anorexie mentale..... | 74 |
| MANUSCRIT 1. | 89 |
| Effets de la protéine bactérienne ClpB et de l'un de ses fragments peptidiques sur la régulation de la prise alimentaire chez la Souris..... | 89 |
| Discussion et Perspectives | 105 |
| I. MODULATION DE LA PRODUCTION DE LA PROTEINE CLPB | 106 |
| I.1. Impact de l'alimentation | 106 |
| II. MECANISMES DE PASSAGE DE LA PROTEINE CLPB A TRAVERS LA BARRIERE INTESTINALE | 107 |
| II.1. Dans les cas pathologiques..... | 107 |
| II.2. <i>Via</i> des mécanismes de passages transcellulaires | 108 |
| II.3. <i>Via</i> des mécanismes de passages paracellulaires | 109 |
| III. EFFETS ANOREXIGENES DE LA PROTEINE CLPB | 109 |
| III.1. <i>Via</i> la sécrétion de peptides satiétogènes..... | 109 |
| III.2. <i>Via</i> la sécrétion d'auto-Ac | 110 |
| III.3. Action directe de la protéine ClpB recombinante | 111 |
| III.4. Action anorexigène des fragments de la protéine ClpB..... | 111 |
| III.5. Action centrale de la protéine ClpB..... | 112 |
| Conclusion | 114 |
| Références bibliographiques | 115 |
| ANNEXES..... | 158 |
| ANNEXE 1. MANUSCRIT ARTICLE..... | 160 |
| La bactérie commensale <i>Hafnia alvei</i> réduit la prise alimentaire et la masse grasse chez des souris obèses – un nouveau probiotique potentiel pour la régulation de l'appétit et du poids corporel..... | 160 |
| ANNEXE 2. MANUSCRIT ARTICLE..... | 163 |

| | |
|--|-----|
| La souche <i>Hafnia alvei</i> 4597 réduit la prise de poids et améliore la composition corporelle, le métabolisme du glucose et des lipides dans un modèle murin d'obésité hyperphage..... | 163 |
| ANNEXE 3. LISTES DES COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES | 165 |

CHAPITRE 1

Régulation physiologique du comportement alimentaire

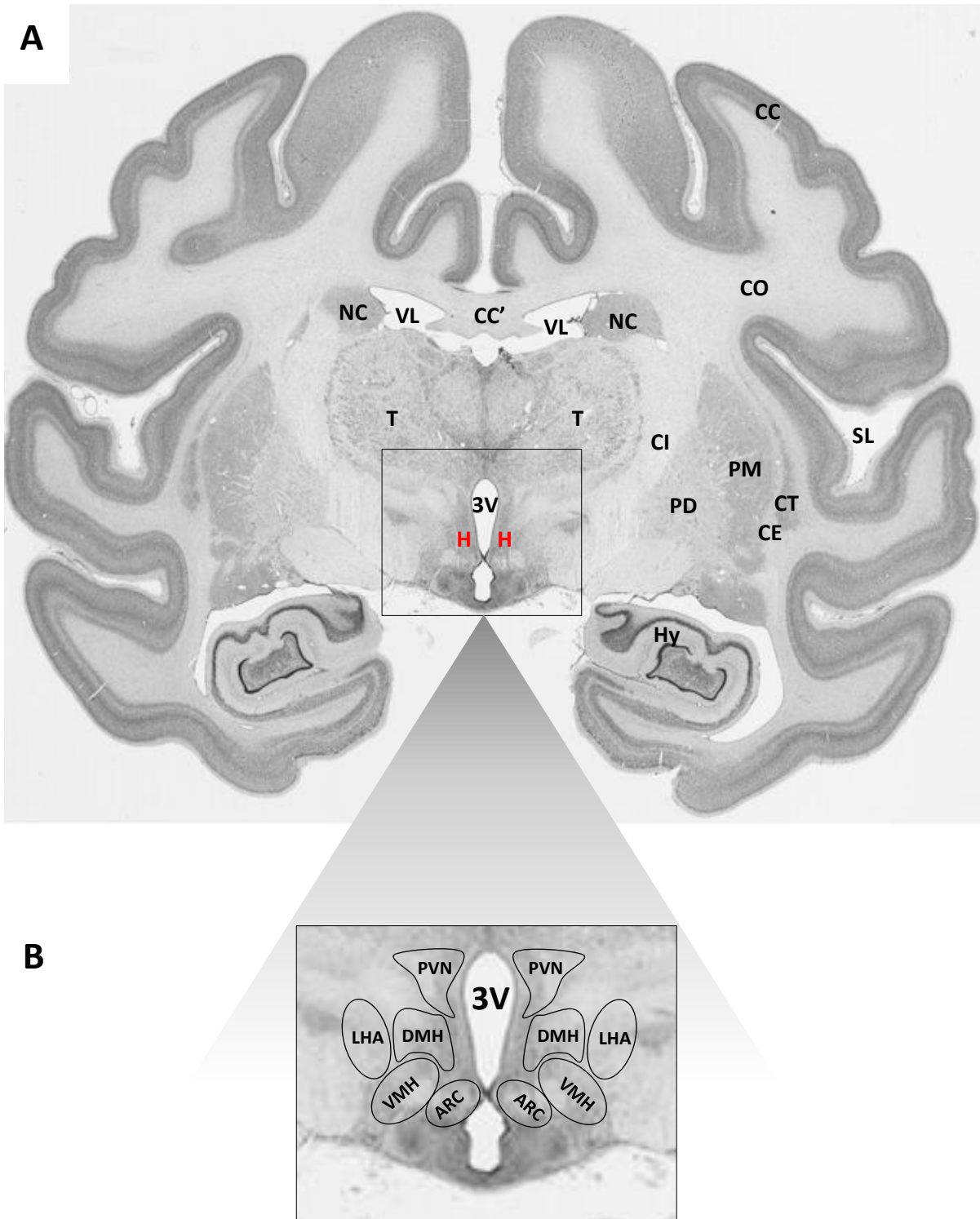


Figure 1. Localisation et représentation schématique des noyaux de l'hypothalamus sur une coupe frontale de cerveau

- (A) VL : Ventricule Latéral; CC : Cortex Cérébral; CC' : Corps Calleux; NC : Noyau Caudé; 3V : 3^{ème} Ventricule; CO : Centre Ovale; Hy : Hippocampe; SL : Sillon Latéral; CI : Capsule Interne; CE : Capsule Externe; PD : Pallidum; PM : Putamen; CT : Claustrum; T : Thalamus ; **H : Hypothalamus**
- (B) ARC : noyau arqué; VMH : noyau ventromédian; DMH : noyau dorsomédian; LHA : aire hypothalamique latérale; PVN : noyau paraventriculaire

Adaptée de l'illustration issue de « BRAINMAPS », 2005

I.1. REGULATION CENTRALE DE LA PRISE ALIMENTAIRE

I.1.1. L'Hypothalamus

L'hypothalamus est une structure du système nerveux central située sous le thalamus (**Figure 1A**). Il comprend plusieurs noyaux interconnectés et organisés symétriquement par rapport au 3^{ème} ventricule (3V) : le noyau arqué (ARC), le noyau paraventriculaire (PVN), l'aire hypothalamique latérale (LHA), le noyau ventromédian (VMH) et le noyau dorsomédian (DMH) (**Figure 1B**) (Yu and Kim 2012). Une distinction se fait entre les noyaux dits de 1^{er} ordre (ARC) qui établissent des projections sur les noyaux dits de 2^{ème} ordre (PVN, VMH, DMH et LHA). L'ensemble de ces neurones peuvent aussi recevoir des informations afférentes du noyau du tractus solitaire (NTS) qui lui-même, reçoit des informations provenant de la périphérie *via* le nerf vague (Harrold et al. 2012).

Par sa capacité à répondre aux stimuli périphériques (hormonaux, humoraux et nerveux) *via* la sécrétion d'hormones, l'hypothalamus est impliqué dans le maintien de l'homéostasie énergétique et donc dans la régulation de grandes fonctions telles que les cycles du sommeil, la température corporelle, la soif, les émotions mais aussi dans le contrôle de l'appétit (Pop, Crivii, and Opincariu 2018).

En effet, à partir des années 30, des études lésionnelles ont confirmé l'implication de cette structure cérébrale dans le contrôle du comportement alimentaire chez le Rat, le Chat ou encore le Singe (Hetherington and Ranson 1940), (Anand and Brobeck 1951). Des expériences similaires ont montré que des lésions au niveau du VMH entraînaient une hyperphagie et une obésité tandis que des lésions de l'LHA entraînaient une anorexie et une perte de poids (Stellar 1954). De ces expériences est née « la théorie dite « des deux centres » composée d'un « centre de la satiété », ciblant particulièrement le VMH et le PVN et d'un « centre de la faim » ciblant l'LHA (Rohner-Jeanrenaud 1995), (King 2006).

I.1.2. Noyau arqué

Le noyau arqué (ARC) de l'hypothalamus est considéré comme le site hypothalamique principal dans la régulation de l'appétit et de la prise alimentaire (Sainsbury, Cooney, and Herzog 2002) car il est capable d'intégrer les signaux du tronc cérébral et de la périphérie (R. D. Cone et al. 2001), (Cowley et al. 2001). En premier lieu, des études ont montré que des lésions de l'ARC chez des souris nouveau-nés entraînaient une obésité et une hyperphagie (Olney 1969). En 1975, des autopsies réalisées sur des patients obèses ont révélé que leurs tumeurs étaient localisées à la base de l'hypothalamus

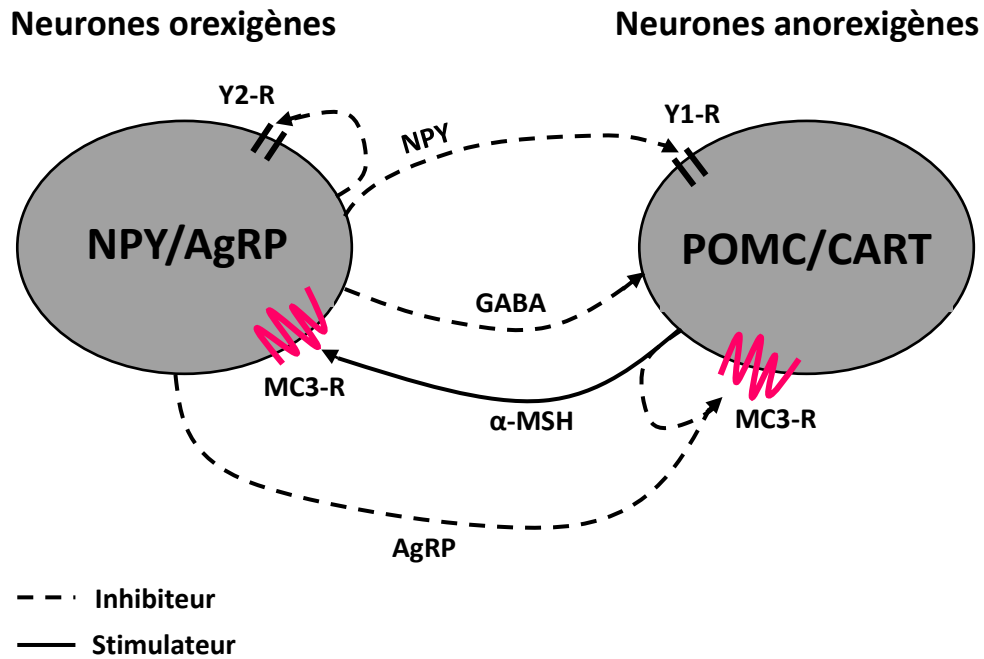


Figure 2. Boucle de rétroaction neuronale du noyau arqué

Les neurones orexigènes qui synthétisent le NPY et l'AgRP inhibent les neurones anorexigènes adjacents qui expriment la POMC et le CART par la libération de GABA et les interactions avec le Y1-R et le MC3-R. Les neurones à NPY/AgRP sont également capables d'autorégulation négative par le Y2-R. Les neurones à POMC/CART libèrent l' α -MSH qui peut inhiber leurs propres neurones en stimulant les neurones NPY/AgRP par le biais du MC3-R.

Adaptée de l'illustration de Orr et al., 2005

NPY : neuropeptide Y; AgRP : *Agouti-related protein*; POMC : Pro-opiomélanocortine; CART : *Cocaine and Amphetamine-Related Transcript*; α -MSH : α -melanocyte stimulating hormone; MC3-R : Récepteur mélanocortine de type 3; GABA : acide γ -aminobutyrique; Y1-R : récepteur Y1; Y2-R : récepteur Y2.

suggérant une modification du fonctionnement de l'ARC dans le cas d'un phénotype obèse (Bray and Gallagher 1975). De plus, localisé à la base du 3V, à proximité de l'éminence médiane dans un faisceau allongé en forme d'arc, l'ARC est une structure circumventriculaire possédant une barrière hémato-encéphalique semi-perméable (Peruzzo et al. 2000). De ce fait, des facteurs circulants tels que les hormones ou les nutriments sont à même d'interagir directement avec les neurones de l'ARC et par conséquent d'informer les neurones de second ordre (DMH, PVN, VMH et LHA) des réserves énergétiques disponibles en périphérie (Harrold et al. 2012). Ces caractéristiques anatomiques font donc de l'ARC, une zone stratégique de liaison entre les organes périphériques et le système nerveux central (SNC) permettant l'échange de signaux nécessaires au maintien de l'homéostasie énergétique.

Afin d'accomplir son rôle de régulateur de l'appétit, l'ARC est composé d'au moins deux populations neuronales : une population de neurones dite « anorexigène » (suppresseur d'appétit) exprimant la pro-opiomélanocortine (POMC) et le *cocaïne and amphetamine-related transcript* (CART) ; et une population de neurones dite « orexigène » exprimant le neuropeptide Y (NPY) et l'*agouti-related protein* (AgRP) (Sainsbury, Cooney, and Herzog 2002).

Stimulés par les signaux périphériques, ces neurones effectuent des rôles opposés et distincts. Néanmoins, des études morphologiques ont révélé qu'il existait un contact synaptique direct entre les terminaux NPY et les corps cellulaires mélanocortinergiques voisins (POMC) (Broberger et al. 1997). Des études d'immunohistochimies ont confirmé que les neurones à NPY/AgRP exerçaient un effet inhibiteur sur les neurones à POMC/CART adjacents par la libération d'un neurotransmetteur inhibiteur : l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et par une inhibition des récepteurs aux mélanocortines de type 3 (MC3-R) et du récepteur Y1 (Y1-R) (Bagnol et al. 1999), (Sainsbury, Cooney, and Herzog 2002). L'AgRP quant à lui, est un agoniste inverse des récepteurs aux mélanocortines 3 et 4 (MC3-R, MC4-R) (Morton and Schwartz 2001) lui conférant indirectement son effet orexigène.

Les deux populations de neurones sont également capables d'autorégulation négative permise par l'expression du MC3-R à la surface des neurones à POMC/CART et du récepteur Y2 (Y2-R) sur les neurones à NPY/AgRP (Bagnol et al. 1999) (**Figure 2**).

Considéré comme un centre intégrateur de signaux périphériques, les axones des neurones de l'ARC se projettent vers les neurones dits de « 2nd ordre », où sont également sécrétées des hormones hypothalamiques qui en réponse aux signaux émis par l'ARC vont transmettre des informations satiétogènes aux différentes structures du SNC. Parmi ces hormones, le PVN sécrète la *thyrotropin-releasing hormone* (TRH) (Lechan and Fekete 2006), la *corticotropin-releasing hormone* (CRH) (Merchenthaler et al. 1982), la nesfatine (Maejima et al. 2009) et l'ocytocine (Arletti, Benelli, and Bertolini 1989).

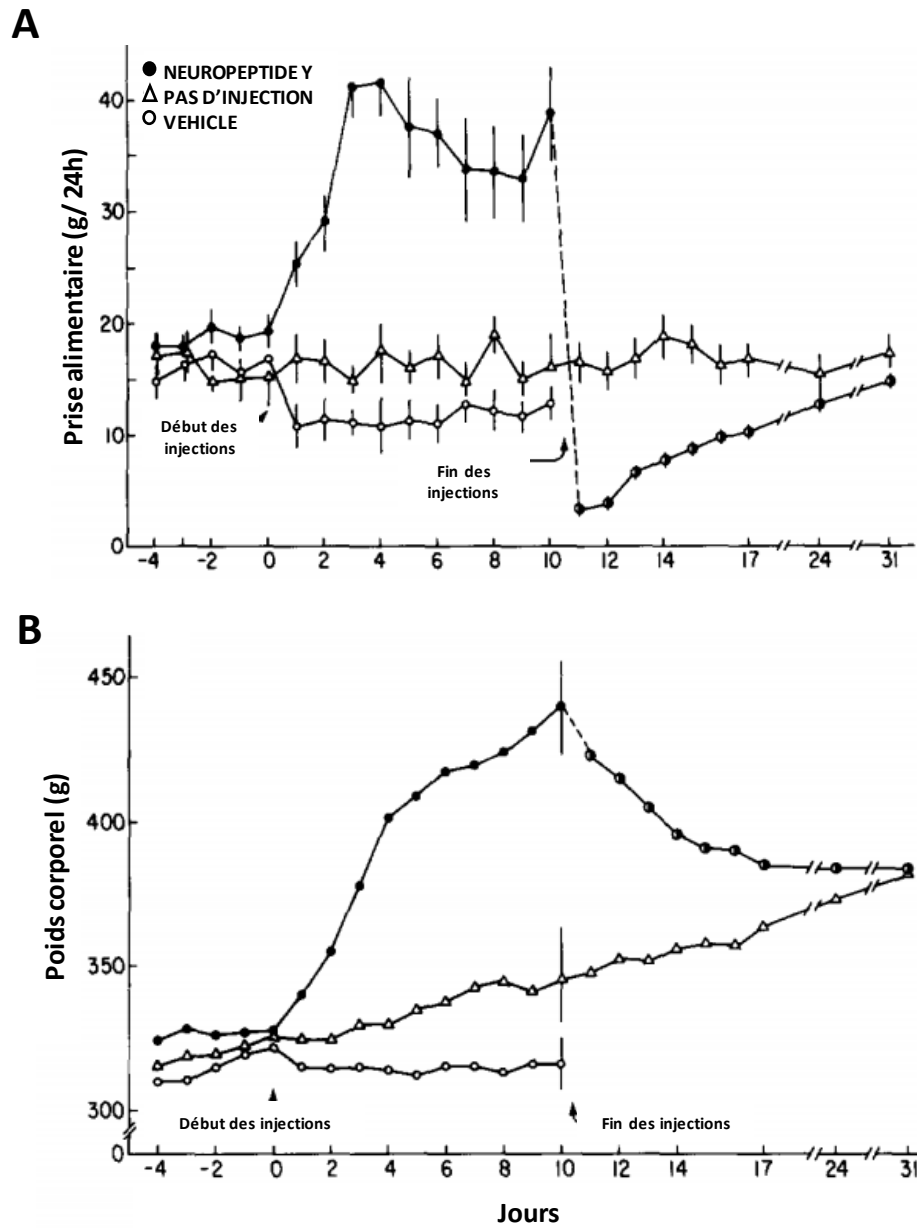


Figure 3. Consommation alimentaire et poids corporel après des injections de NPY chez le Rat

Trois groupes de rats femelles ont reçu 3 injections dans le PVN, pendant 10 jours, soit de NPY (à 235pmol) (n=9) ou soit de véhicule (n=6). Des rats servant de contrôles n'ont pas reçu d'injection (n=5).

La consommation alimentaire et le poids corporel ont été mesurés toutes les 24h pendant 4h avant et pendant la période d'injection de 10 jours. Ces mesures ont été continués pendant 21 jours après l'injection chez 4 rats choisis au hasard. Les valeurs ont été représentées en moyenne +/- SEM.

Issue de la publication de Stanley et al., 1985

NPY : neuropeptide Y; PVN : noyau paraventriculaire.

L'LHA et la région périfornique (PFA) produisent quant à elles, la melanin-concentrating hormone (MCH) et les orexines (ORX) (Valassi, Scacchi, and Cavagnini 2008). Ces connexions entre populations neuronales leur permettent de fournir une réponse adaptée aux besoins de l'organisme.

1.1.1. Population orexigène

a) Neuropeptide Y

En 1982, des méthodes de chromatographie en phase liquide à haute performance ont permis d'isoler la protéine du neuropeptide Y (NPY) dans un cerveau de porc et de définir sa séquence protéique composée de 36 aa (Tatemoto 1982b). Des expériences de double immunomarquage ont révélé la présence de NPY dans le cerveau de mammifère (Allen et al. 1983) avec une immunoréactivité plus élevée dans l'hypothalamus et plus particulièrement dans les neurones de l'ARC (Chronwall et al. 1985). De plus, les neurones NPY projettent des afférences sur des zones hypothalamiques adjacentes impliquées dans la régulation du comportement alimentaire telles que le PVN, le DMH, la PFA et l'LHA (Chronwall et al. 1985).

Deux ans après sa découverte, une étude a montré que l'administration intra-cérébroventriculaire (ICV) de NPY (à 2 ou 10µg) a induit une augmentation de la prise alimentaire chez le Rat (Clark et al. 1984). Les mêmes constatations ont été retrouvées chez le Singe (Larsen et al. 1999), le Mouton (Miner et al. 1989), la Souris (Morley et al. 1985) ou encore le Lapin (Pau, Pau, and Spies 1988). L'injection répétée de NPY (235pmol) dans le PVN pendant 10 jours a entraîné une hyperphagie persistante, qu'ainsi qu'une perte de poids et de la graisse corporelle chez des rats femelles (Stanley et al. 1986) (**Figure 3**). Par ailleurs, des expériences sur des modèles génétiques ont également retrouvé une expression accrue de NPY chez des souris obèses (*ob/ob*) (Jang and Romsos 1998) ou encore chez des rats Zucker obèses (*fa/fa*) (Dryden et al. 1995). Grâce à l'ensemble de ces observations, le NPY a été considéré comme l'un des plus puissants peptides orexigènes (Levine and Morley 1984).

Néanmoins, des recherches sur l'expression génétique de NPY ont montré des effets divergents mettant en avant la complexité de la régulation de la prise alimentaire. En effet, des souris présentant une surexpression de NPY (*npv +/+*) n'ont pas montré d'augmentation de la prise alimentaire (Inui et al. 1998). De même, la perte de fonction du gène codant pour le NPY n'a pas induit de comportement anorexigène ou une perte de poids (Erickson, Clegg, and Palmiter 1996). Ces résultats indiquent que le NPY est un modulateur important de réponse des signaux périphériques mais surtout qu'il existe un véritable rétrocontrôle entre les populations de l'ARC.

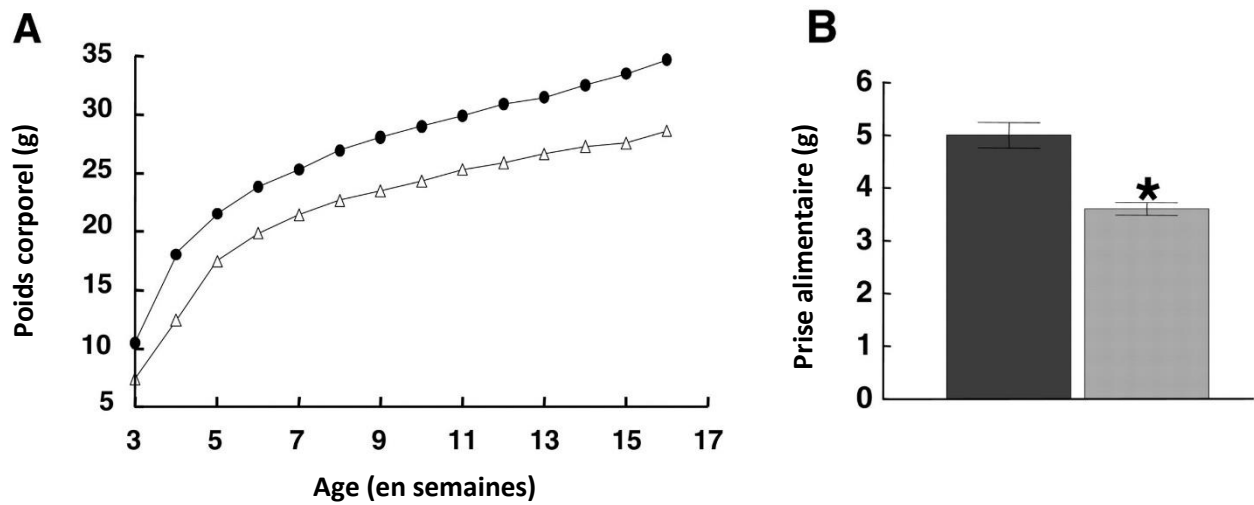


Figure 4. Etude du poids corporel et de la prise alimentaire chez des souris *knock out* pour le neurone AgRP

- (A) Les souris *knock out* pour l'AgRP (triangle blanc) présentent un poids significativement inférieur à celui des témoins (WT) (cercle noir).
- (B) La prise alimentaire quotidienne moyenne des souris *knock out* pour l'AgRP (gris clair) est significativement inférieure à celle des souris WT (noir); * $p < 0,01$

Issue de la publication de Bewick et al., 2005

La réponse hyperphage au NPY implique une signalisation par le biais de récepteurs spécifiques. Parmi les cinq récepteurs NPY connus appelés Y1, Y2, Y4, Y5 et Y6 (Michel et al. 1998), les récepteurs Y1 et Y5 sont exprimés dans l'hypothalamus et sont les plus impliqués dans la régulation du comportement alimentaire et du bilan énergétique chez les mammifères (Hu et al. 1996), (Parker and Herzog 1999), (Duhault et al. 2000), (Lecklin et al. 2002).

b) Agouti-related peptide

La protéine AgRP est une protéine de 132 aa découverte en 1997 dans l'ARC de l'hypothalamus (Shutter et al. 1997), (Ollmann et al. 1997). Coexprimée dans certains cas avec le NPY, elle est également essentielle au contrôle de l'homéostasie énergétique. En effet, son expression est plus élevée chez les souris obèses et diabétiques (Shutter et al. 1997) et sa surexpression chez des souris transgéniques rend ces animaux hyperphages et obèses (Graham et al. 1997). *A contrario*, une inhibition de ces neurones entraîne une réduction de la prise alimentaire conduisant à un phénotype maigre et hypophage (Figure 4) (Bewick et al. 2005), (Gropp et al. 2005).

L'AgRP contrairement au NPY agit sur le système mélanocortinergique. C'est un agoniste inverse endogène naturel des récepteurs aux mélanocortines et plus particulièrement des MC3-R et MC4-R (Ollmann et al. 1997), (Bagnol et al. 1999). Ces deux récepteurs localisés au niveau central et particulièrement dans les noyaux concernés par la régulation de l'homéostasie énergétique (Harrold et al. 2012) sont connus pour médier les effets anorexigènes des peptides à mélanocortine (Huszar et al. 1997), (A. S. Chen et al. 2000) Coexprimée avec le NPY, l'AgRP pourrait également agir indépendamment (Nijenhuis, Oosterom, and Adan 2001) en tant qu'agoniste inverse compétitif inhibant la liaison de l' α -MSH avec ces récepteurs (Y. K. Yang et al. 1999).

L'ensemble de ces éléments confirme le rôle de l'AgRP comme un puissant peptide orexigène. Néanmoins, des études *in vivo* sur des souris *agrp* *-/-* ont montré que ces animaux présentaient une réponse normale à la faim. Ainsi, comme NPY, l'action de l'AgRP est dépendante des autres voies régulant l'appétit (Qian et al. 2002).

1.1.2. Population anorexigène

a) Pro-opiomélanocortine / α -MSH

La pro-opiomélanocortine (POMC) est une glycoprotéine de 31 kDa majoritairement présente dans l'hypophyse et qui est un précurseur d'une large variété de peptides tels que l'*adreno cortico trophic hormone* (ACTH), les hormones mélanotropes (α -MSH, β -MSH et γ -MSH), lipotropes (β -LPH et γ -LPH)

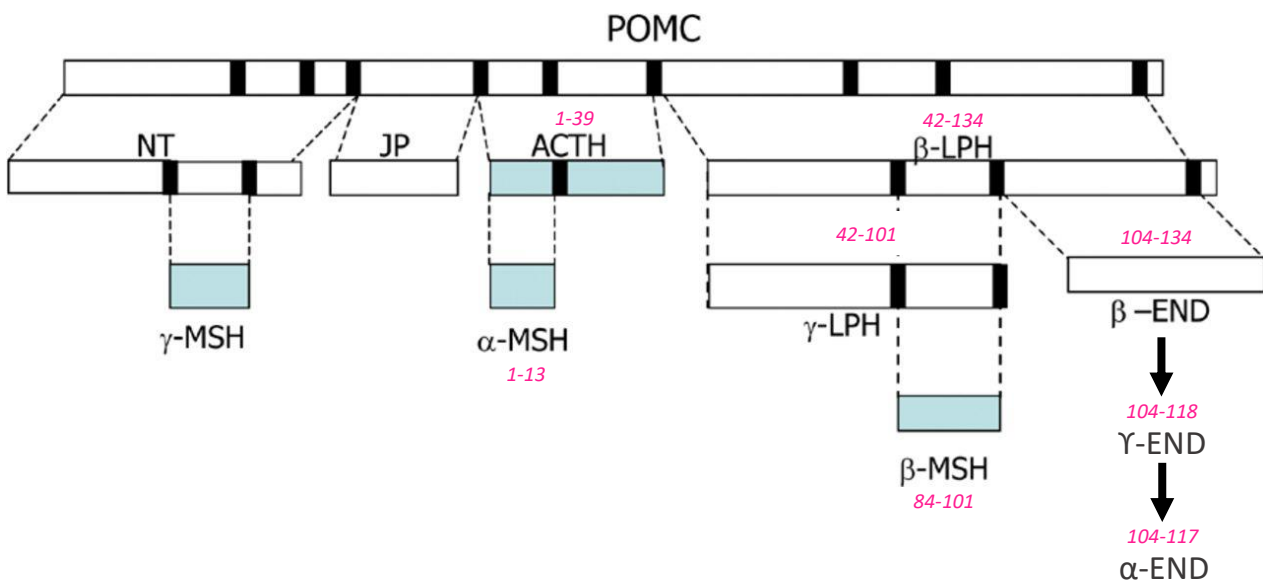


Figure 5. Traitement post-traductionnel de la pro-opiomélanocortine chez l'homme.

La POMC est un peptide précurseur de grande taille transformé en fragments biologiquement actifs plus petits par clivage au niveau de sites de clivage dibasiques (**trait noir**). L'ACTH, ainsi que les α -, β - et γ -MSH sont connues sous le nom de mélanocortines (**bleu pâle**).

Adaptée de l'illustration de Coll et al., 2007

NT : fragment N-terminal; JP : peptide de jonction; β -, γ -LPH : β -, γ -lipotropine; α -, β -, γ -END : α -, β -, γ -endorphine; ACTH : *Adreno Cortico Tropic Hormone* ; POMC : Pro-opiomélanocortine.

et les endorphines (α -END, β -END et γ -END) (Figure 5) (Raffin-Sanson, de Keyzer, and Bertagna 2003). L'action de l'ACTH et des hormones mélanotropes est médiée par les récepteurs aux mélanocortines impliquant le rôle de ces peptides dans le comportement alimentaire (Pritchard, Turnbull, and White 2002). L'effet anorexigène des neurones à POMC a été mis en évidence chez les souris *knock-out* pour POMC qui présentaient un phénotype hyperphage et obèse (Yaswen et al. 1999). Inversement, une activation des neurones à POMC a réduit l'apport alimentaire et le poids corporel chez la souris (Aponte, Atasoy, and Sternson 2011), (Zhan et al. 2013). Ces effets sont stimulés par l'action de l' α -MSH produite par les neurones à POMC (Fan et al. 1997) qui va activer les récepteurs aux mélanocortine MC3-R et MC4-R (Baldini and Phelan 2019). En effet, une carence en récepteur MC4-R (Huszar et al. 1997) ou de mutations du gène *mc4r* induisent une hyperphagie et une obésité chez les personnes concernées (Yeo et al. 1998), (Farooqi et al. 2003).

De plus, comme il a été précisé précédemment, l' α -MSH a la capacité de se lier aux MC3-R et MC4-R (Fan et al. 1997) et cette liaison lui confère son effet anorexigène (Roger D. Cone 2006). De ce fait, il est considéré comme l'un des peptides les plus importants dans les mécanismes de régulation de l'appétit.

L'activité des neurones à POMC peut également être médiée par des facteurs périphériques. Comme la sérotonine 2C (5-HT_{2C}), un signal anorexigène qui augmente l'activité des neurones à POMC (Heisler et al. 2002), (Sohn et al. 2011), (Roepke et al. 2012). Son action est assurée par des récepteurs spécifiques (5-HT-R) exprimés par les neurones à POMC (Heisler et al. 2002), (Berglund et al. 2013).

Les neurones à POMC sont aussi des cibles de la leptine et de l'insuline (Varela and Horvath 2012), des marqueurs d'adiposité (cf Chapitre 1, Partie C, 2.7 et 2.8) par l'activation de leurs récepteurs respectifs : LepR et le *recombinant insulin receptor* – ISR. Des souris dépourvues de LepR sur les neurones à POMC deviennent en surpoids et présentent une diminution de l'expression de POMC mais une augmentation de celle de l'AgRP et du NPY (Balthasar et al. 2004). En effet, l'activation de LepR dans les neurones à POMC induit une dépolarisation activatrice de ces neurones et une hyperpolarisation inhibitrice des neurones à NPY/AgRP. L'insuline, quant à elle, inhibe l'activité neuronale de POMC (Williams et al. 2010). Les récepteurs de la leptine et de l'insuline sur les neurones à POMC sont donc nécessaires dans la régulation de la balance énergétique.

b) *Cocaine and amphetamine regulated transcript*

La majorité des neurones à POMC dans l'ARC co-expriment également l'ARNm de CART (Vrang et al. 1999). Le *Cocaine and amphetamine regulated transcript* (CART) est un peptide découvert suite à des administrations aiguës de stimulants psychomoteurs tels que la cocaïne ou l'amphétamine, d'où son

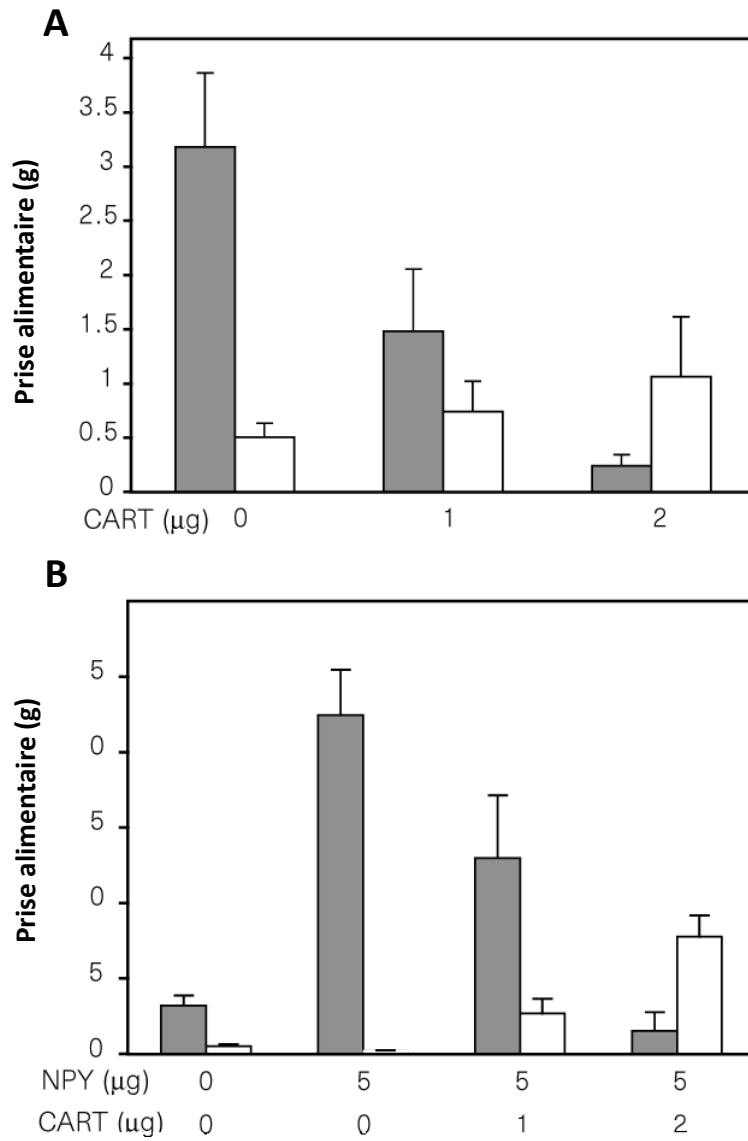


Figure 6. Effet d'une injection ICV du peptide CART sur la prise alimentaire

- (A) Mesure de la prise alimentaire chez des rats, 1h (gris) et 2h (Blanc) après une injection ICV du peptide CART.
- (B) Mesure de la prise alimentaire chez des rats recevant différentes quantités de peptide CART suivies de 5 μg de NPY

Issue de la publication de Lambert et al., 1998

AgRP : *Agouti-related protein*; NPY : *neuropeptide Y*; CART : *Cocaine and amphetamine regulated transcript*;

nom « *cocaine and amphetamine regulated transcript* » (CART) (Douglass, McKinzie, and Couceyro 1995). Ce peptide a été détecté dans l'ARC, le LHA, le PVN et le noyau accumbens (Acb). Des études ont montré que des animaux privés de nourriture présentaient une diminution prononcée de l'expression de l'ARNm de CART dans l'ARC (Kristensen et al. 1998), (Kask et al. 2000) mettant en évidence son rôle dans la régulation de l'homéostasie énergétique. De plus, l'expression de CART est régulée par plusieurs hormones peptidiques périphériques impliquées dans la régulation de l'appétit, telles que la leptine (Kristensen et al. 1998) et la cholécystokinine (CCK) (de Lartigue et al. 2007) qui potentialisent son action alors que la ghréline inhibe son expression (de Lartigue et al. 2007).

Des injections ICV de différents fragments peptidiques de CART chez des rats ont diminué la prise alimentaire seule ou après une injection de NPY (Lambert et al. 1998) (**Figure 6**) confirmant l'existence d'interactions fonctionnelles entre le CART et le NPY. De plus, des injections chroniques de CART au niveau du ventricule latéral chez le Rat ont inhibé la prise alimentaire et la prise de poids chez les animaux maigres et obèses (Larsen et al. 2000). Des résultats similaires ont été retrouvés après l'administration directe de CART dans le 3V (Abbott et al. 2001), (Aja et al. 2001). L'administration ICV de CART est associée à une diminution des taux plasmatiques d'insuline et de leptine et à une augmentation de l'oxydation des lipides, deux facteurs qui limitent le stockage des graisses (Rohner-Jeanraud et al. 2002).

Cependant, d'autres études ont montré une augmentation de l'apport alimentaire suite à l'injection directe de CART dans le VMH, l'ARC, le PVN, l'LHA, le DMH et le noyau supra-optique (Abbott et al. 2001). Par conséquent, la régulation de l'appétit par le CART est un processus complexe et il est probable que le système CART soit régulé différemment selon les zones centrales considérées. De ce fait, le CART pourrait activer deux circuits indépendants de l'appétit au niveau central, l'un anorexigène et l'autre orexigène. Néanmoins, des études complémentaires restent à être réalisées pour confirmer cette hypothèse.

Afin d'établir un certain équilibre entre les apports et les dépenses énergétiques, les axones de l'ensemble des neurones hypothalamiques projettent des afférences vers d'autres noyaux hypothalamiques tels que le LHA, le PVN, le VMH, mais aussi dans des structures centrales plus éloignées comme le noyau parabrachial (PBN), l'amygdale ou encore le NTS qui vont être capables de détecter des signaux du SNC et de la périphérie et de jouer un rôle dans la composante hédonique.

I.1.3. Noyaux de second ordre

I.1.3.1. Noyau ventromédian de l'hypothalamus

Différentes expériences lésionnelles au niveau des noyaux ventromédians de l'hypothalamus (VMH) ont montré que la destruction des corps cellulaires entraînait une hyperphagie et une augmentation de la prise de poids corporel chez le Rongeur (Hetherington and Ranson 1942), (Brobeck 1946), (Kennedy Gilbert and Parkes Alan Sterling 1950), (Anand and Brobeck 1951), (Shimizu et al. 1987). A *contrario*, une micro-injection d'urocortine, un puissant peptide anorexigène, dans le VMH, a inhibé la prise alimentaire (Ohata et al. 2000). De ce fait, le VMH a été considéré comme le premier « centre de la satiété » (Kennedy Gilbert and Parkes Alan Sterling 1950), (King 2006).

L'une des fonctions principales du VMH est de moduler le métabolisme du glucose en activant les mécanismes de contre-régulation en réponse à l'hypoglycémie. En effet, après des injections de glucose radioactivement marqué, les niveaux de radioactivité étaient plus élevés dans le VMH (J Panksepp 1972), (Jaak Panksepp 1973) alors qu'une perfusion avec un inhibiteur compétitif du glucose chez le Chat a diminué son activité (Desiraju, Banerjee, and Anand 1968). Le VMH réponds à ces variations de concentrations de glucose à l'aide de deux types de neurones glucosensibles distincts : les neurones stimulés par le glucose et inhibés par l'hypoglycémie dits neurones « gluco-excités » et les neurones inhibés par le glucose et stimulés par l'hypoglycémie dits neurones « gluco-inhibés » (Song et al. 2001). Mais la sensibilité de ces neurones « gluco-excités » peut être réduite par l'insuline dont l'action est dépendante de la concentration de glucose et dont les récepteurs sont présents dans le VMH (Cotero and Routh 2009). En agissant de la même manière *via* le récepteur LepR, la leptine est également capable de moduler l'activité de ces neurones mais de façon indépendante au glucose (Irani et al. 2008).

Par ailleurs, la particularité du VMH est d'être liée par des afférences à plusieurs autres sites hypothalamiques impliqués dans le contrôle du comportement alimentaire tels que les neurones à NPY/AgRP et à POMC/CART, mais aussi d'être constitué de neurones exprimant le MC4-R (Kishi et al. 2003) et le MC3-R (Begrache, Sutton, and Butler 2011). Une étude antérieure a montré que le MC4-R régulait l'expression du facteur « *brain-derived neurotrophic factor* » (BDNF) (Nicholson et al. 2007), un facteur neurotrophique surexprimé dans le VMH et produit par les neurones *steroidogenic factor 1* (SF1) spécifiques du VMH. Le BDNF joue un rôle majeur dans le contrôle de l'appétit en diminuant la prise alimentaire (Unger et al. 2007), (Chuanfeng Wang et al. 2010).

De plus, l'action de la leptine sur ce noyau joue un rôle important dans la réduction du poids corporel (Dhillon et al. 2006) dans la mesure où les souris *knock-out* pour le LepR développent une obésité et

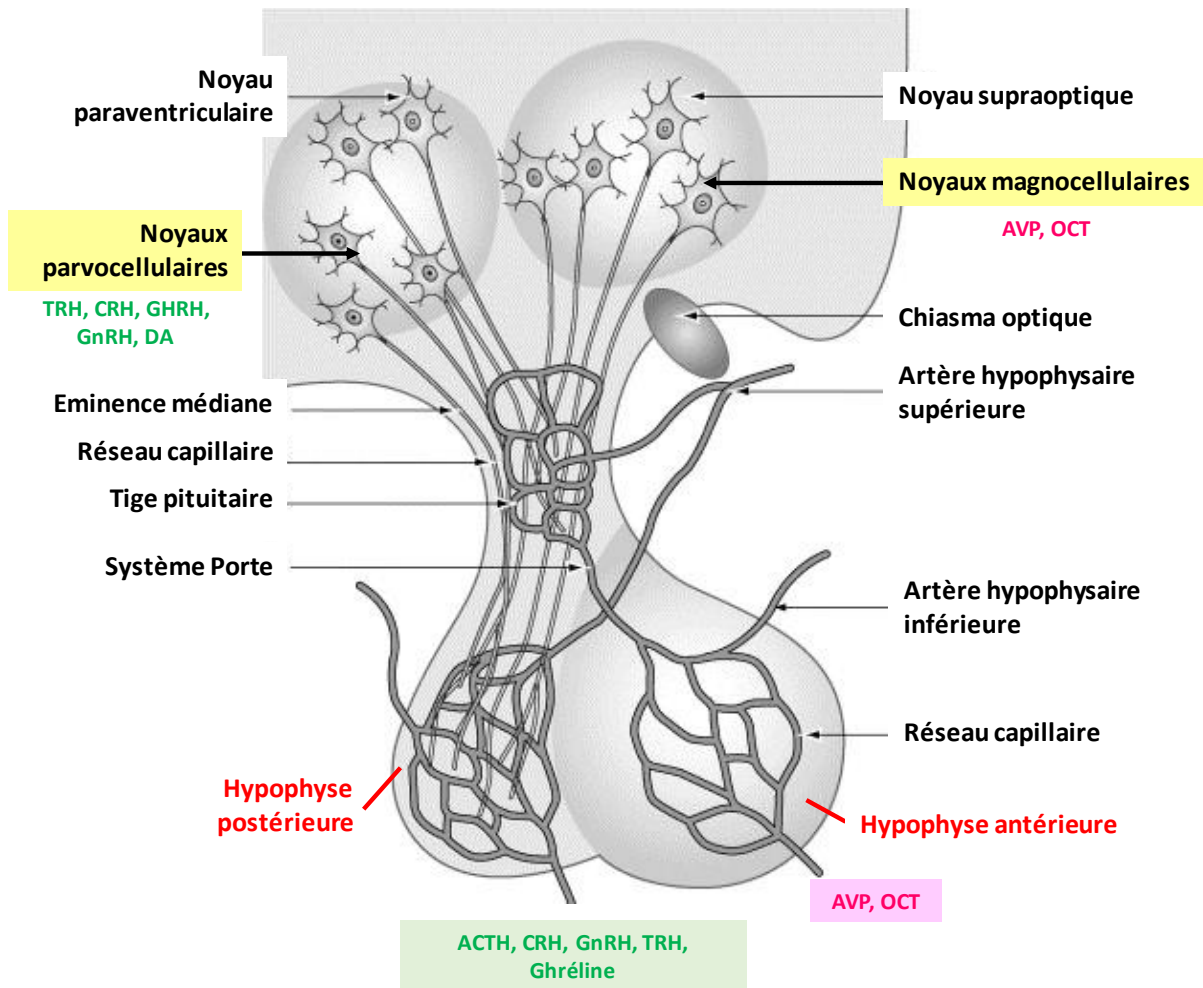


Figure 7. Implication du PVN dans la régulation des dépenses énergétiques de l'organisme via le complexe hypothalamo-hypophysaire.

Les neurones sécrétoires magnocellulaires de l'hypothalamus sécrètent deux neurohormones (l'OCT et la AVP). Ces neurones sont composés d'axones qui s'étendent vers la tige pituitaire jusqu'au lobe postérieur de l'hypophyse permettant la libération des neurohormones dans la circulation sanguine.

Le lobe antérieur est lui contrôlé par les neurones sécrétoires parvocellulaires. Ces derniers sécrètent des hormones hypophysiotropes (ACTH, CRH, GnRH, GHRH) dans un réseau de capillaires sanguins spécifique, le système porte hypothalamo-hypophysaire qui se prolonge le long de la tige pituitaire et se ramifie dans le lobe antérieur. Les hormones hypophysiotropes se fixent alors aux récepteurs présents à la surface des cellules de l'hypophyse ce qui permet d'activer ou d'inhiber la sécrétion d'hormones (ACTH, CRH, GnRH, TRH, Ghréline) dans la circulation sanguine.

Adaptée de l'illustration de Ducornet et al., 2005

OCT : ocytocine; AVP : vasopressine; TRH : thyrotropin-releasing hormone; CRH : corticotropin-releasing hormone; GHRH : Growth Hormon Releasing Factor; GnRH : gonadotropin releasing hormone; DA : dopamine; ACTH : adreno cortico trophic hormone;

présentent un syndrome métabolique comprenant une stéatose hépatique, une dyslipidémie et une hyperleptinémie (Bingham et al. 2008).

1.1.3.2. Noyau paracentriculaire

Dans les années 80, similairement pour le VMH, des expériences lésionnelles à l'intérieur et autour du noyau paraventriculaire (PVN) ont induit une hyperphagie et une augmentation du poids corporel chez les rats mâles et femelles (Leibowitz, Hammer, and Chang 1981), (Sims and Lorden 1986). Cette étude a souligné le rôle du PVN dans le contrôle de l'alimentation et justifié son appellation initiale de « centre de la satiété » après le VMH.

Considéré comme un véritable centre intégrateur, le PVN communique par le biais d'afférences avec l'ARC, le VMN, le LHA mais tout particulièrement avec le NTS qui reçoit des informations de la périphérie *via* le nerf vague et permet d'évaluer le statut énergétique de l'organisme.

Le PVN est composé de deux populations neuronales : les neurones dits magnocellulaires (qui projettent leurs axones vers l'hypophyse et le système sanguin) et les neurones parvocellulaires (qui projettent leurs axones vers un réseau de capillaires sanguins appelés le système porte hypothalamo-hypophysaire), (Ferguson, Latchford, and Samson 2008) (**Figure 7**). Ces neurones sont capables de sécréter plusieurs hormones : l'ocytocine (OCT), la vasopressine (AVP), l'hormone anti-diurétique (ADH), la CRH, la TRH, la *gonadotropin releasing hormone* (GnRH), la *growth hormone releasing factor* (GHRH) et enfin la dopamine (DA) (Vettor et al. 2002) qui se retrouvent au niveau de la circulation systémique et modulent les dépenses énergétiques de l'organisme.

Par ailleurs, similairement au VMH, le noyau PVN a également la particularité d'exprimer les deux types de récepteurs aux mélanocortines MC3-R et MC4-R (Singru et al. 2007). De ce fait, l' α -MSH, le BDNF (ChuanFeng Wang et al. 2007) et les hormones sécrétées par le complexe hypothalamo-hypophysaire, tels que la CRH et la TRH sont aussi des médiateurs dans la transduction des réponses satiétogènes liée à l'activation du MC4-R (Nicholson et al. 2007), (Lu et al. 2003), (Kim et al. 2000).

1.1.3.3. Noyau dorsomédian de l'hypothalamus

Comme pour le VMH et le PVN, ce sont des études lésionnelles et d'électrostimulations qui ont mis en évidence l'implication du noyau dorsomédian de l'hypothalamus (DMH) dans la régulation de la prise alimentaire (Bellinger and Bernardis 2002). En effet, des lésions au niveau du DMH ont induit une hypophagie avec un retard de la prise de poids lorsque les rats étaient soumis à un régime riche en graisse (Bellinger and Bernardis 2002). De plus, les neurones du DMH expriment les récepteurs Y1 et Y5 (Sheng Bi, Kim, and Zheng 2012) qui sont des cibles des neurones NPY provenant de l'ARC *via* des

projections neuronales des neurones à POMC/CART et à NPY/AgRP. Mais, le DMH exprime aussi indépendamment le peptide NPY (S. Bi et al. 2001) et des récepteurs LepR (Rezai-Zadeh et al. 2014). Cependant, contrairement à la coexpression des ARNm du NPY et du LepR dans l'ARC, les neurones exprimant l'ARNm du NPY et du LepR ne sont pas exprimés dans les mêmes neurones au sein du DMH (Sheng Bi, Robinson, and Moran 2003). L'expression génique de NPY est donc régulée de manière différenciée dans l'ARC et dans le DMH.

Le DMH est régulé par d'autres neuropeptides impliqués dans la régulation de la prise alimentaire telles que la CCK (Zhu et al. 2012) et l'ORX A (Pinos et al. 2011).

De plus, le DMH est impliqué avec le VMH dans la régulation de la glycémie par la présence de neurones gluco-sensibles (Zhu et al. 2012).

1.1.3.4. Aire hypothalamique latérale

Historiquement, l'aire hypothalamique latérale (LHA) était considérée comme le « centre de la faim » car les études lésionnelles réalisées dans les années 50 ont révélé un phénotype hyperphage et une prise de poids anormale chez l'Animal (Brobeck 1946), (Anand and Brobeck 1951), (Bernardis and Bellinger 1996).

Similairement aux autres noyaux hypothalamiques, la LHA possède des afférences lui permettant d'être connectée aux autres régions cérébrales impliquées dans la régulation de la prise alimentaire et ainsi assurer le maintien de l'homéostasie énergétique. Cette régulation est rendue possible par la synthèse de neuropeptides orexigènes distincts : la MCH et les ORX A et ORX B (Valassi, Scacchi, and Cavagnini 2008). En effet, une perfusion ICV chronique de la MCH (Gomori et al. 2003) ou une surexpression de MCH (Ludwig et al. 2001) a entraîné une augmentation du poids corporel des souris. Plus récemment, l'ablation ciblée des neurones à MCH a entraîné une hypophagie chez la Souris (Alon and Friedman 2006) et une résistance à l'obésité (MacNeil 2013).

Contrairement à la MCH, le rôle des ORX dans la régulation du comportement alimentaire est moins établi. D'une part, certaines études ont montré que les ORX pouvaient être à l'origine d'une stimulation de l'appétit (Sakurai et al. 1998) mais aussi de la température corporelle (Yoshimichi et al. 2001) et que leurs taux dans l'hypothalamus étaient deux à cinq fois moins élevés que ceux de la MCH (Mondal, Nakazato, and Matsukura 2002). D'autre part, l'administration centrale d'ORX a montré être capable de stimuler la prise alimentaire (Sakurai et al. 1998) alors que les taux d'ARNm de ce peptide étaient surexprimés lors du jeun (Sakurai et al. 1998). Par ailleurs, l'LHA est également impliquée dans la régulation de la glycémie grâce à sa sous population de neurones gluco-sensibles exprimant le NPY (Marston et al. 2011).

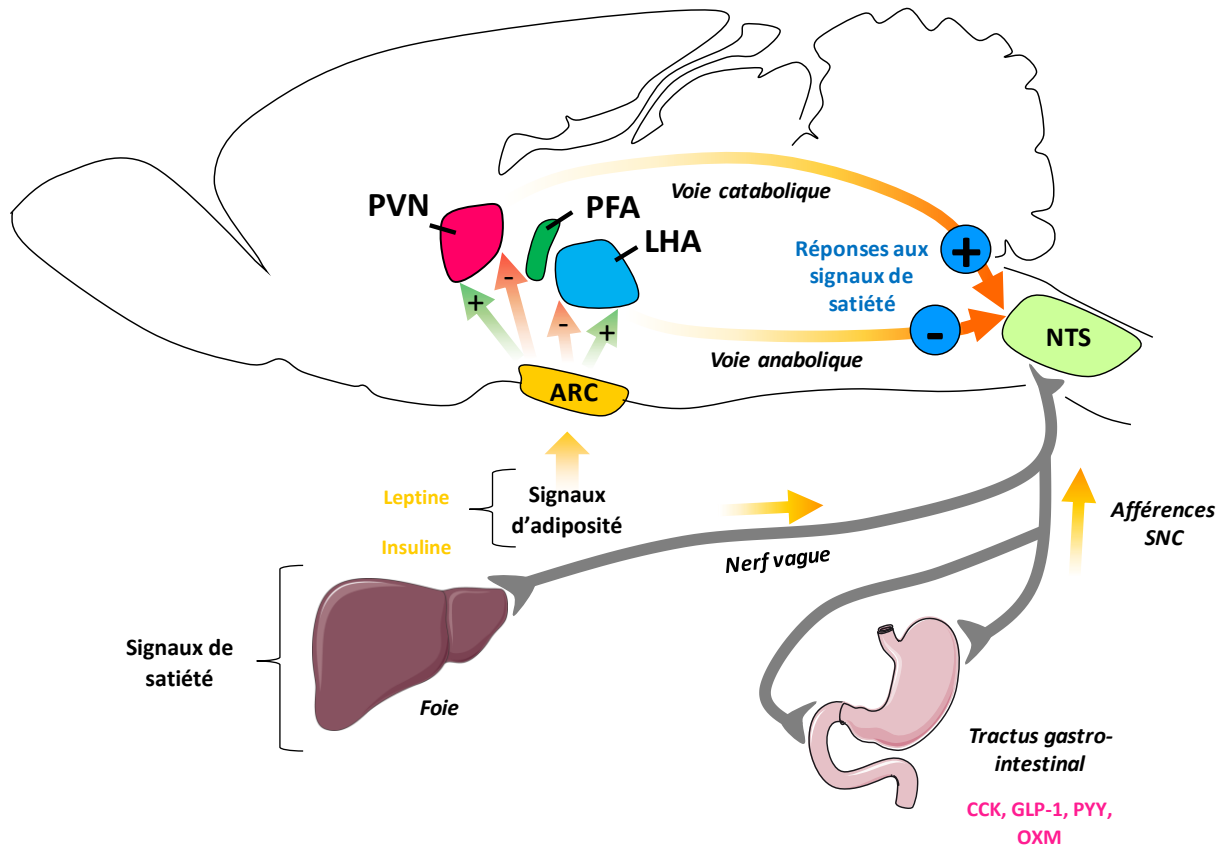


Figure 8. Modèle neuroanatomique des voies par lesquelles les signaux périphériques interagissent avec les circuits centraux autonomes régulant l'appétit.

Le PVN, l'LHA et le PFA établissent des liens avec des voies autonomes centrales (cataboliques et anaboliques) qui projettent vers le NTS et qui traitent les signaux de satiété. Les signaux satiétogènes provenant du foie et du tractus gastro-intestinal sont principalement transmis par le nerf vague et les fibres sympathiques jusqu'au NTS.

Adaptée de la publication de Schwartz et al., 2000

PVN : noyau paraventriculaire; LHA : aire hypothalamique latérale; PFA : région périfornique; NTS : noyau du tractus solitaire; ARC : noyau arqué; SNC : système nerveux central; CCK : cholécystokinine; GLP-1 : *glucagon-like peptide 1*; PYY : peptide YY; OXM : *oxymodulin*

I.2. REGIONS EXTRA-HYPOTHALAMIQUES

Les noyaux hypothalamiques se projettent également vers d'autres régions du cerveau extra-hypothalamiques impliquées dans les mécanismes de l'appétit tels que le NTS et les régions hédoniques de la prise alimentaire. Cette dernière comprend : la région tegmentale ventrale (ATV), le noyau accumbens (Acb), l'amygdale (Amg), le cortex préfrontal (CPF), l'hippocampe, le pallidum ventral (PV) et le noyau parabrachial (PBN).

I.2.1. Noyau du tractus solitaire

Le noyau du tractus solitaire (NTS) détecte les signaux de satiété d'origine gastro-intestinale, qu'il s'agisse de signaux hormonaux, neuronaux mais aussi ceux liés aux nutriments eux-mêmes (Grill and Hayes 2012), (Blouet and Schwartz 2012). Le NTS reçoit et envoie des projections sur la plupart des structures du SNC (Ter Horst et al. 1989). Il est considéré comme le « centre de convergence des signaux métaboliques ». De plus, par ses projections neuronales, le NTS constitue un relais d'informations des organes périphériques vers l'hypothalamus (**Figure 8**).

Par ailleurs, le NTS exprime le récepteur de la leptine (Mercer, Moar, and Hoggard 1998), des neurones à POMC (Bronstein et al. 1992) ainsi que le MC4-R (Mountjoy et al. 1994). Les effets de ce dernier sont comparables à ceux résultant de la signalisation mélanocortinergique dans le 3V (Schwartz, 2000) ce qui confirme le rôle du NTS dans l'homéostasie énergétique.

I.2.2. Régions impliquées dans la régulation hédonique

Si les neurones hypothalamiques sont capables de moduler la prise alimentaire et la balance énergétique de l'organisme, le fait de consommer de la nourriture ou d'arrêter de manger ne se résume pas aussi facilement à l'interprétation des signaux de satiété. En effet, s'alimenter constitue un besoin vital, mais c'est aussi un « plaisir ». C'est ce qu'on appelle la « composante hédonique » ou le « système de récompense ». Un dérèglement de ce système peut être responsable de troubles alimentaires comme les TCA ou une obésité (*cf* Chapitre 3, Partie A).

Une des zones importantes dans le système de récompense est l'ATV. Elle est constituée de neurones dopaminergiques (qui produisent la dopamine, un neurotransmetteur qui induit les sensations de plaisir lors d'un repas (Wise 2006)) qui vont projeter de nombreuses afférences sur d'autres zones du cerveau qui sont :

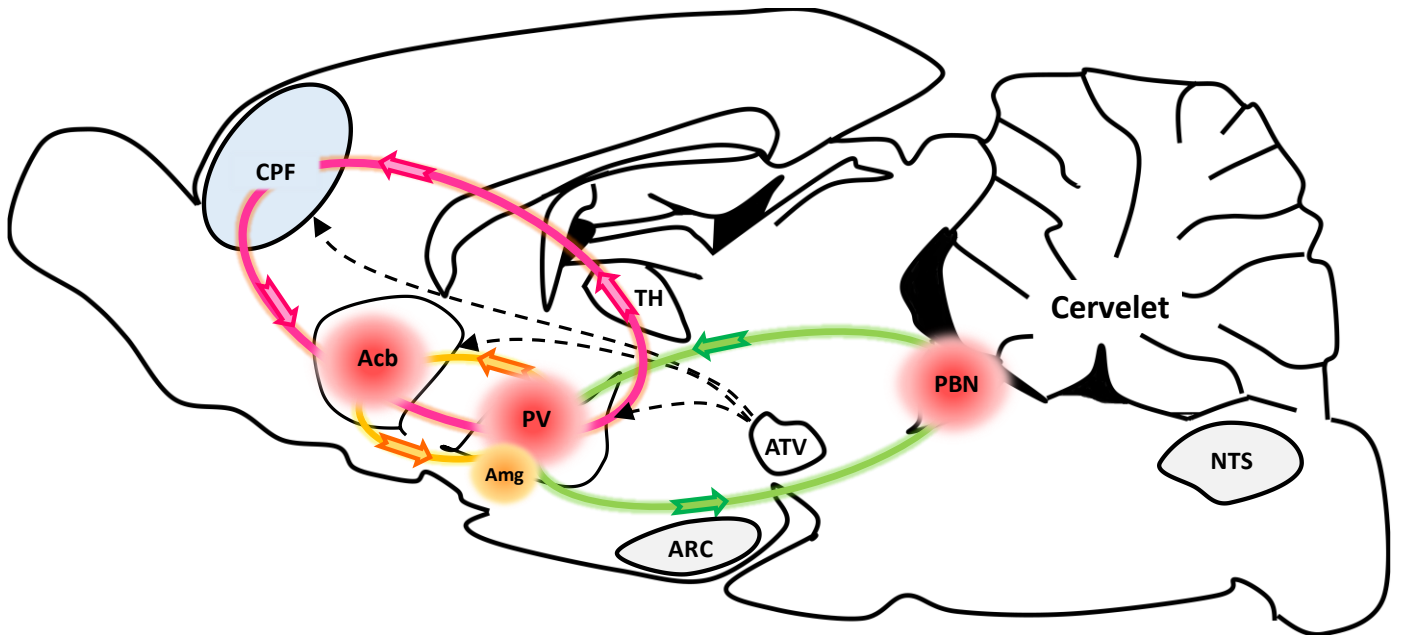


Figure 9. Circuits de la composante hédonique de la régulation du comportement alimentaire

L'ATV projette des afférences dopaminergiques (traits pointillés) vers l'Acb, le PV et le CPF (**rond rouge**) qui jouent un rôle prépondérant dans la composante hédonique. Cette dernière connecte les zones de l'Acb, du PV, du PBN et du CPF en boucles intégrées (en **orange, vert, rose**) pour indiquer des sensations de plaisir alimentaire qui sont dépendantes des qualités organoleptiques de l'aliment.

Illustration inspirée de la publication Pecifia et al.; 2006

CPF : cortex préfrontal; Acb : noyau accumbens; PV : pallidum ventral; Amg : Amygdale; TH : thalamus; ATV : aire tegmentale ventrale; ARC : noyau arqué; PBN : noyau parabrachial; NTS : noyau du tractus solitaire.

- L'amygdale (Amg), le centre des émotions (signal de danger, présence de nourriture etc.) (Weymar and Schwabe 2016);
- Le noyau accumbens (Acb) qui a un rôle dans les composantes affectives, d'apprentissage et de motivation (Salamone et al. 2007) ;
- Le cortex préfrontal (CPF) qui joue un rôle dans l'élaboration de la pensée, des émotions, dans la planification des actions et de la motivation (Kringelbach 2005) ;
- L'hippocampe qui permet la mise en mémoire d'un évènement et son association avec une sensation agréable ou non (Opitz 2014) ;
- Le noyau parabrachial (PBN) qui régule le goût, la respiration, la sensibilité thermique et serait responsable d'aversion alimentaire en cas d'intoxication alimentaire.

Depuis les années 2000, les recherches ont mis en évidence que certaines de ces structures faisaient partie ou étaient interconnectées avec de petites structures appelées « hotspots » (Peciña, Smith, and Berridge 2006) localisées dans le PBN, le Acb et le PV. Ce lien complexe entre ces régions est l'origine de la composante hédonique de la prise alimentaire (K. S. Smith and Berridge 2007), (Russo and Nestler 2013), (**Figure 9**).

I.3. REGULATION PERIPHERIQUE DE LA PRISE ALIMENTAIRE

L'homéostasie énergétique de l'organisme est maintenue par un réseau complexe de signaux périphériques ayant pour but d'indiquer le statut nutritionnel de l'organisme aux organes susceptibles de développer une réponse adaptée. Les principaux signaux qui participent à la régulation à court et long terme de la régulation de la prise alimentaire sont présentés dans la **Figure 10** (*page suivante*) puis développés et décrits dans les paragraphes suivants.

I.3.1. Peptides orexigènes

I.3.1.1. Ghréline

La ghréline est un peptide entéro-endocrinien acylé de 28 aa, principalement produit dans l'estomac (Kojima et al. 1999). Elle a été découverte comme ligand endogène pour le récepteur du secrétagogue 1 de l'hormone de croissance (GHS-R1) (Kojima et al. 1999). La majorité de la ghréline circulante est synthétisée et sécrétée par les cellules endocrines gastriques de type X/A (ou de type P/D1 chez les humains) localisées principalement dans les glandes oxyntiques de la muqueuse gastrique (Sakata et al. 2002). Cependant, malgré des rôles biologiques très diversifiés (Muccioli et al. 2002), la plupart des recherches sur la ghréline se sont concentrées sur ses propriétés orexigènes et adipogènes. Première hormone identifiée pour stimuler la prise de nourriture (Date et al. 2000), elle a été rapidement

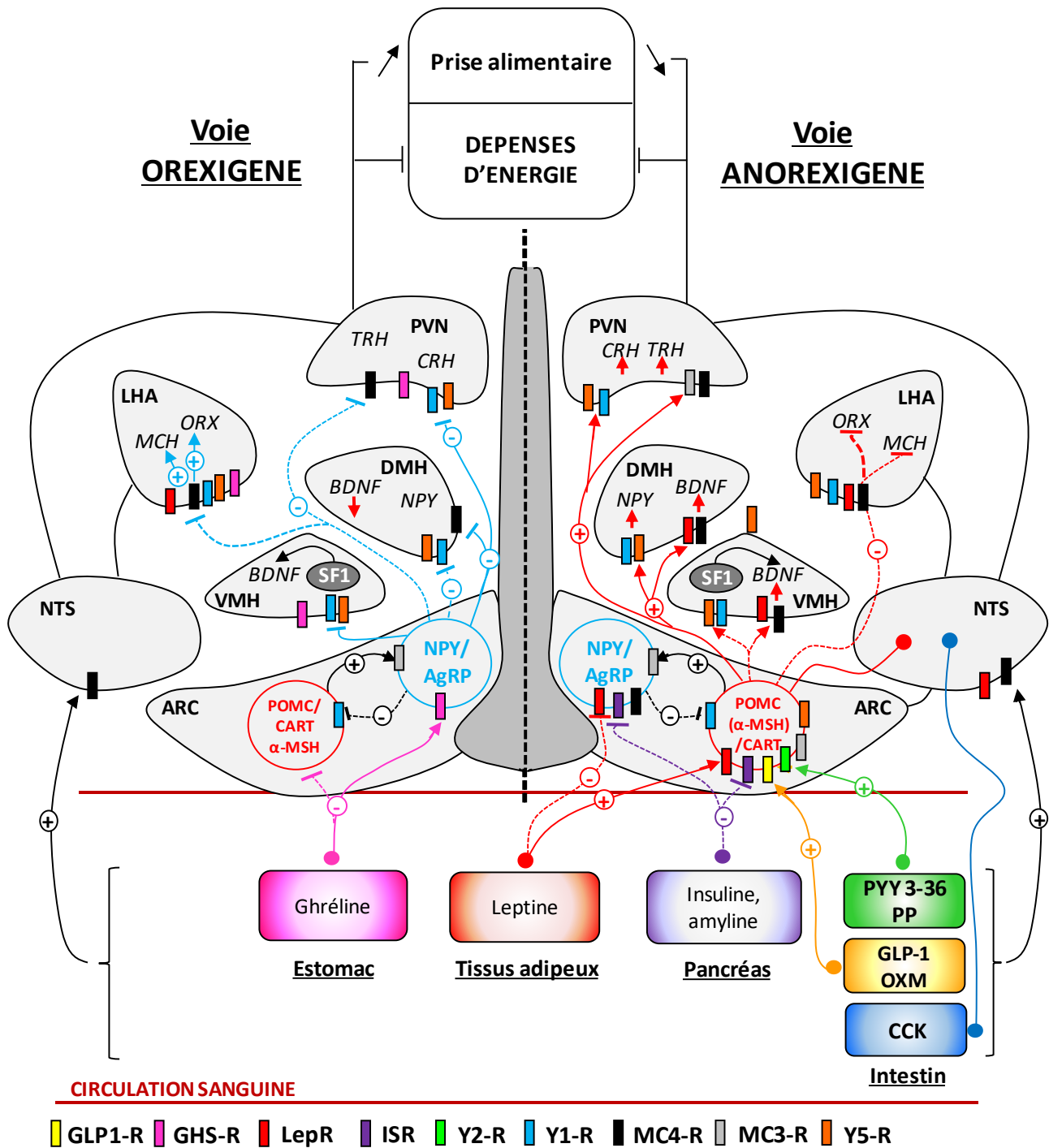


Figure 10. Schéma de l'hypothalamus illustrant les voies neuronales qui stimulent l'appétit et réduisent les dépenses énergétiques (voie orexigène) ou qui inhibent l'appétit et augmentent les dépenses énergétiques (voie anorexigène)

ARC : noyau arqué; VMH : noyau ventromédial; DMH : noyau dorsomédial; LHA : aire hypothalamique latérale; PVN : noyau paraventriculaire; GLP1-R : Récepteur du *glucagon-like peptide 1*; GHS-R : *growth hormone secretagogue receptor*; LepR : récepteur de la leptine; ISR : *Insulin receptor substrate*; Y2-R : Récepteur Y2; Y1-R : Récepteur Y1; MC3-R : *Melanocortin 3 receptor*; OXM : Oxymoduline; PYY : Peptide YY; CCK : Cholécystokinine; CRF : *Corticotropin-releasing hormone*; TRH : *Thyrotropin-releasing hormone*;

MCH : *Melanin-concentrating hormone*; NPY : neuropeptide Y; AgRP : *Agouti-related protein*; POMC : Pro-opiomélanocortine; CART : *Cocaine and Amphetamine-Related Transcript*; α-MSH : *α-melanocyte stimulating hormone*; MC3-R : Récepteur mélanocortine de type 3; PP : Polypeptide pancréatique

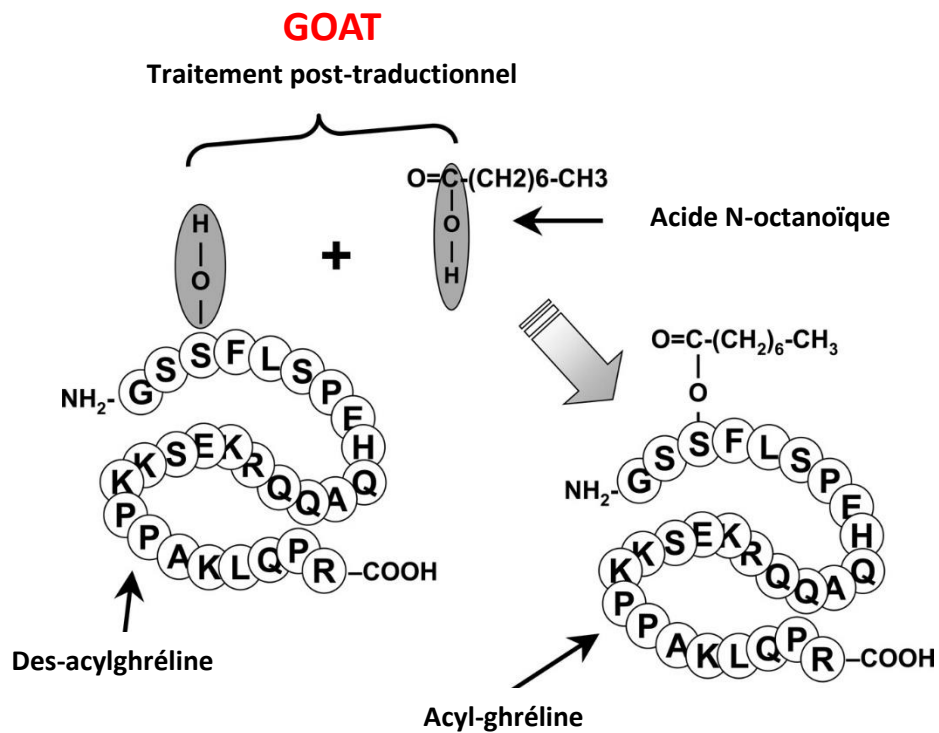


Figure 11. Acylation de la ghréline

Un groupe hydroxyle de la sérine en position 3 de la molécule de ghréline sous sa forme désacylée est octanoylé par l'action de l'enzyme GOAT. L'ajout de ce groupe transforme la molécule sous sa forme acylée.

Adapté de la publication de Van der Lely et al., 2004

GOAT : O-Acyltransférase

considérée comme « l'hormone de la faim ». En effet, les concentrations plasmatiques de ghréline étaient plus élevées avant chaque repas ou lors d'un jeun (Tschöp, Smiley, and Heiman 2000), (D. E. Cummings et al. 2001), (le Roux et al. 2005).

Par ailleurs, une injection de ghréline par voie intraveineuse (IV) (5,0pmol/kg/min) chez l'humain (Wren, Seal, et al. 2001) ou par voie périphérique chez le rongeur (Tschöp, Smiley, and Heiman 2000) a induit une augmentation de la prise alimentaire. Des observations similaires ont mis en évidence après une administration centrale de la ghréline (Wren, Small, et al. 2001), (A. Asakawa et al. 2001), (Nakazato et al. 2001) associée également à une augmentation des niveaux d'ARNm de NPY et d'AgRP (Kamegai et al. 2001). D'autres études ont montré que les concentrations de ghréline étaient négativement corrélées avec l'indice de masse corporelle (IMC) et une obésité (Shiyya et al. 2002), (Tschöp et al. 2001), (English et al. 2002). Chez les patients atteints d'anorexie mentale (AN), les concentrations de ghréline sont élevées mais redeviennent normales après une récupération partielle de poids. Ces observations suggèrent une dérégulation des voies réactives à la ghréline (Nedvídková et al. 2003) dans la physiopathologie des TCA. Plus récemment, une revue a décrit le rôle de la ghréline sur les mécanismes de l'appétit, de l'anxiété ainsi que dans les troubles psychiatriques (Labarthe et al. 2014).

Au niveau plasmatique, deux formes majoritaires de ghréline sont retrouvées : la forme acylée de la ghréline (ou acyl-ghréline) qui, par son instabilité, est rapidement convertie en forme des-acylée (des-acyl ghréline) ou fragmentée (Harada et al. 2008).

c) Acyl-ghréline

La ghréline acylée se caractérise par rapport à la forme des-acylée, par un processus post-transcriptionnel additionnel entraînant l'acylation du peptide avec un acide n-octanoïque sur la sérine en position 3 (**Figure 11**). Cette acylation est générée par l'action de l'enzyme O-Acyltransférase (GOAT) (Gutierrez et al. 2008), (J. Yang et al. 2008) principalement exprimée dans l'estomac, les intestins et le pancréas (Gutierrez et al. 2008). D'autres études ont montré que cette acylation du résidu de sérine 3 dans la partie N-terminal de la ghréline est nécessaire à la liaison au GHS-R1 (Davenport et al. 2005), à son activité biologique et par conséquent sur la stimulation de la prise alimentaire (Bednarek et al. 2000), (Akihiro Asakawa et al. 2003). La préservation de la forme acylée de la ghréline dans la circulation apparaît donc comme un facteur clé pour maintenir son rôle dans la régulation de l'appétit et du bilan énergétique.

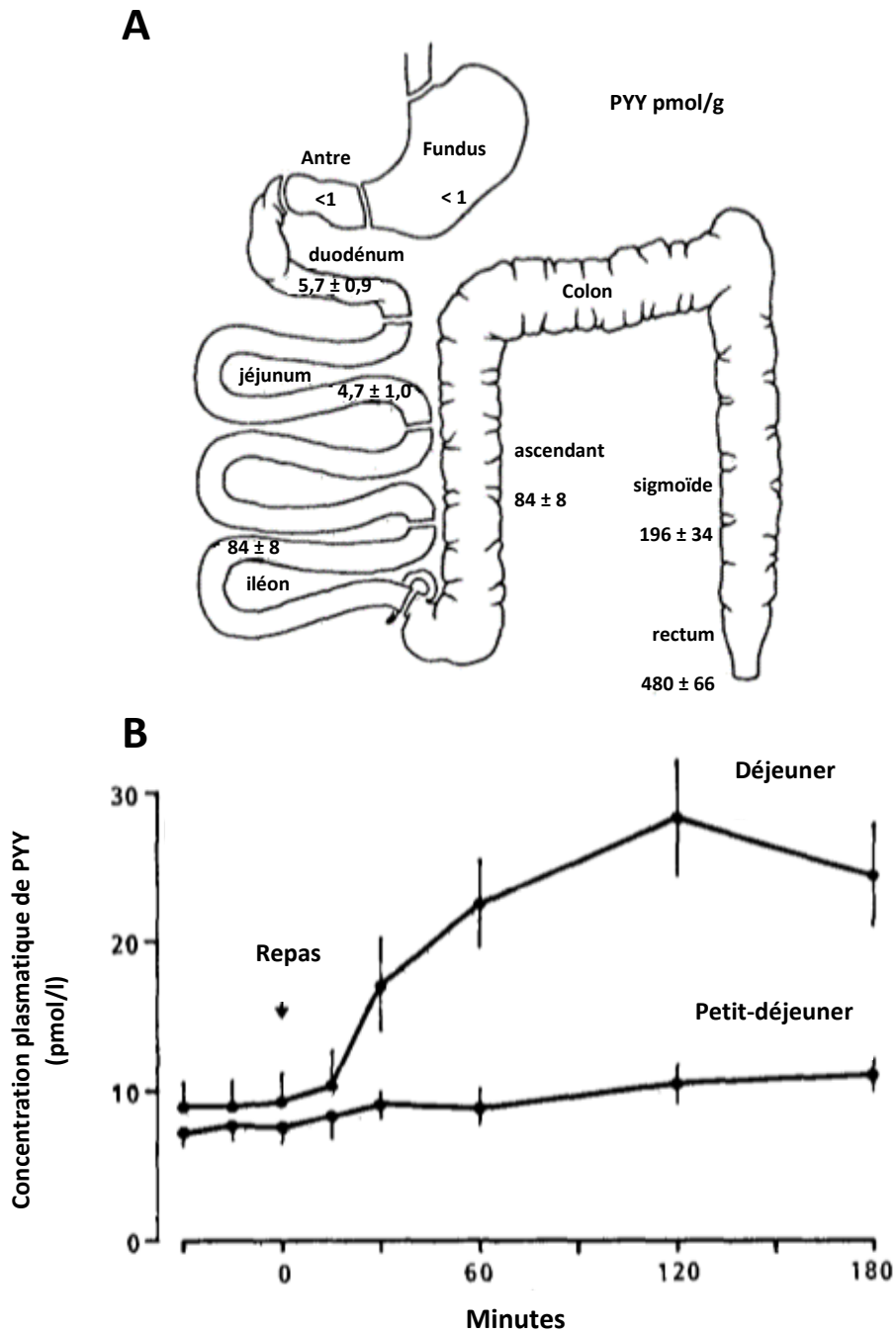


Figure 12. Distribution de PYY au sein du tractus gastro-intestinal humain et concentration plasmatique après un repas

- (A) Valeurs obtenues par un dosage radio immunologique. Les résultats sont exprimés en picomoles par gramme de poids humide.
- (B) Concentrations plasmatiques de PYY après l'ingestion d'un petit-déjeuner (530 kcal, n=10) et d'un déjeuner (870 kcal, n = 8) dans deux groupes distincts de sujets sains après un jeun d'au moins 8 h.

Issue de la publication de Adrian et al., 1985

PYY : Peptide YY

a) *Des-acylghréline*

La ghréline des-acylée est considérée comme un produit de dégradation de la ghréline mais sa concentration est 2,5 fois supérieure à celle de la ghréline acylée (Broglia et al. 2004). Elle serait incapable de se lier et d'activer physiologiquement le récepteur GHS-R1 à une dose inférieure au micromolaire (Gauna et al. 2007). Même si elle est peu étudiée, les recherches laissent penser que cette forme de ghréline pourrait également jouer un rôle dans la modulation de la faim et de la satiété. En effet, la co-injection de des-acylghréline et de ghréline administrées par voie intrapéritonéale (IP) chez le Rat a réduit l'effet orexigène de la ghréline sur la prise alimentaire (Inhoff et al. 2008) et son action semblerait indépendante du GHS-R (Fernandez et al. 2016). Toutes ces données suggèrent que la des-acylghréline est métaboliquement active et pourrait contrebalancer les effets de la ghréline acylée dans les mécanismes physiologiques de l'appétit. Cependant des recherches complémentaires sont nécessaires pour préciser le rôle de la des-acylghréline.

1.3.2. Peptides anorexigènes

1.3.2.1. *Peptide YY (PYY)*

Le peptide YY (PYY) est un peptide de 36 aa, qui a été isolé pour la première fois à partir de l'intestin grêle supérieur du porc (Tatemoto 1982a).

Par son homologie structurelle et fonctionnelle, il appartient à la même famille de peptides que le NPY et le polypeptide pancréatique (PP). Ce peptide est sécrété tout le long du tractus gastro-intestinal par les cellules L de l'iléon, du côlon et du rectum (Adrian et al. 1985) (**Figure 12A**). Des dosages radio-immunologiques ont mis en évidence que ce peptide existe sous deux formes endogènes, une forme dite « entière » : le PYY₁₋₃₆, et une forme « tronquée », le PYY₃₋₃₆ (Grandt et al. 1994). La forme PYY₃₋₃₆ est la principale forme circulante qui est générée par le clivage des résidus tyrosine et proline N-terminaux du PYY₁₋₃₆ par l'enzyme *dipeptidyl-peptidase IV* (DPP-IV) (Eberlein et al. 1989). Les deux formes sont bioactives mais ont une affinité différente pour la famille des récepteurs Y. Le PYY₁₋₃₆ a une affinité pour les Y1, Y2, Y4, Y5 et Y6-R, tandis que le PYY₃₋₃₆ se lie avec une plus grande affinité pour le Y2-R (Grandt et al. 1992), (Dumont et al. 1995) fortement exprimé par les neurones NPY de l'ARC, inhibant ainsi la prise de nourriture (Suzuki, Jayasena, and Bloom 2011). Ce résultat corrobore avec une étude montrant que le PYY₃₋₃₆ induit un effet anorexigène plus puissant que celui de PYY₁₋₃₆ sur l'apport alimentaire chez le Rat (Chelikani, Haver, and Reidelberger 2004). En effet, après un repas, les premières études ont montré que les niveaux circulants de PYY₃₋₃₆ augmentaient en moins de 15min et atteignaient leur maximum de concentration plasmatique à 90min (**Figure 12B**) et restaient élevés

jusqu'à 6h (Adrian et al. 1985). Une série d'expériences sur les rongeurs ont confirmé les effets anorexigènes de PYY₃₋₃₆ : une injection périphérique de PYY₃₋₃₆ chez le Rat a entraîné une diminution de la prise alimentaire et du poids associée à une diminution de l'ARNm de *npv* hypothalamique (Rachel L. Batterham et al. 2002). Toutefois, l'injection de PYY chez des souris délétées pour le Y2-R n'a pas réduit la prise alimentaire ce qui indique que PYY a besoin de se fixer au Y2-R pour générer son effet anorexigène (Rachel L. Batterham et al. 2002).

Finalement, des dosages plasmatiques effectués chez l'Homme ont montré que les concentrations plasmatiques de PYY₃₋₃₆ libérées étaient proportionnellement inverses aux calories ingérées (Degen, 2005). Par conséquent, les personnes obèses présentent des taux de PYY₃₋₃₆ endogènes plus faibles alors que leurs prises alimentaires est augmentée (Batterham, 2003).

1.3.2.2. Polypeptide pancréatique (PP)

Le polypeptide pancréatique (PP) est un peptide de 36 aa appartenant à la famille des peptides « PP-fold ». Il est libéré sous contrôle vagal en période post-prandiale par les cellules F au niveau des îlots pancréatiques de Langerhans (Schwartz et al. 1978), (Khandekar et al. 2015). Ce polypeptide a été retrouvé en plus grande concentration chez les patients anorexiques (Fujimoto et al. 1997), (Uhe et al. 1992) par rapport aux sujets obèses (Zipf et al. 1981), (Glaser et al. 1988). De ces observations est né l'intérêt d'étudier son rôle dans le comportement alimentaire. Cependant, le mode d'action de PP sur les mécanismes de l'appétit reste encore assez controversé. En effet, une administration périphérique de PP diminue la consommation de nourriture chez le Chien (Akerberg et al. 2010) et chez l'Humain (R. L. Batterham et al. 2003), (Akihiro Asakawa et al. 2003) ; les effets peuvent persister durant 24h après la perfusion (R. L. Batterham et al. 2003). *A contrario*, l'administration centrale de PP stimule la prise de nourriture (Clark et al. 1984).

1.3.2.3. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1)

Le pro-glucagon est une pro-hormone de 160 aa produite dans les cellules α des îlots pancréatiques, les cellules L de l'intestin distal et dans le SNC. La protéolyse sélective post-traductionnelle du pro-glucagon par les pro-hormones convertases 1 et 2 entraîne la production d'un certain nombre de fragments biologiquement actifs : les deux formes de GLP-1 synthétisées sont les amides GLP-1₁₋₃₇ et GLP-1₁₋₃₆. Un clivage supplémentaire produit les fragments amides bioactifs GLP-1₇₋₃₇ et GLP-1₇₋₃₆. La principale forme bioactive en circulation du GLP-1 est la forme tronquée GLP-1₇₋₃₆ (Orskov et al. 1994). Elle est rapidement décomposée par la DPP-IV et a une demi-vie de 2 minutes (Kieffer, McIntosh, and Pederson 1995).

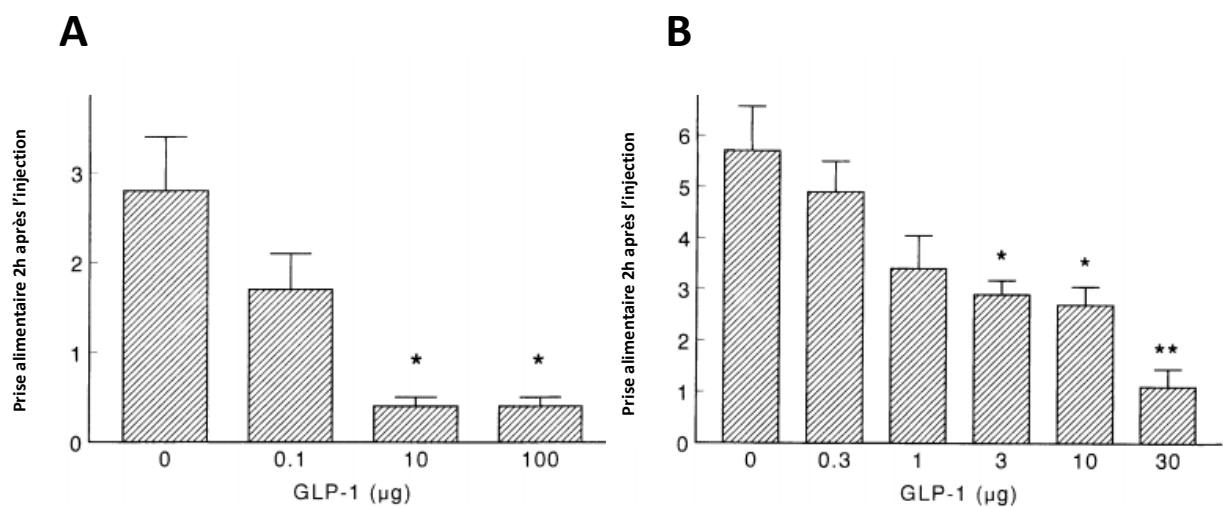


Figure 13. Effet du GLP-1 sur la prise alimentaire par une administration ICV

Réduction de prise alimentaire (A) sans ou (B) avec restriction alimentaire chez les rats, 2h après avoir reçu une injection ICV de GLP-1 ou de solution saline à 0,9% au début de la phase nocturne.

Issue de la publication de Turton al., 1996

ICV : injection intracérébroventriculaire; GLP-1 : *glucagon-like peptide 1*

Les différentes formes de GLP-1 sont libérées dans la circulation en période post-prandiale par les cellules L entéro-endocrines proportionnellement aux calories ingérées (Ghatei et al. 1983), (Roberge and Brubaker 1991), (Orskov et al. 1994).

Comme pour le PYY, le premier pic survient avant même que les nutriments n'aient atteint l'intestin, témoignant d'une probable stimulation vagale. Le second pic de sécrétion est probablement déclenché par la libération des acides gras alimentaires dans la lumière intestinale *via* l'activation des récepteurs couplés aux protéines G (Lauffer, Iakoubov, and Brubaker 2009), (Hirasawa et al. 2005).

La forme GLP-1₇₋₃₆ a un effet anorexigène. Des injections ICV répétées ou unique de GLP-1₇₋₃₆ chez le Rat ont entraîné une diminution de la prise alimentaire et du poids corporel (Turton et al. 1996), (Meeran et al. 1999) (**Figure 13A, B**). Des effets similaires ont été observés après des injections IV de GLP-1₇₋₃₆ chez des individus maigres ou en surpoids (Verdich et al. 2001).

1.3.2.4. Oxyntomoduline (OXM)

L'oxyntomoduline (OXM) est un peptide de 37 aa issu, comme le GLP-1, du clivage post-traductionnel du pro-glucagon dans les cellules intestinales (Dubrasquet, Bataille, and Gespach 1982). Son rôle est de contrôler négativement la sécrétion d'acide par les glandes oxyntiques de l'estomac (Dubrasquet, Bataille, and Gespach 1982). Comme le PYY et le GLP-1, l'OXM est libérée par les cellules L en réponse à l'ingestion d'aliments et proportionnellement à l'apport calorique. Elle atteint sa concentration maximale 30min après l'ingestion d'aliments (Le Quellec et al. 1992).

Des études ont montré que des injections d'OXM ICV, en IP chez le rongeur (C. L. Dakin et al. 2001 ; Catherine L. Dakin et al. 2004) ou par IV ou sous-cutanée (SC) chez l'Humain sain (Cohen et al. 2003) ou obèse (Wynne et al. 2006) respectivement, réduisaient la consommation d'aliments et augmentaient la dépense énergétique.

Par ailleurs, l'effet anorexigène de l'OXM est supprimé chez les souris GLP-1-R-*null* (récepteur GLP-1-R inactivé) (Baggio et al. 2004) suggérant que les effets de l'OXM sont médiés par le GLP-1-R.

Cependant, l'OXM a une affinité pour le GLP-1-R 50 fois plus faible que celle du GLP-1 et réduit pourtant la consommation alimentaire similairement (C. L. Dakin et al. 2001) ce qui suggère qu'elle puisse également agir sur un autre récepteur non identifié (Maida et al. 2008), (Scott et al. 2018).

1.3.2.5. Cholecystokinine (CCK)

La cholecystokinine (CCK) est un peptide de 33 aa identifié dans l'intestin du porc et initialement appelé « pancréozymine », en référence à son rôle stimulateur sur les enzymes pancréatiques et sur

la contraction de la vésicule biliaire (Ivy and Oldberg 1928), (Harper and Raper 1943), (Sayegh 2013). Découverte en 1973, cette hormone intestinale est également capable de diminuer la prise alimentaire et la taille des repas chez le Rat (Gibbs, Young, and Smith 1973) et chez l'Homme (Liddle et al. 1985). C'est une hormone libérée en période post-prandiale par les cellules I endocriniennes de l'intestin grêle (Polak et al. 1975) mais, qui est également exprimée au niveau central (Larsson and Rehfeld 1979). Différentes formes de CCK ont été détectées depuis sa découverte : CCK-5, -7, -8, -18, -22, -25, -33, -39, -58. Parmi elles, seules la CCK-8 et la CCK-58 ont été observées au sein du SNC (Sayegh 2013). Ces deux formes peuvent réduire la prise alimentaire après une injection IP chez le Rat (Goebel-Stengel et al. 2012).

L'action anorexigène de la CCK est dépendante de deux sous-types de récepteurs spécifiques : CCK-A et CCK-B. Le récepteur CCK-A est principalement exprimé dans le tractus gastro-intestinal, le foie, le pancréas, et les afférences vagales (Sayegh 2013) tandis que le récepteur CCK-B est prédominant dans le SNC (Hill et al. 1987). Le peptide se fixe sur ces récepteurs et active les cellules du nerf vagal (Corp et al. 1993) ce qui permet un transfert des signaux à l'hypothalamus vers le NTS et donc une réduction de la consommation de nourriture. L'effet satiétogène de CCK étant inhibé suite à une vagotomie abdominale ou gastrique (G. P. Smith et al. 1981) ceci confirme que les afférences vagales sont la voie prédominante de l'action de CCK.

1.3.2.6. Amyline

L'amyline est un peptide de 37 aa également appelé « polypeptide d'îlots amyloïde ». Ce peptide est co-localisé et co-sécrété avec l'insuline par les cellules β du pancréas (Westermarck et al. 1986). L'amyline semble diminuer l'apport alimentaire (Bhavsar, Watkins, and Young 1998), (Rushing et al. 2001) par la présence de récepteurs spécifiques localisés dans différentes zones du cerveau (Beaumont et al. 1993) mais aussi par des sites cérébraux dépourvus de barrière hémato-encéphalique, ce qui permet un accès direct à l'amyline circulante. Ce peptide agit aussi indirectement en ralentissant la vidange gastrique (Young et al. 1995). Elle semble également participer au contrôle physiologique de l'entrée des nutriments dans l'intestin grêle et ainsi avoir des effets inhibiteurs sur la sécrétion de glucagon (Gedulin, Rink, and Young 1997).

L'ensemble de signaux présentés précédemment sont des signaux dits à « courts-termes » car ils sont directement liés à la prise alimentaire et à sa durée. Mais un système de rétrocontrôle assurant la régulation de la prise alimentaire à long terme existe. Ce dernier met en avant l'existence de facteurs

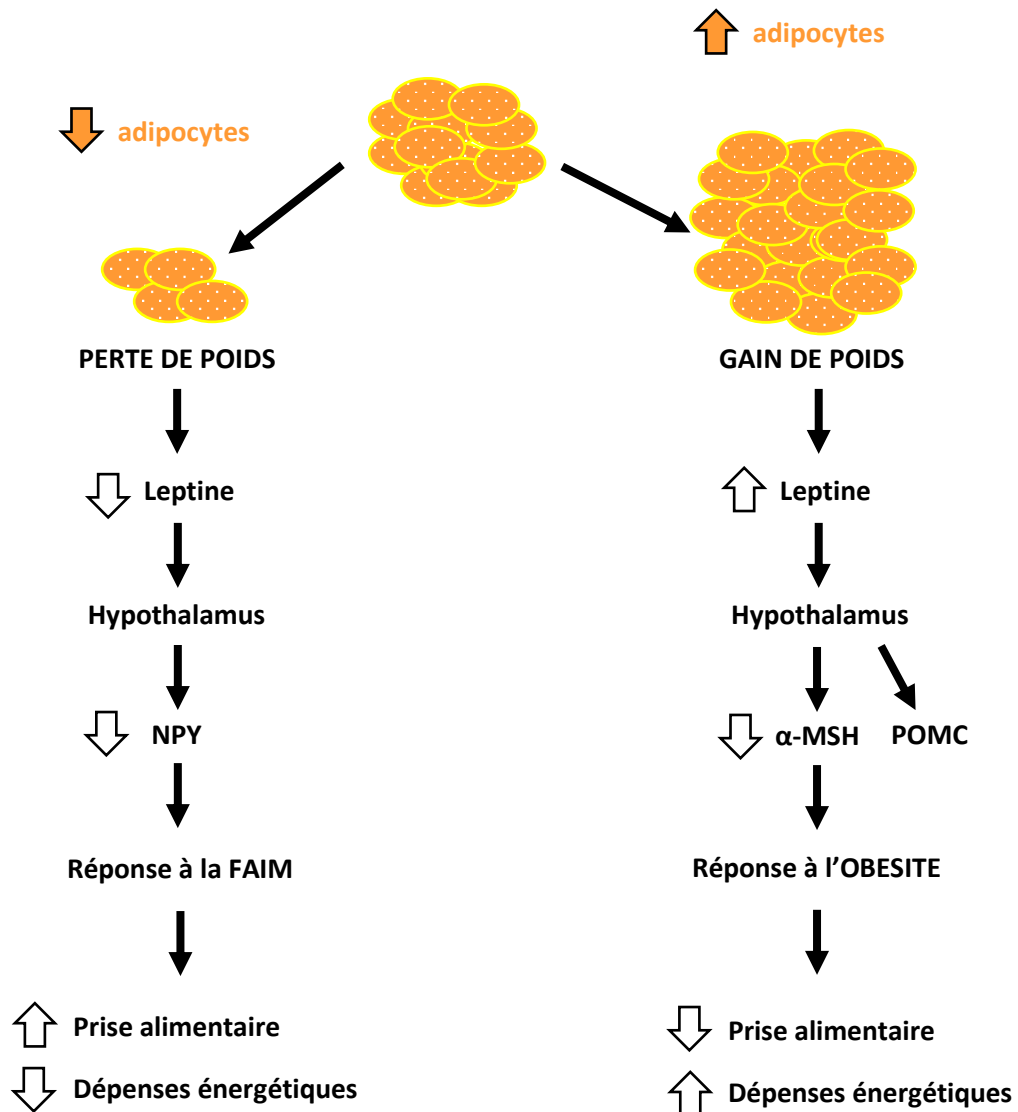


Figure 14. Mécanisme d'action de la leptine.

La leptine agit pour maintenir des réserves de graisse constantes. Une perte d'adiposité (restriction alimentaire) entraîne une diminution de la leptine, ce qui conduit à une diminution de l'action du NPY et des réponses métaboliques et endocriniennes anorexigènes. Inversement, une augmentation de l'adiposité entraîne une augmentation des niveaux de leptine avec une diminution des neurones à POMC et une perte d'appétit.

Illustration inspirée de la publication de Halaas et al., 1997

NPY : Neuropeptide Y; *Hormone*, POMC : Pro-opiomélanocortine; α -MSH : α -melanin-concentrating hormone

présents dans la circulation sanguine qui reflètent les réserves énergétiques du tissu adipeux afin de générer une réponse adaptée de l'hypothalamus : c'est le cas de la leptine et de l'insuline.

1.3.2.7. Leptine

Les expériences de parabiose de Hervey sur des rats rendus obèses par des lésions de VMH et celles menées par Coleman sur des souris génétiquement obèses (*ob/ob*) ont mis en évidence la surproduction d'un facteur qui réduit l'apport alimentaire (Hervey 1959), (Coleman 1973). Mais c'est seulement en 1994 que Zhang et ses collaborateurs ont identifié chez ces souris *ob/ob*, une mutation sur un gène codant pour la leptine, un peptide de 167 aa qui est exprimé majoritairement dans les cellules adipeuses (Y. Zhang et al. 1994).

L'administration de leptine a réduit l'apport alimentaire et le poids corporel chez les souris *ob/ob* (Campfield et al. 1995) en augmentant l'activité neuronale des neurones à POMC/CART et en diminuant celles des neurones NPY/AgRP (Sahu 2003) *via* des récepteurs spécifiques (LepR) (H. Chen et al. 1996), (Håkansson et al. 1998), (Balthasar et al. 2004). Par conséquent, en agissant sur les populations clés de la régulation de l'appétit, la leptine impliquait également la sécrétion de nombreux neurotransmetteurs anorexigènes (Figure 14).

De ce fait, son utilisation comme traitement de l'obésité a été rapidement envisagée, même si elle s'est rapidement avérée inefficace chez les individus obèses qui développent une résistance à la leptine. Cette « leptino-résistance » est expliquée par plusieurs mécanismes sous-jacents : un mauvais transport de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Caro et al. 1996), (Van Heek et al. 1997) et des défauts dans la transduction du signal de LepR (X. Zhang et al. 2008), (Münzberg, Flier, and Bjørbaek 2004).

Plus récemment, un nouveau mécanisme de passage de la leptine au niveau du cerveau a été décrit (Balland et al. 2014). Selon les auteurs, les tanocytes, des cellules qui s'étendent dans l'hypothalamus ont la capacité de capturer la leptine circulante et ainsi d'activer une voie de signalisation spécifique [*Extracellular signal-regulated kinases* (ERK)], qui permettrait la libération de la leptine dans le liquide céphalorachidien. Dans des cas pathologiques tels que l'obésité, les chercheurs ont constaté que les tanocytes n'étaient plus capables de libérer la leptine inhibant ainsi son action sur son récepteur (Balland et al. 2014). Ces découvertes ouvrent de nouvelles perspectives sur les mécanismes d'actions de la leptine et son éventuelle utilisation dans le traitement de l'obésité.

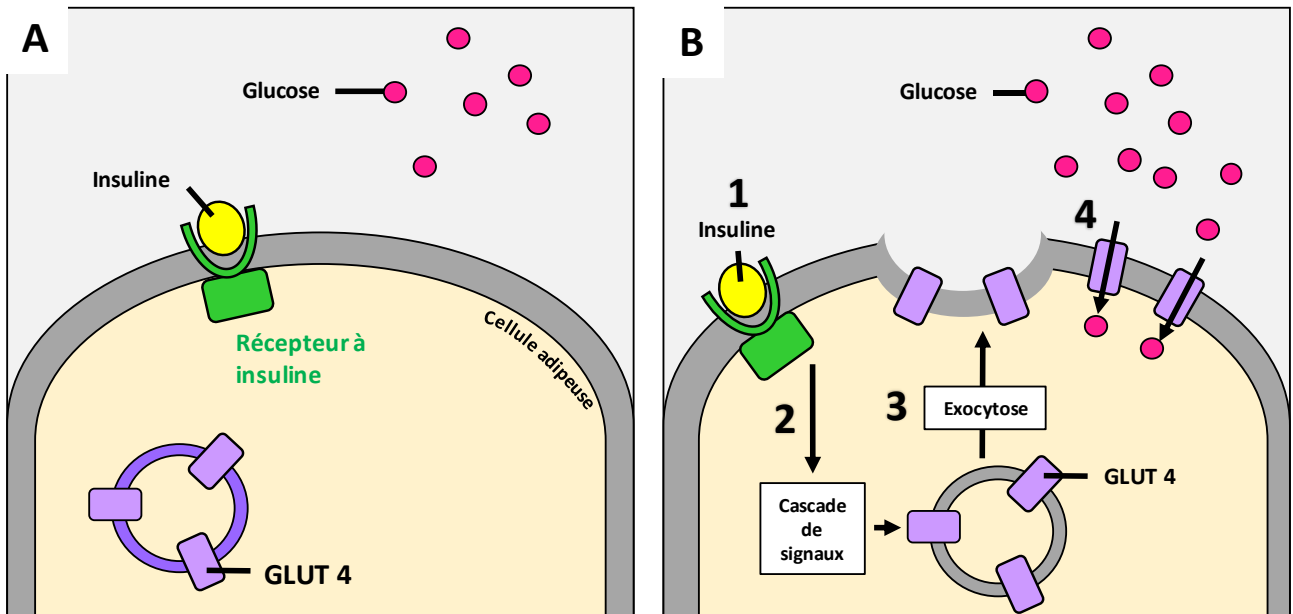


Figure 15. Mécanisme d'action de l'insuline sur la régulation du glucose *via* le transporteur GLUT 4

- (A) Quand la concentration d'insuline est faible, le transporteur insulino-dépendant spécifique du glucose : GLUT 4 est localisé dans des vésicules de stockage des cellules.
- (B) Quand le niveau de glucose circulant est élevé, l'insuline est libérée en plus grande concentration ce qui augmente la synthèse de GLUT 4 et leurs translocations des compartiments endosomiques vers la membrane plasmique.

Lorsqu'ils sont stimulés ces récepteurs génèrent une cascade de signaux qui active les voies de transports et d'absorptions du glucose par voie passive.

Illustration inspirée de Benjamin Cumming, Pearson Education, figure 22-12

GLUT 4 : transporteur de glucose 4

1.3.2.8. *Insuline*

L'insuline est une hormone protéique rapidement sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas en réponse à l'élévation de la glycémie (Sonksen and Sonksen 2000). Sa découverte en 1922 a marqué une avancée majeure dans la compréhension et le traitement du diabète insulino-prive (Banting et al. 1922).

Comme la leptine, l'insuline est considérée comme un marqueur de l'adiposité, dont les mécanismes d'actions sont gluco-dépendants. En condition d'hyperglycémie, l'insuline est libérée en plus grande quantité afin d'activer les voies d'absorptions du glucose (**Figure 15**).

Une technique d'autoradiographie *in vitro* a permis de montrer que les récepteurs à l'insuline, les IRS sont exprimés dans des noyaux hypothalamiques connus pour être impliqués dans la régulation de l'alimentation tels que l'ARC, le DMH et le PVN (Corp et al. 1986). Similairement à la leptine, la fixation de l'insuline sur ces récepteurs génère l'activation des neurones à POMC et inactive les neurones à NPY/AgRP permettant de générer un effet anorexigène. L'augmentation de la prise alimentaire et du développement d'une obésité chez des souris *knock-out* pour l'IRS dans le SNC confirme le rôle de l'insuline dans la régulation énergétique (Brüning et al. 2000). De même, des injections intra-hypothalamiques d'insuline dans le VMH a induit un effet anorexigène (McGowan, Andrews, and Grossman 1992). Des modèles délétés du gène de l'insuline ont induit une diminution du poids corporel et de la masse grasse confirmant que la signalisation de l'insuline dans les adipocytes est essentielle au développement de l'obésité (Blüher et al. 2002).

La sécrétion de l'ensemble de ces signaux périphériques peut également dépendre du type d'aliment ingéré et de sa composition qui ont des effets spécifiques sur les mécanismes de l'appétit.

CHAPITRE 2

Implication de l'alimentation sur les mécanismes de l'appétit

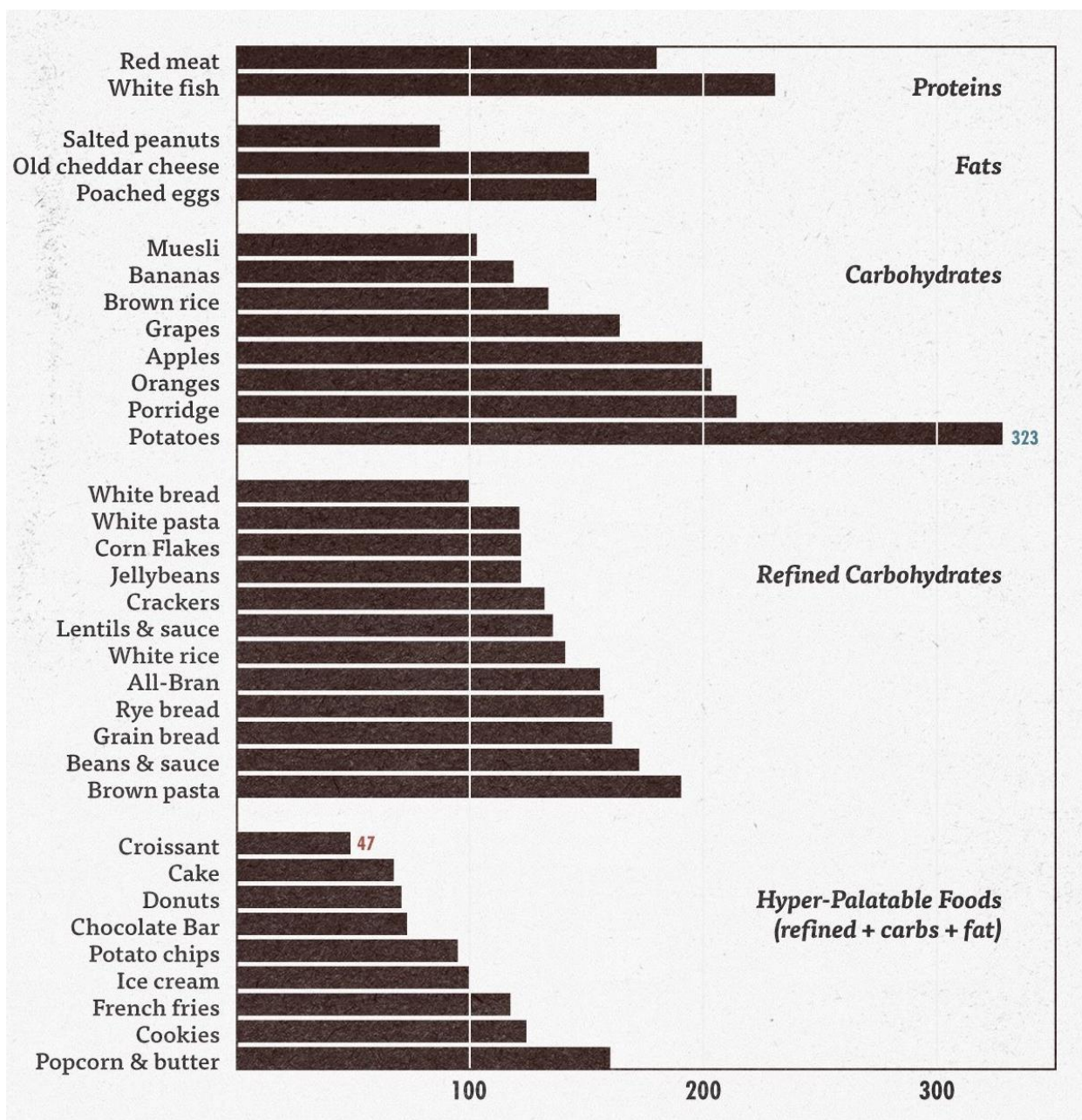


Figure 16. Comparaison des scores de satiété de plusieurs aliments

Scores de satiété (moyenne +/- SEM) de chaque aliment testé. Le pain blanc est considéré comme l'aliment de référence avec un score de satiété de 100%.

Illustration issue de la publication de Holt et al., 1995.

II.1. GENERALITES

Chaque groupe de macronutriments (glucides, protéines, lipides) représente une source d'énergie différente. Depuis le début des années 2000, de nombreuses études ont cherché à élucider les mécanismes par lesquels la prise alimentaire déclenche une cascade de signaux neuronaux et hormonaux provenant de la périphérie et interagissant avec le SNC pour induire les sensations de satiété ou de rassasiement.

La composition en macronutriments de l'alimentation a aussi un rôle important dans le contrôle de la prise alimentaire et du poids (Bellissimo and Akhavan 2015). En effet, l'hypothalamus intègre un système de rétroaction très sensible qui répond à la composition en macronutriments de l'alimentation par la libération d'hormones. Pour cette raison, et pour une meilleure compréhension des effets de la composition en macronutriments, Holt et al ont proposé des scores de satiété pour chaque groupe d'aliments (**Figure 16**) (Holt et al. 1995).

II.2. EFFET D'UN REGIME HYPERPROTEIQUE

Les protéines sont capables de favoriser la satiété plus fortement que les glucides et les lipides à court terme (Poppitt, McCormack, and Buffenstein 1998), (Anderson et al. 2004), (Blom et al. 2006) mais aussi à long terme (Marmonier, Chapelot, and Louis-Sylvestre 2000) ce qui contribue au maintien du poids corporel (Lejeune et al. 2006), (Pesta and Samuel 2014). Un régime de 27 semaines hyperprotéiné (25%) par exemple, a induit une perte de poids et de graisses chez l'Homme (Skov et al. 1999). De nombreuses autres études ont confirmé les effets satiétogènes des protéines (Baba et al. 1999), (Layman et al. 2003), (Halton and Hu 2004) par rapport aux glucides (Skov et al. 1999), (McAuley et al. 2006) ou aux lipides (Due et al. 2004), (McAuley et al. 2005).

Cependant, l'effet des protéines alimentaires sur la satiété et sur la prise alimentaire dépend aussi de la source des protéines, de leurs caractéristiques de digestion et d'absorption et de leurs compositions en acides aminés. Des protéines rapidement digérées et absorbées telles que lactosérum (Pal et al. 2014) et le soja (Tang et al. 2009) suppriment davantage la prise alimentaire que la caséine (Boirie et al. 1997) ou encore l'albumine (Anderson et al. 2004). Les protéines animales (notamment porcine) entraînent quant à elles, une dépense énergétique supérieure à celle des protéines végétales (soja) (Mikkelsen, Toubro, and Astrup 2000).

Cette différence de dépense énergétique, nommée « thermogénèse alimentaire » est différente selon la nature des macronutriments consommés : elle est de 20-30%, pour les protéines, de 5-10% pour les glucides et 0-3% pour les lipides (Tappy 1996). Les protéines auraient donc la capacité de stimuler davantage la thermogénèse que les autres macronutriments (Raben et al. 2003), ce qui permet d'expliquer en partie le mécanisme par lequel les protéines alimentaires favorisent la perte de poids (Westerterp-Plantenga et al. 2004).

Par ailleurs, les profils de réponses hormonales médiant la satiété sont spécifiques du macronutriment ingéré : un petit-déjeuner riche en protéine diminue les concentrations de ghréline post-prandiales alors qu'il augmente celles de la CCK, du PYY et du GLP-1 (Blom et al. 2006) de façon plus marquée qu'un repas riche en glucides et lipides (Tannous dit El Khoury et al. 2006). Mais ces réponses dépendent également du type de protéines ingérés (Hall et al. 2003) (Nakamura et al. 2011).

II.3. EFFETS D'UN REGIME HYPERGLUCIDIQUE

Les carbohydrates constituent la principale source d'énergie en macronutriments et représentent en moyenne entre 45 et 60% de l'apport énergétique total (Asp 1994). Même si l'organisme a une capacité de stockage des glucides limitée, le SNC nécessite pour son bon fonctionnement un apport constant de glucose. Ce dernier est reconnu par des gluco-récepteurs présents aux niveaux des noyaux de 2nd ordre, qui sont sensibles aux changements de concentrations de glycémie (Mayer 1953). Ces variations glycémiques ont été l'origine de la « théorie gluco-statique », consistant à dire que l'hypoglycémie serait à l'origine de la prise alimentaire. Mais cette théorie n'explique que partiellement la complexité du déclenchement de la prise alimentaire.

Les fibres alimentaires, les sucres (mono et di-saccharides : glucose, fructose, galactose, saccharose, maltose, lactose) et les amidons constituent les 3 principales catégories de glucides alimentaires. Leurs caractéristiques de digestibilité distinctes leur confèrent des réponses physiologiques spécifiques. Les sucres et l'amidon influencent la satiété et la prise alimentaire à court terme (Woodend and Anderson 2001), (Anderson and Woodend 2003), (Akhavan and Anderson 2007) en agissant sur la glycémie et sur la réponse à l'insuline (Mayer 1996).

Cependant, l'effet des glucides sur la prise alimentaire dépend également de leurs index glycémiques : l'ingestion de glucides à haut index glycémique induit un effet sur la prise alimentaire d'une durée de l'ordre de 1 à 2h contrairement aux glucides à faible index glycémique qui sont digérés plus lentement et qui génèrent un effet satiétogène d'une plus longue durée (de 2 à 6h).

II.3. EFFETS D'UN REGIME HYPERLIPIDIQUE

La famille des lipides comprend les triglycérides (TG), les phospholipides (PL) et les stérols. Les TG sont les lipides les plus communs trouvés dans les aliments avec les PL. Ils se différencient par rapport à leurs longueurs de chaîne, leurs degrés de saturation (saturés, mono-insaturés ou polyinsaturés Oméga 3, 6 et 9) et leurs conformations (cis, trans).

Les régimes riches en graisses sont généralement associés à une augmentation de l'adiposité et du poids corporel (Hariri and Thibault 2010), (Speakman 2019). Toutefois, certains régimes riche en gras peuvent induire une perte de poids (Risérus, Berglund, and Vessby 2001), (Burns et al. 2002), (Rebello et al. 2012). C'est le cas par exemple des régimes cétogènes, qui sont constitués d'environ 5% de glucides et 75% de lipides. Dans ce cas, les réserves glucidiques étant limitées, l'organisme va puiser son énergie dans les réserves lipidiques ce qui va entraîner une perte de poids. Par ailleurs, un régime hypocalorique et faible en énergie semble plus bénéfique sur le maintien du poids et les facteurs de risque cardiovasculaires qu'un régime dépourvu de graisse (Azadbakht et al. 2007). Une meilleure connaissance des aliments gras est donc nécessaire (Azadbakht et al. 2007).

Les études concernant l'effet des lipides sur l'appétit divergent : chez certains individus la consommation d'aliment riche en graisses est associée à une surconsommation de ces aliments liée à leurs fortes densités énergétiques ce qui entraîne une obésité (Blundell and MacDiarmid 1997) – alors que d'autres seront résistants à l'obésité induite par le régime riche en gras (Blundell et al. 2005).

Ainsi, la qualité du produit riche en graisse consommée a son importance. Certaines sont considérées comme de « bonnes » graisses, c'est le cas des acides gras dits « insaturés » parmi lesquels on retrouve les Oméga 3, 6 et 9. D'autres sont considérés comme « mauvaises » tels que les graisses saturées (d'origine animale) ou les acides gras trans (modifiés par les procédés industriels) qui favorisent l'accumulation de graisses dans l'organisme.

La consommation d'un repas composé de graisses saturées génère beaucoup plus d'énergie (Lawton et al. 2000) et induit une obésité plus rapide chez le Rat (Dziedzic et al. 2007) que la même charge calorique sous forme de graisses mono- ou polyinsaturées. Une autre étude quant à elle, a montré que les TG à chaînes longues augmentent la sécrétion de CCK et le PYY (French et al. 2000). Une expression différentielle des peptides régulant l'appétit suite à l'ingestion de lipides de différents degrés de saturation explique leurs influences spécifiques sur les mécanismes de l'appétit (Dziedzic et al. 2007), (Carreiro et al. 2016).

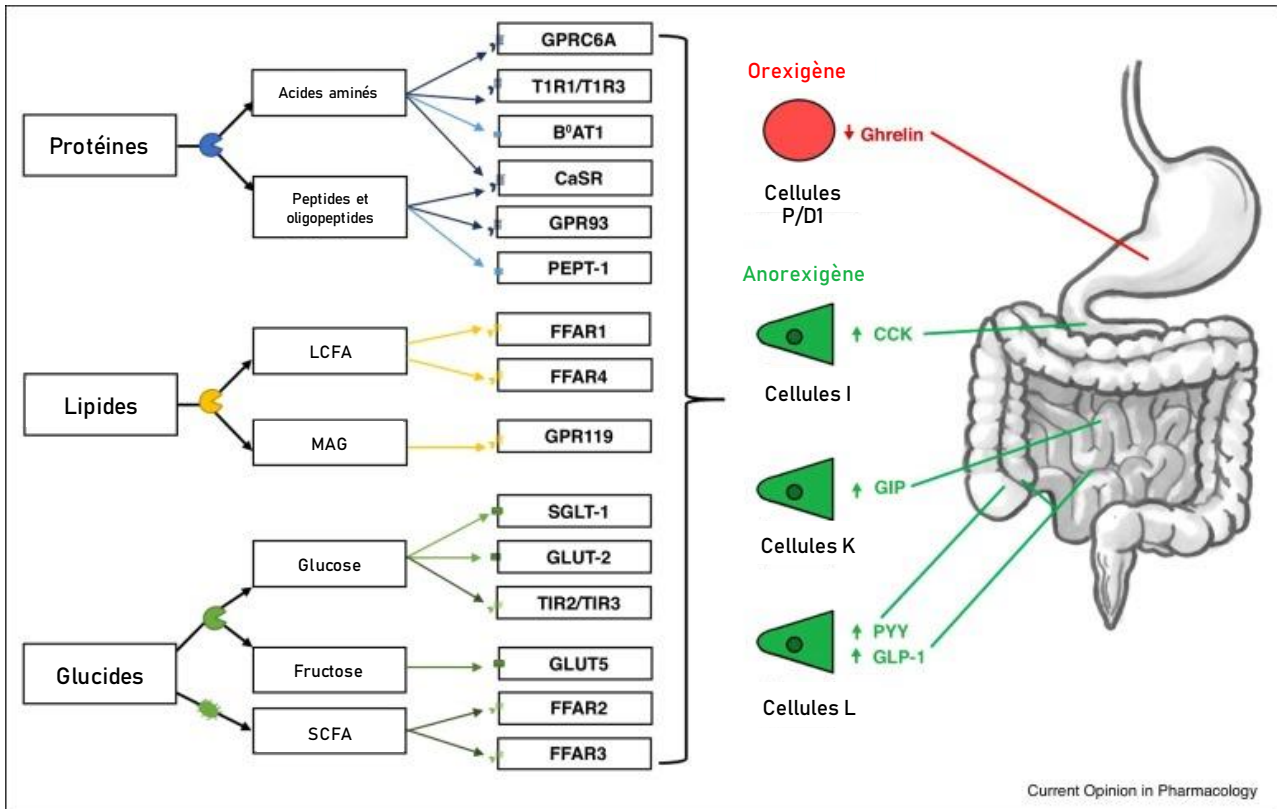


Figure 17. Illustration des récepteurs gastro-intestinaux spécifiques des nutriments

Les macronutriments sont décomposés par des enzymes endogènes et bactériennes dans l'intestin, produisant des métabolites pouvant être détectés par les récepteurs couplés aux protéines G. Cette activation conduit à la sécrétion d'hormones régulant l'appétit (GLP-1, PYY, GIP, CCK, ghréline) par les cellules entéro-endocrines.

LCFA : Long chain fatty acids; MAG : 2-monoacylglycerols; SCFA : Short chain fatty acids; GPRC6A : G protein-coupled receptor family C group 6 member A; TR1R/T1R3 : amino acid sensing heterodimer taste receptor type 1 member 1/taste receptor type 1 member 3; B⁰AT1 : neutral amino acid transporter; CaSR : calcium sensing receptor; GPR93 : G protein-coupled receptor 93; PEPT-1 : peptide transporter 1; FFAR1, 2, 3, 4 : free fatty acid receptor 1, 2, 3, 4; GPR119 : G protein-coupled receptor 119; SGLT-1 : sodium-dependant glucose co-transporter 1; GLUT-2 : glucose transporter 2; T1R2/T1R3 : sweet taste receptor type 1 member 3/ taste receptor type 1 member 3; GLUT-5 : free fatty acid receptor; CCK : cholécystokinine; GLP-1 : glucagon-like peptide 1; PYY : peptide YY; OXM : oxytomodulin; GIP : Gastric inhibitory polypeptide

Illustration issue de Norton et al., 2017

II.2. EFFETS DES NUTRIMENTS SUR LES SIGNAUX PERIPHERIQUES

Le tractus gastro-intestinal est considéré à l'heure actuelle comme le plus grand organe endocrinien du corps, sécrétant par ses cellules entéroendocrines plus d'une douzaine de peptides bien caractérisés pour leurs actions sur l'appétit et la satiété (Frank Reimann, Tolhurst, and Gribble 2012). Ces hormones de satiété sont sécrétées par des cellules endocrines dont les microvillosités apicales sont en contact avec le contenu luminal qui contiennent des récepteurs qui interprètent les signaux nutritionnels traversant le tractus digestif. Ces récepteurs de nutriments sont situés sur les cellules I (sécrétion de CCK) proximales et les cellules L (sécrétion de GLP-1 et PYY) principalement situées sur l'intestin grêle distal et le colon (David E. Cummings and Overduin 2007), (Carreiro et al. 2016). Comme énoncé précédemment, les cellules P/D1 sont présentes dans l'estomac et sécrètent la ghréline.

La majorité des récepteurs qui détectent les nutriments appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) (Engelstoft et al. 2008) dont chacun d'entre eux détecte un type d'aliment spécifique (Figure 17). Après activation de ces récepteurs, la nature du peptide sécrété va dépendre du type de nutriment détecté.

Concernant les glucides, les cellules du goût ont un rôle important car elles sont capables d'exprimer dès le début du tractus digestif le GLP-1, permettant la transmission précoce du signal du goût sucré (Takai et al. 2015), (Dotson, Geraedts, and Munger 2013). Son effet est d'autant plus important qu'au niveau intestinal car il n'est pas dégradé par la DPP-IV. Mais ces récepteurs du goût sucré (T1R2/T1R3) ont aussi été identifiés dans le tractus gastro-intestinal et leurs implications dans la sécrétion de PYY et de GLP-1 ont été confirmées (Steinert et al. 2011). Plus précisément, le glucose stimule la libération de GLP-1 *via* le récepteur SGLT1 (Kuhre et al. 2015) et le récepteur GLUT2 (Zheng et al. 2012), (Cani et al. 2007).

Les données concernant l'effet des protéines sur la libération de peptides intestinaux sont moins concordantes, sans doute en raison des différences de quantité et de la qualité de protéine ingérée (Charlton et al. 2011), (Diepvens, Häberer, and Westerterp-Plantenga 2008). En effet, plusieurs études ont montré qu'un régime riche en protéine augmentait la sécrétion de GLP-1, de PYY et de glucagon mais n'avait pas d'effet sur la libération du GIP (*Gastric inhibitory polypeptide*), la CCK et la ghréline (Belza et al. 2013), (Bendtsen et al. 2013), (Rachel L. Batterham et al. 2006), (Lejeune et al. 2006), (van der Klaauw et al. 2013) en comparaison à d'autres études (Blom et al. 2006), (Brennan et al. 2012). En outre, il a été démontré que les acides aminés stimulaient la sécrétion de GLP-1 (F. Reimann et al. 2004), (Diakogiannaki et al. 2013) et la CCK (Yu Wang et al. 2011), (Liou et al. 2011) *via* le récepteur CasR (GPR142), un récepteur spécifique des acides aminés aromatiques et des oligopeptides. D'autres

récepteurs tels que le T1R1/T1R3 ont stimulé la libération de la CCK en réponse à l'administration d'acides aminés L (plus particulièrement : la Phe, la Leu et la Glu) *in vitro* sur une culture de cellules STC-1 entéroendocrines de souris (Daly et al. 2013). Le récepteur GPRC6C lui, a stimulé la sécrétion de GLP-1 par les cellules GLUTag, un modèle *in vitro* de cellules L intestinales après une induction avec des acides aminés L (Oya et al. 2013).

Certains produits intermédiaires de digestion des protéines tels que les peptones stimulent la libération de CCK (Psichas et al. 2015). L'activation du récepteur GPT93 par des hydrolysats de protéines entraînent la transcription et la libération de CCK (Choi et al. 2007).

Par des récepteurs présents au niveau de la cavité buccale, les graisses stimulent la libération de la ghréline (Heath et al. 2004) mais aussi de PYY, de GLP-1 et de la CCK (Carreiro et al. 2016). Ces peptides sont également libérés par la détection des acides gras à chaîne moyenne et longue dans l'intestin grêle de manière dose-dépendante (Little et al. 2007), (Sankoda et al. 2017), (Hauge et al. 2017), (Engelstoft et al. 2013). Certaines études montrent que les effets des acides gras sur la libération de peptides dans l'intestin répondent proportionnellement à la longueur de la chaîne de l'acide gras (Feltrin et al. 2004). De plus, bien qu'ils ne résultent pas de l'apport en graisse lors d'un repas, mais du microbiote, les *short-chain fatty acids* (SFCA) : le propionate, le butyrate et l'acétate stimulent également la sécrétion de peptides intestinaux (PYY, leptine) *via* les récepteurs FFAR2 et FFAR3 colocalisés sur les cellules L (Darzi, Frost, and Robertson 2011). Les acides gras à longues chaînes (LCFA), quant à eux activent les récepteurs FFAR1 et FFAR2 (Hirasawa et al. 2005)

Ces derniers éléments mettent en évidence le rôle du microbiote dans les mécanismes de régulation de l'appétit.

CHAPITRE 3

Rôle du microbiote intestinal dans les troubles du comportement alimentaire

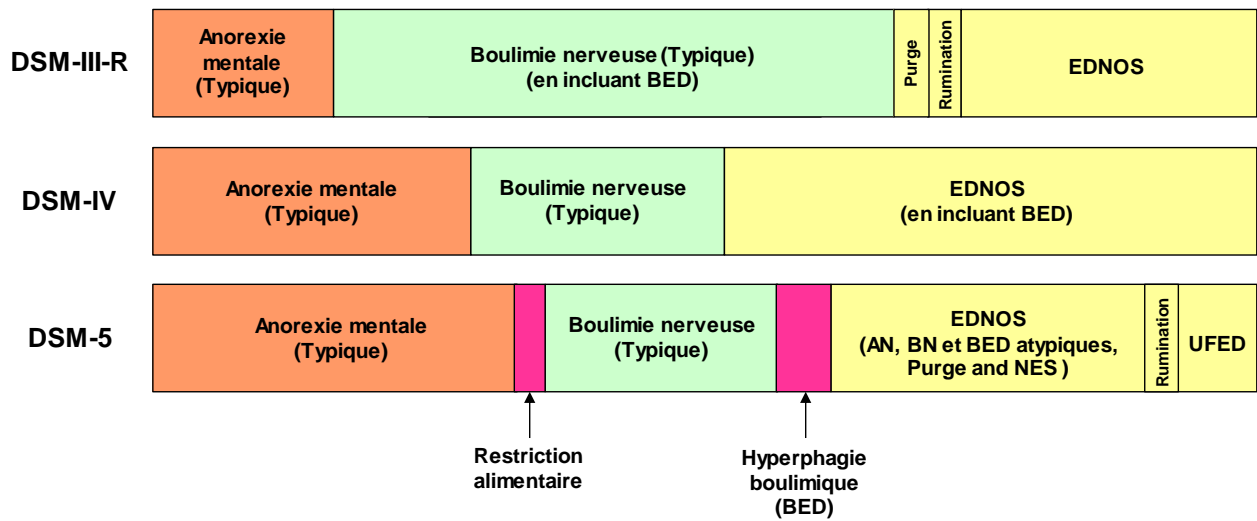


Figure 18. Évolution de la répartition des principaux types de trouble du comportement alimentaire selon l'évolution de la classification DSM.

La proportion visuelle n'est qu'indicative.

Issu de la publication de Galmiche et al., 2019.

AN (*Anorexia nervosa*) : Anorexie mentale; BED (*Binge-eating disorders*) : hyperphagie boulimique; BN (*Boulimia nervosa*) : boulimie nerveuse; DSM (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) : Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux; EDNOS (*eating disorders not otherwise specified*) : troubles de l'alimentation non spécifiés ailleurs; NES (*night eating syndrome*) : syndrome alimentaire nocturne; UFED (*Unspecified feeding or eating disorders*) : troubles de l'alimentation sans précision.

III.1. TROUBLES DU COMPORTEMENT ALIMENTAIRE

Les TCA sont des pathologies donc la prévalence ne cesse d'évoluer depuis plusieurs années, mais dont les mécanismes physiopathologies sont encore très peu connus. Les TCA sont classifiés et définis selon le Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM) par « **une perturbation persistante du comportement alimentaire ou lié au comportement alimentaire qui entraîne une modification de la consommation ou de l'absorption d'aliments et qui altère considérablement la santé physique ou le fonctionnement psychologique** » (DSM-5 2013).

D'autres classifications existent afin de caractériser ces TCA comme l'*International Classification of Diseases and Related Health Problems* (ICD), mais la classification la plus largement utilisée aujourd'hui reste le DSM (DSM-5 2013). Cet ouvrage publié pour la première fois en 1952 (DSM-I) par l'Association américaine de psychiatrie est un outil de référence décrivant et classifiant les troubles mentaux. Il a été plusieurs fois révisé afin de prendre en compte l'ensemble des paramètres essentiels à la caractérisation des pathologies psychiatriques. La dernière version, le DSM-5, a été publié en mai 2013 (Figure 18).

La classification du DSM-5 décrit trois TCA typiques : l'anorexie mentale (AN), la boulimie nerveuse (BN) et l'hyperphagie boulimique (BED) (DSM-5 2013).

Cette classification caractérise également d'autres troubles liés à l'alimentation qui ne répondent pas aux critères de diagnostic de formes typiques ou atypiques d'AN, BN ou BED et sont regroupés sous l'intitulé *Other specified feeding or eating disorders* (OSFED) et comprennent des pathologies tels que : le pica (caractérisé par l'ingestion de substances non nutritives et non comestibles), le mérycisme (caractérisé par des régurgitations et remastications des aliments), les troubles d'évitements/restrictions alimentaires.

Néanmoins, dans ce manuscrit, pour une raison de clarté, il ne sera abordé que les cas les plus formes typiques d'AN, de BN et de BED.

III.1.1. Anorexie mentale (AN)

L'AN est un trouble du comportement alimentaire caractérisé par trois critères bien précis tels que :

- « Une **peur intense de prendre du poids** ou de grossir, ou un comportement persistant qui nuit à la prise de poids, même avec un poids très faible » ;
- « **Un poids corporel très bas** » dû à une limitation des apports alimentaires et énergétiques ;

- « Une **perturbation de la perception du poids** ou de la forme du corps »

Cependant dans certains cas, l'AN peut être associée à des épisodes « de frénésie alimentaire » ou d'hyperphagies, caractérisés par une ingestion massive d'aliments suivie de phénomènes de « purge » (vomissements spontanés ou utilisation abusive de laxatifs, de diurétiques et/ou de lavements). La présence de ces épisodes d'hyperphagies au cours des trois derniers mois distingue une anorexie dit « de type restrictif » d'une anorexie « mixte ».

La sévérité de cette pathologie est basée chez l'adulte sur les valeurs de l'IMC qui correspond au poids en kilogrammes divisé par le carré de la taille exprimée en mètres (kg/m^2). Pour les enfants et les adolescents, c'est le centile de l'IMC qui est utilisé.

Ces niveaux sont classés selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS) selon la valeur d'IMC calculée : doux : $\text{IMC} \geq 17 \text{ kg}/\text{m}^2$, modéré : $\text{IMC} : 16-16,99 \text{ kg}/\text{m}^2$, sévère : $\text{IMC} : 15-15,99 \text{ kg}/\text{m}^2$, extrême : $\text{IMC} < 15 \text{ kg}/\text{m}^2$.

La dénutrition causée par la restriction alimentaire ainsi que l'ensemble des comportements compensatoires, peuvent avoir d'importantes conséquences cliniques pouvant aller jusqu'à être un risque vital.

Les principaux symptômes observés chez les personnes atteintes d'AN peuvent être : une aménorrhée, des troubles digestifs, une léthargie, une fatigue, une intolérance au froid ou encore des arythmies cardiaques, des déficits cognitifs, un dysfonctionnement rénal ou encore une ostéoporose. La plupart des perturbations physiques sont réversibles après une réhabilitation nutritionnelle mais certaines, notamment la perte de densité minérale osseuse, parfois incomplètement.

De plus, ces patients présentent également des symptômes psychologiques tels qu'un comportement dépressif, une anxiété, des addictions, un retrait social, une irritabilité etc. qui contribuent à une forte altération de la qualité de vie et une perte d'espérance de vie.

III.1.2. Boulimie nerveuse (BN)

La BN est un TCA caractérisé par une **consommation excessive** (une quantité de nourriture nettement supérieure à celle que la plupart des individus mangeraient dans une période de temps et dans des circonstances similaires) ou **compulsive de nourriture** (*binge-eating*) qui est associée à des **comportements compensatoires inappropriés récurrents afin d'empêcher la prise de poids** (vomissements, prise de laxatifs, diurétique, activité physique excessif). Cette séquence compulsifion/purge définit la crise boulimique.

Les personnes atteintes de BN ont généralement un IMC normal ou légèrement excessif et dissimulent leurs crises d'hyperphagies ce qui rend le diagnostic difficile.

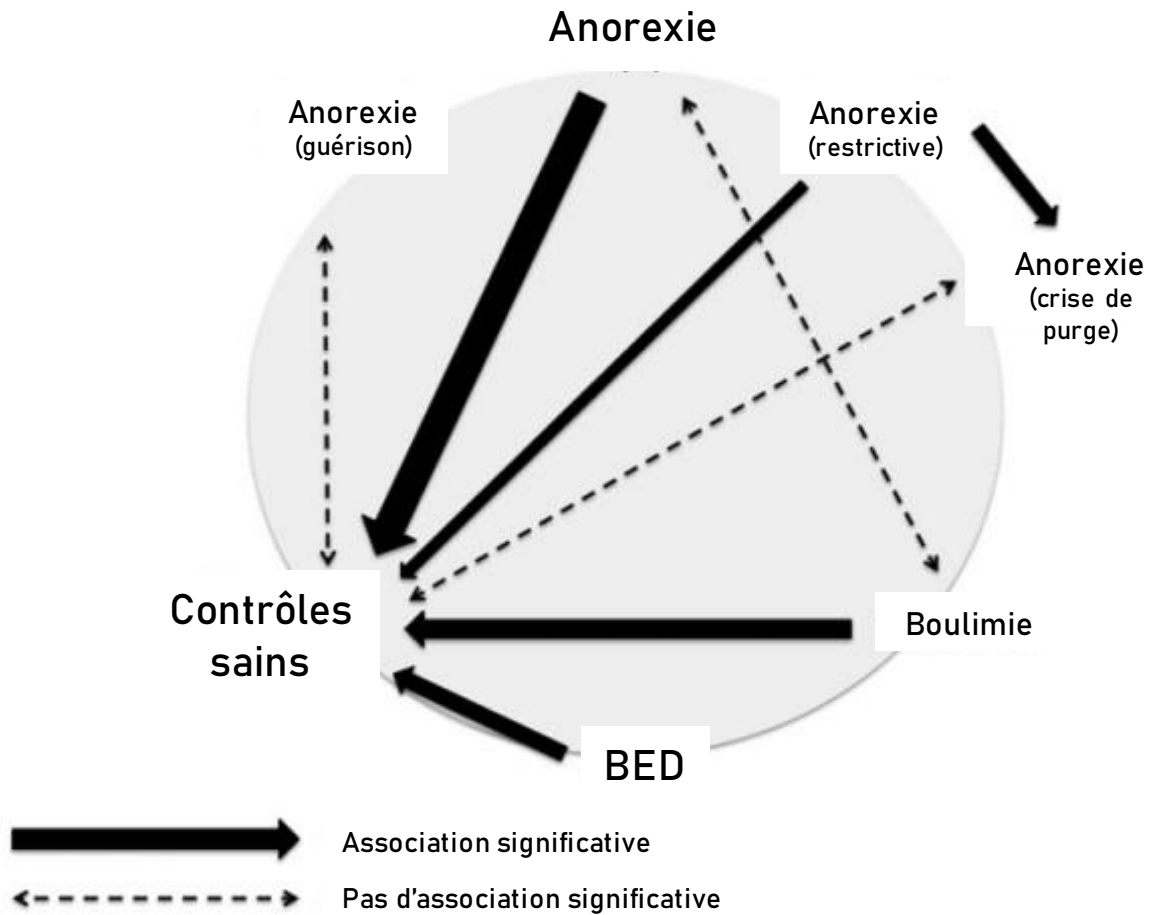


Figure 19. Interactions entre les différents troubles du comportement alimentaire

Traduit de la publication de Guillaume et al., 2015

BED (*Binge-eating disorders*) : hyperphagie boulimique

Le niveau de sévérité de cette pathologie est défini sur le nombre d'épisodes de comportements compensatoires par semaine : légère : 1 à 3 épisodes ; modéré : 4 à 7 épisodes ; sévère : 8 à 13 épisodes ; extrême : ≥ 14 épisodes.

Hormis la dénutrition, les personnes atteintes de BN présentent des complications physiques comparables à celles de l'AN purgative : cardiaques, rénales, digestives, dentaires et osseuses. Les comorbidités psychiatriques sont souvent plus sévères que dans l'AN, en particulier les addictions et les risques de suicide.

III.1.3. Hyperphagie compulsive (BED)

Le BED est un trouble caractérisé par une **consommation excessive** ou compulsive de nourriture, mais contrairement à la BN, il **n'est pas accompagné de comportements compensatoires**. L'IMC est donc élevé.

Les épisodes d'hyperphagies boulimiques sont associés à plusieurs facteurs tels que :

- Manger beaucoup plus rapidement que la normale ;
- Se nourrir jusqu'à se sentir mal à l'aise ;
- Une ingestion de grandes quantités de nourriture sans avoir physiquement faim ;
- Un isolement pour manger dû à une gêne de manger en public ;
- Sentiment de dégoût, de dépression et de culpabilité après un épisode d'hyperphagie.

Les niveaux de gravité de cette pathologie sont définis sur la fréquence des épisodes de consommation excessive de nourriture par semaine : légère : 1 à 3 épisodes ; modéré : 4 à 7 épisodes ; sévère : 8 à 13 épisodes ; extrême : ≥ 14 épisodes.

Les complications sont celles de l'obésité et des comorbidités psychiatriques associées, similaires à celles de l'AN et de la BN.

Même si l'AN, la BN et la BED sont des pathologies distinctes, la présentation clinique du TCA peut évoluer au cours du temps : un même individu peut passer d'un trouble à un autre, par exemple de l'AN à la BN, ou même présenter ces deux troubles en même temps. Des patients ayant un antécédent d'AN ou de BN peuvent présenter plusieurs années plus tard un BED les menant à l'obésité. Enfin, les formes typiques d'AN ou de BN peuvent s'atténuer en formes atypiques de faible intensité. Ces caractéristiques changeantes rendent d'autant plus difficile le diagnostic des TCA (**Figure 19**).

1. **Vous faites-vous vomir lorsque vous avez une sensation de trop plein ?**
2. **Êtes-vous inquiet(e) d'avoir perdu le contrôle des quantités que vous mangez ?**
3. **Avez-vous récemment perdu plus de 6 kg en moins de 3 mois ?**
4. **Vous trouvez-vous gros(se) alors même que les autres disent que vous êtes trop mince ?**
5. **Diriez-vous que la nourriture domine votre vie ?**

Figure 20. Questionnaire SCOFF pour le dépistage des TCA

Traduit de la publication de Morgan et al., 1999 et validé par Garcia et al., 2010

SCOFF : *Sick, Control, One, Fat, Food*; TCA : Troubles du comportement alimentaire

III.1.4. Outils de diagnostics des TCA

Les TCA, du fait de leurs présentations cliniques variées, et étant parfois dissimulés par les patients, il est souvent difficile de les diagnostiquer. C'est pourquoi, des outils de dépistages et d'évaluation des TCA ont été mis en place afin de détecter au mieux leurs présences. Ces outils se présentent généralement sous la forme de questionnaires.

L'outil de référence pour le dépistage des TCA est le questionnaire ***Sick, Control, One, Fat, Food (SCOFF)***, développé en 1999 (Morgan, Reid, and Lacey 1999), à l'intention des médecins généralistes. Il est composé de 5 questions, donc une réponse positive vaut 1 point. Si le score final est ≥ 2 , la présence d'AN ou de BN peut être suspectée (**Figure 20**).

D'autres questionnaires sont utiles pour l'évaluation spécialisée des TCA, comme le questionnaire « ***Eating Disorders Inventory*** » (**EDI**), qui est un questionnaire qui a été développé en 1984 (Garner, Olmstead, and Polivy 1983), conçu pour être utilisé dans l'aide au diagnostic clinique et d'évaluer les attitudes et les comportements liés aux TCA. Révisé une première fois en 1991 (EDI-2), il a été de nouveau révisé en 2004 en préservant les données de l'EDI-2 tout en améliorant les paramètres psychologiques. Ce test, aujourd'hui appelé EDI-3 (Garner 2004), comprend 91 questions, réparties en 12 points (ascétisme, boulimie, conscience intéroceptive, contrôle des impulsions, désir intense de minceur, inefficacité, insatisfaction corporelle, insécurité social, méfiance interpersonnelle, perfectionnisme, peur de la maturité, dérèglement émotionnel) évaluées sur une échelle de Likert en 6 points allant de « toujours » à « jamais » et notés de 0 à 3.

Les TCA pouvant être considérés comme des pathologies psychiatriques, ce test est généralement utilisé en association avec d'autres tests tels que *Beck Depression Inventory* pour déceler la présence d'une dépression ou celui d'Hamilton décelant une anxiété.

D'autres questionnaires sont également mis en place pour les TCA tels que *Bulimic Investigatory test (BIT)*, *Eating Disorder Examination Questionnaire (EDDQ)*, *Eating Disorder Diagnosis Questionnaire (EDEQ)*, *Eating Attitudes Test (EAT)*, *Composite International Diagnostic Interview (CIDI)*, *Structured Clinical Interview for DSM-IV (SCID)*, *Stirling Eating Disorders (SED)* mais ils ne seront pas détaillés dans ce manuscrit.

En parallèle de ces différents TCA, les pathologies qui touchent le plus grand nombre de personnes restent l'obésité et le surpoids.

III.2. OBESITE ET SURPOIDS

Selon l'OMS, le surpoids et l'obésité sont définis comme « **une accumulation anormale ou excessive de graisse qui présente un risque pour la santé** » (OMS, Organisation mondiale de la Santé 2018a). La mesure la plus communément utilisée pour estimer le surpoids et l'obésité chez l'adulte est l'IMC. Il a été estimé qu'un IMC ≥ 25 reflétait un surpoids alors qu'un IMC ≥ 30 reflétait une obésité. Pour les enfants, la mesure utilisée est toujours l'IMC mais en rapport avec les courbes de corpulence pour l'âge.

La cause fondamentale de l'obésité et du surpoids vient d'un réel déséquilibre entre les calories consommées et dépensées qui est souvent associé à une importante consommation d'aliments à hautes valeurs caloriques et un manque d'activité physique (Hill, Wyatt, and Peters 2012). Mais les mécanismes sous-jacents sont plus complexes, prenant en compte que l'obésité et le surpoids peuvent également être dus à une prédisposition génétique ou à des facteurs environnementaux (situation économique, sociale, familiale) et de multiples dérèglements du comportement alimentaire (Sheikh et al. 2017)

Ces pathologies dégradent considérablement la qualité de vie et peuvent avoir de graves conséquences sur la santé telles qu'une augmentation des risques de maladies cardiovasculaires, un risque accru d'avoir un diabète, de l'hypertension artérielle ou certains cancers.

III.3. EPIDEMIOLOGIE DES TCA, DE L'OBESITE ET DU SURPOIDS

Selon une revue systématique publiée en 2019, les TCA touchent principalement les femmes avec un pourcentage de 1,4%, 1,9% et 2,8% respectivement pour l'AN, la BN et le BED, contre 0,2%, 0,6% et 1,06% chez les hommes (Galmiche et al. 2019) même si le sex-ratio (homme : femme) tend à évoluer depuis quelques années (Hudson et al. 2007). L'analyse de la littérature a mis en évidence une augmentation de 4,3% de la prévalence des troubles liés à l'alimentation de 2000 à 2018 (Galmiche et al. 2019). La prévalence de l'ensemble des TCA dans la population française adulte est de 15,8% pour les femmes et de 8,0% pour les hommes (Andreeva et al. 2019) et de 16,7% dans la tranche d'âge des 18-25 ans (Spillebout et al. 2019).

Quant à l'obésité et le surpoids, à l'échelle mondiale, la prévalence a doublé depuis 1980 (Chooi, Ding, and Magkos 2019). En effet, en 2016 plus de 1,9 milliard d'adultes (> 18ans) étaient en surpoids et 650 millions étaient obèses. Durant cette même année, il a été compté 41 millions d'enfants (< 5ans) et plus de 340 millions d'enfants et d'adolescents (de 5 à 19 ans) en surpoids ou obèses (OMS, Organisation mondiale de la Santé 2018b). Si ces chiffres continuent d'augmenter, on estime que 38%.

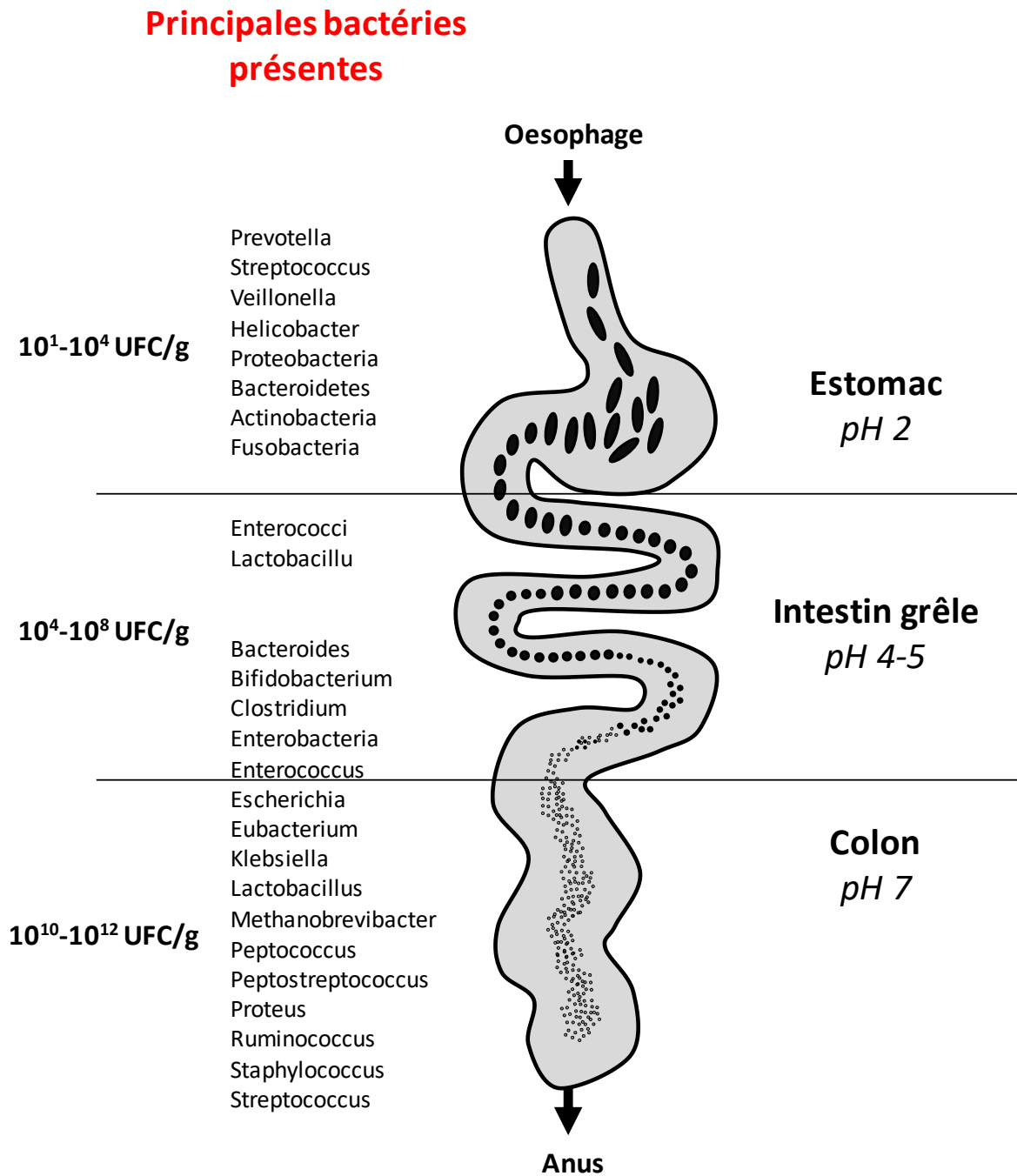


Figure 21. Composition du microbiote du tractus gastro-intestinal humain

Informations issues de *Biology of microorganisms*, Brock, Pearson Eds (12^{ème} édition, 2009), pp 817

de la population adulte mondiale sera en surpoids d'ici 2030 (Kelly et al. 2008) alors qu'aux Etats-Unis ce pourcentage serait déjà supérieur à 85% (Youfa Wang et al. 2008). Toutes ces données épidémiologiques sont alarmantes et nécessitent une amélioration de la connaissance de ces pathologies. A l'heure actuelle, les études s'intéressent particulièrement au microbiote et à son implication dans la physiopathologie des TCA et de l'obésité.

III.4. LE MICROBIOTE INTESTINAL

III.4.1. Généralités

Majoritairement localisé dans l'intestin grêle et le côlon, le microbiote intestinal est un écosystème complexe composé de 10^{14} microorganismes d'une grande diversité (bactéries, virus, parasites, champignons, archées). Le nombre de ces microorganismes est estimé à un ratio 1:1 de cellules humain-bactérie (Sender, Fuchs, and Milo 2016). L'ensemble de ces microorganismes est réparti en 5 phyla dominants du microbiote qui sont les : Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria et depuis plus récemment les Verrucomicrobia avec une représentativité plus importante pour les Firmicutes (60-80%) et les Bacteroidetes (15-30%), (Cheng et al. 2013).

Des études ont montré que l'intestin était composé d'un nombre important de microorganismes (**Figure 21**) et qu'il existait une réelle symbiose entre les bactéries qui y résident dites « bactéries commensales » et l'organisme. Mais la recherche de nouvelles espèces présentes dans le microbiote est limitée car actuellement seulement 10% des espèces bactériennes peuvent être cultivées *in vitro*. Néanmoins, une étude nommée *Metagenomics of the Human Intestinal Tract* (MétaHIT), lancée en 2008 et coordonnée par l'INRA a eu pour objectif d'identifier l'ensemble des génomes microbiens intestinaux (métagénome) par séquençage haut débit à partir de 124 selles humaines. Grâce à cette étude, 3,3 millions de gènes différents ont pu être découverts, ce qui a permis de confirmer la richesse et la diversité de la flore intestinale ("MetaHIT: Metagenomics of the Human Intestinal Tract" 2008).

Par cette composition très complexe et riche, le microbiote est impliqué dans de nombreux et divers processus biologiques (digestives, métaboliques, immunitaires et neurologiques). Des études récentes ont aussi mis en évidence qu'il serait aussi impliqué dans certaines pathologies liées à l'alimentation notamment pas les métabolites qu'il produit.

III.4.2. Implication du microbiote intestinal dans les TCA et l'obésité

Depuis plusieurs années, les recherches ne cessent de prouver l'influence de la composition du microbiote dans la physiopathologie des TCA (Breton, Déchelotte, and Ribet 2019), (Glenny et al. 2017)

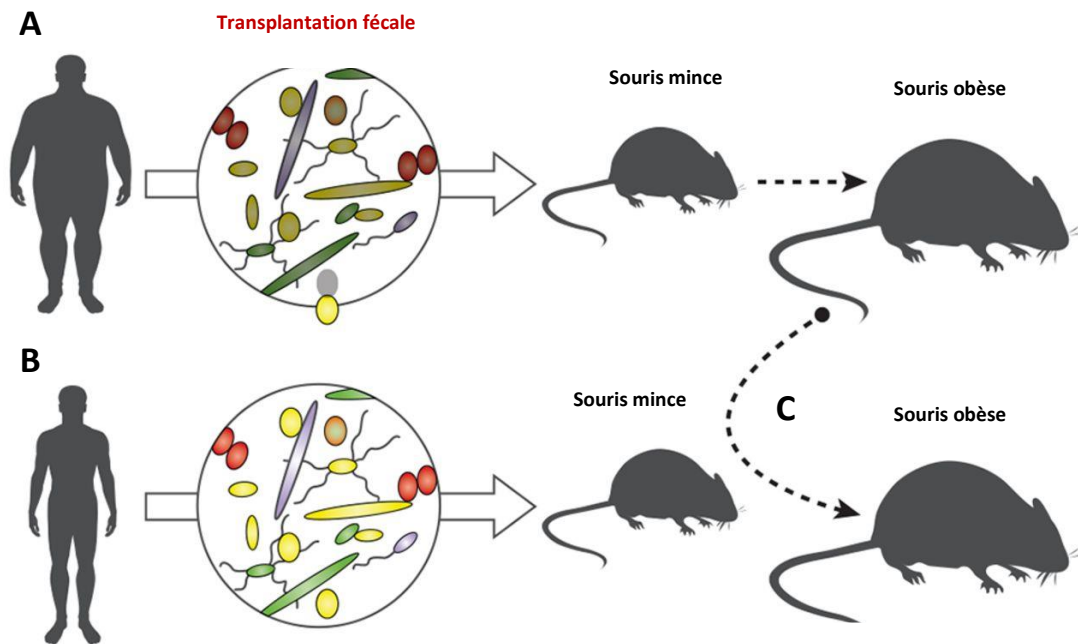


Figure 22. Transplantation de microbiote fécal chez l'humain et la souris

Représentation schématique de la transplantation de microbiote de souris axéniques (animaux sans germes) colonisées avec du microbiote humain provenant de donneurs de divers phénotypes : (A) obèses, (B) maigres ou (C) de souris obèses

Adapté de la publication de Shanahan et al., 2017

et de l'obésité (Castaner et al. 2018). En effet, une des premières observations a été que le microbiote de souris génétiquement obèses (*ob/ob*) comportait une proportion élevée de Firmicutes vs Bacteroidetes (Ley et al. 2005). Des changements similaires ont été observés au sein du microbiote fécal de l'Homme (Ley et al. 2006). De plus, un transfert de microbiote fécal humain obèse chez des souris *germ-free* (dépourvu de microbiote) a entraîné le développement d'une adiposité chez ces dernières (Ridaura et al. 2013) (Figure 22). De même, des interventions cliniques dans le traitement de l'obésité telles qu'une chirurgie bariatrique ont montré des effets durables dans le maintien de la composition et des fonctions des communautés microbiennes intestinales (Tremaroli et al. 2015).

Dans un objectif idéaliste de mettre en évidence les bactéries impliquées dans la physiopathologie de l'AN, des analyses plus spécifiques ont révélé des taux plus élevés de l'archée *Methanobrevibacter smithii* (Armougom et al. 2009) ainsi qu'une augmentation de l'expression d'*Escherichia coli* (*E. coli*) (Million et al. 2013) chez les patients atteints d'AN par opposition aux patients obèses et aux sujets contrôles. Une étude de Kleiman et al. a permis de comparer par séquençage à haut débit du gène ARN 16S, les espèces présentes dans le microbiote intestinal de patients atteints d'AN avant et après une renutrition mettant en avant la modulation de la diversité bactérienne par l'alimentation (Kleiman et al. 2015).

En effet, des études ont montré que la composition microbienne intestinale est influencée par le type d'aliments ingérés ou le type de régime suivi à court et long terme : par exemple, un régime alimentaire d'origine animale augmente les microorganismes tolérants à la bile tels que les Bacteroides et diminue la présence de Firmicutes. Par opposition, un régime alimentaire exclusivement herbivore, induit un taux de Firmicutes élevé permettant de métaboliser les polysaccharides alimentaires de plantes (David et al. 2014). Des régimes à long-terme riches en glucides augmentent quant à eux plus particulièrement la présence du genre *Prevotella* (Wu et al. 2011) alors qu'une alimentation riche en graisse a tendance à augmenter la proportion de Bacteroidales et de Clostridiales (de La Serre et al. 2010). Ces exemples ne sont qu'une partie des résultats présentés dans la littérature, car de nombreuses autres études détaillent l'impact des aliments, leurs compositions et/ou de régimes plus complexes sur la présence d'espèces bactériennes spécifiques (Conlon and Bird 2014).

La modulation du microbiote en fonction de l'alimentation est aussi à l'origine de la richesse des signaux émis par l'ensemble des bactéries qui le constitue (cf Chapitre 1, Partie A, 2.5). Ces signaux ont des rôles pléiotropes et sont capables d'agir sur le métabolisme énergétique, de manipuler la fonction de la barrière intestinale mais aussi de moduler le système immunitaire en influençant la production d'antigènes par l'hôte.

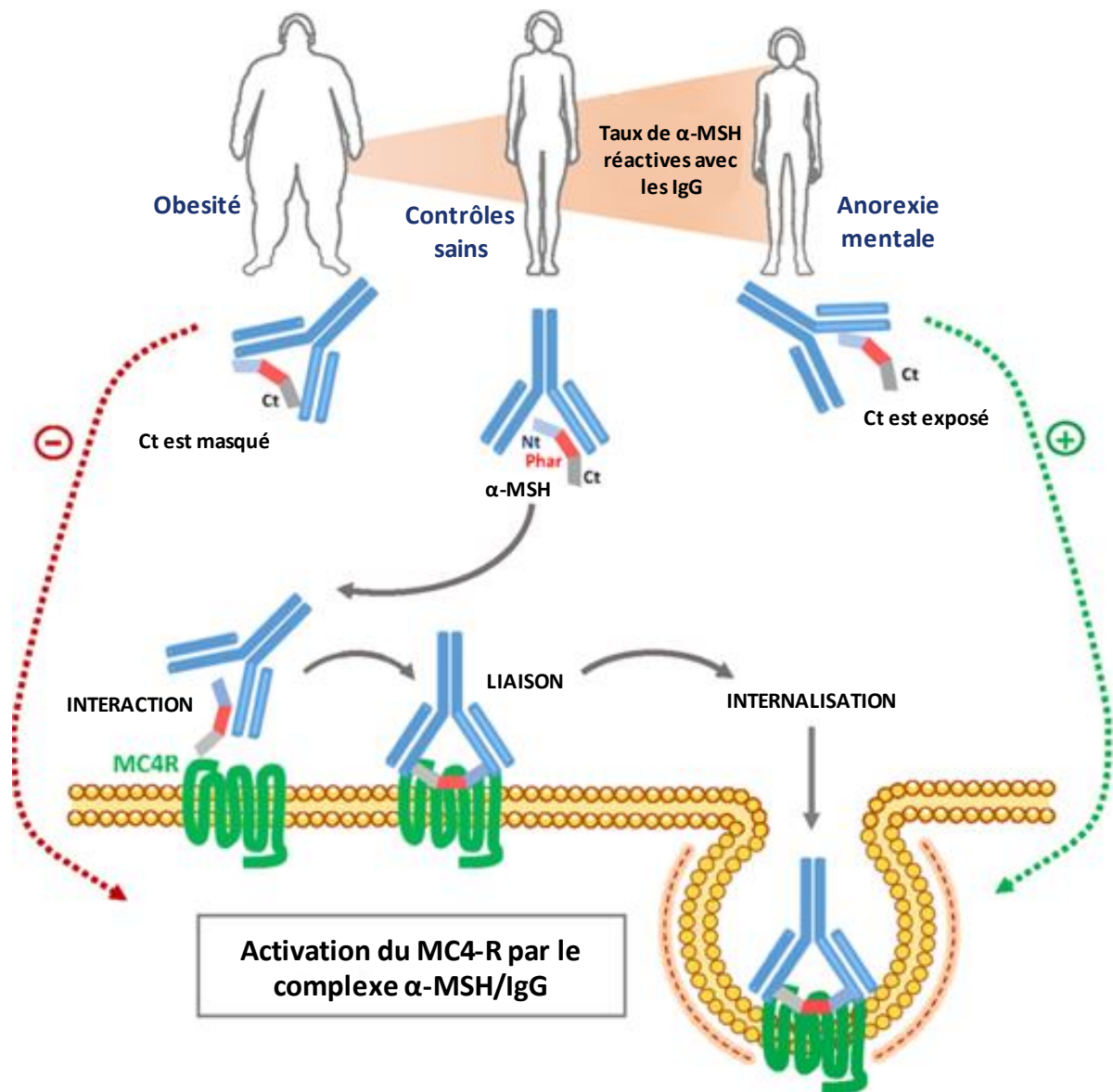


Figure 23. Modèle hypothétique d'activation du MC4-R par le CI : α -MSH/IgG chez les sujets sains et obèses ou souffrant d'anorexie mentale.

L' α -MSH se lie aux IgG plasmatiques par son pharmacophore. Ce complexe est appelé « Complexe immuns (CI) » est capable de lier et d'activer le MC4-R. Au cours de la liaison, l' α -MSH se dissocie du CI et son pharmacophore (Phar) pénètre dans la poche de liaison du MC4-R, ce qui entraîne l'activation de son récepteur. Le CI α -MSH/IgG est ensuite internalisé avec le MC4-R. Chez les sujets en bonne santé, les IgG se lient principalement aux parties centrale et N-terminale de l' α -MSH ce qui rend le terminal C-terminal disponible pour l'accouplement de MC4-R. Cependant, chez les patients obèses, le C-terminal est masqué par les IgG ce qui empêche l'activation du MC4-R. En revanche, chez les patients atteints d'anorexie mentale, le C-terminal de l' α -MSH n'est pas lié par les IgG ce qui favorise la reconnaissance des récepteurs.

Issu de la publication de Lucas et al., 2019

Nt : N-terminal; Ct : C-terminal; Pharm : pharmacophore; α -MSH : α -melanocyte stimulating hormone; MC4-R : Récepteur mélanocortine de type 4; IgG : immunoglobulines G; CI : complexe immunitaire

III.5 IMPLICATION DES AUTO-ANTICORPS DANS LES TCA

III.5. Les anti-neuropeptides, une hypothèse physiopathologique

Le concept d'auto-anticorps (auto-Ac) a été suggéré suite à la découverte d'auto-Ac dirigés contre des neuropeptides dans les troubles de l'alimentation (Fetissov et al. 2002). Son implication dans les mécanismes de l'appétit a été ensuite suggéré à partir d'une étude *in silico* mettant en évidence que plusieurs types de microorganismes (virus, bactéries, champignons) pouvaient contenir des protéines avec des séquences d'aa identiques aux peptides régulant l'appétit (Fetissov et al. 2008).

Ces découvertes ont suggéré l'hypothèse selon laquelle le système immunitaire peut intervenir dans la signalisation peptidergique par le biais d'une production accrue d'auto-Ac dirigés contre des neuropeptides et être responsable d'altérations sur les mécanismes de régulation de l'appétit en agissant sur l'axe microbiote-intestin-cerveau (Fetissov and Hökfelt 2019).

Plusieurs études ont suggéré une association entre la production d'auto-Ac réactifs aux hormones peptidiques et les symptômes cliniques typiques des troubles de l'alimentation. En effet, à l'aide d'immunomarquages effectués dans le cerveau de Rat, Fetissov et ses collaborateurs ont mis en évidence que les anticorps présents dans le plasma de patients atteints d'AN ou de BN pouvaient se lier aux mélanotropes et/ou corticotropes dans l'hypophyse du rat (Fetissov et al. 2002).

De même, ces taux plasmatiques d'auto-Ac anti- α -MSH sont corrélés avec les scores EDI-2 de patients atteints d'AN et de BN (Fetissov et al. 2005). Un résultat confirmé par une étude montrant que les concentrations et l'affinité des auto-Ac IgG anti- α -MSH étaient augmentées après un stress tels qu'une restriction alimentaire (Sinno et al. 2009) et chez les individus atteints d'AN et de BN (Lucas et al. 2019). De plus l'injection IP de ces auto-Ac chez le Rat a induit une diminution de la prise alimentaire et du poids associée à une augmentation dose dépendante de la concentration plasmatique d' α -MSH (Lucas et al. 2014). Toutes ces données suggèrent que les auto-Ac anti- α -MSH peuvent influencer la consommation de nourriture et le contrôle du poids corporel *via* la modulation de la concentration plasmatique d' α -MSH (Coquerel et al. 2012). Mais une étude très récente a mis en évidence que cette modulation de l'appétit serait médiée par la modulation du signal de transduction du MC4-R : dans le cas de l'obésité, l'affinité de liaison du complexe α -MSH/IgG diminue alors qu'elle est augmentée chez les personnes atteintes d'AN ou de BN (Lucas et al. 2019). Cette affinité accrue augmenterait l'interaction ligand/récepteur et l'activation du MC4-R (Lucas et al. 2019) (**Figure 23**).

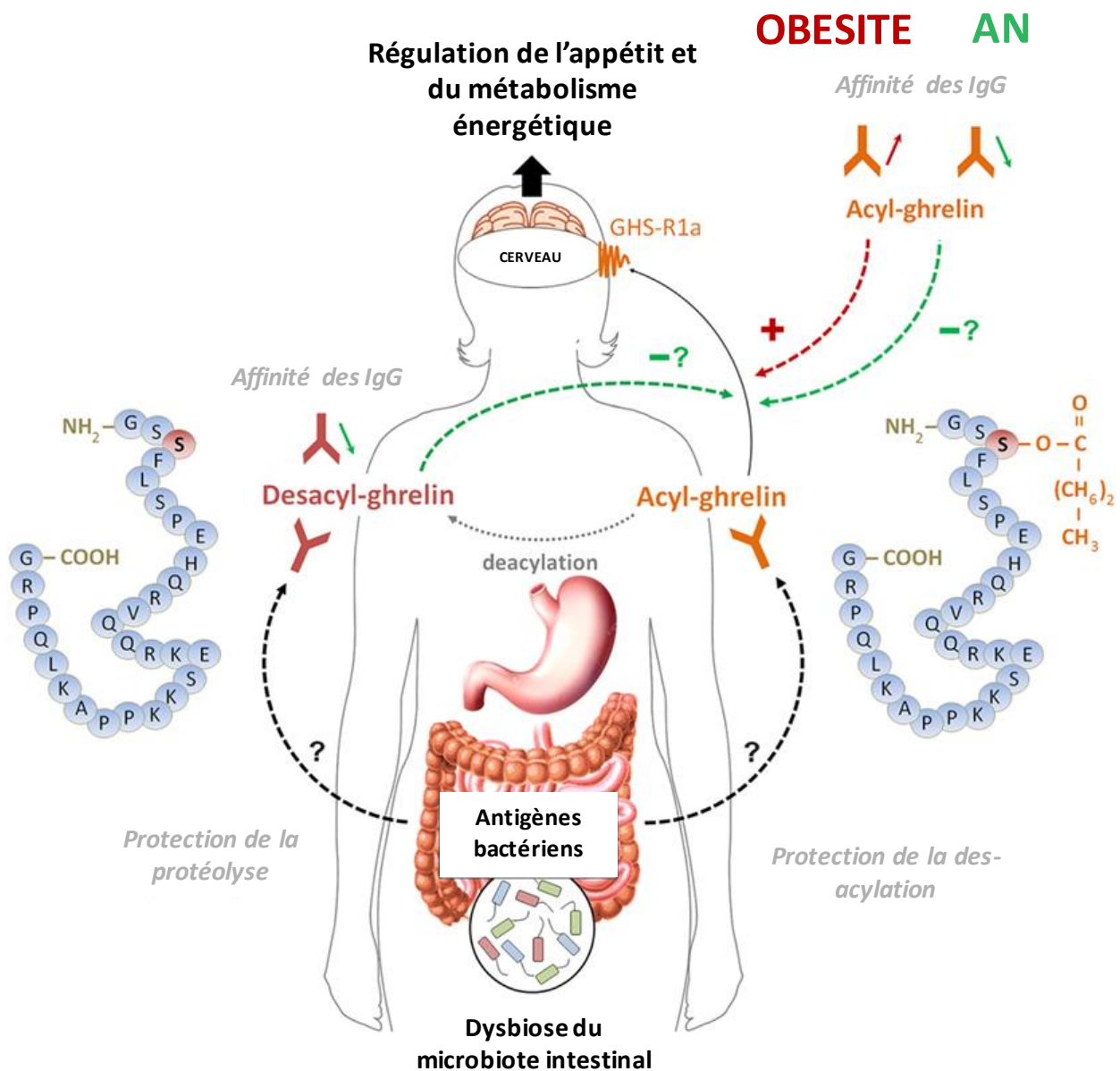


Figure 24. Modèle schématique du rôle des IgG anti-ghréline sur le contrôle de l'appétit dans les conditions normales et pathologiques.

L'acyl-ghréline est protégée de la des-acylation par les IgG ce qui renforcerait son signal orexigène au cerveau. Des modifications de l'affinité des IgG pour la ghréline chez les patients obèses (augmentation) et chez les patients atteints d'AN (diminution) pourraient respectivement augmenter et diminuer les effets orexigènes de la ghréline. De plus, une affinité réduite des IgG pour la des-acyl-ghréline pourrait favoriser sa dissociation avec les complexes immuns et donc inhiber l'action de la ghréline. L'origine des modifications d'affinités des IgG réactives à la ghréline et à la des-acyl-ghréline est actuellement inconnue mais pourrait potentiellement dépendre de la stimulation antigénique du microbiote intestinal associée à des modifications nutritionnelles à long terme de l'AN et de l'obésité.

Issue de la publication de Fetissoff et al., 2017

GHS-R1 : *Growth hormone secretagogue receptor a*; IgG : immunoglobulines G; AN (*Anorexia nervosa*) : Anorexie mentale

Mais d'autres études ont montré que le sérum d'humain sain était composé d'auto-Ac réactifs avec d'autres neuropeptides ou hormones peptidiques impliqués dans la régulation de l'appétit tels que le NPY, la ghréline, la leptine, PYY, l' α -MSH etc. (Fetissov et al. 2008). Des auto-Ac réactifs avec la ghréline sont aussi retrouvés chez les personnes obèses (Takagi et al. 2013).

L'impact de ces auto-Ac spécifiques sur la dérégulation des mécanismes de l'appétit a été mis en évidence notamment par la ghréline, une hormone qui en condition normale a une affinité accrue avec les IgG plasmatiques qui auraient pour rôle de la protéger de la dégradation et de préserver son activité fonctionnelle. Dans le cas de l'obésité, les IgG présentent une meilleure affinité pour la ghréline (Terashi et al. 2011) et la co-administration de la ghréline avec des auto-Ac IgG provenant d'obèses stimulent fortement la prise alimentaire chez le Rat (Takagi et al. 2013) prouvant que la liaison entre auto-Ac et ghréline améliore les effets orexigènes de cette hormone (Fetissov, Lucas, and Legrand 2017) (**Figure 24**). Par ailleurs, ces mêmes injections chez la souris ABA, on permis de prévenir le développement de l'AN chez les souris (Legrand et al. 2016) ce qui en fait une utilisation pharmacologique intéressante dans le traitement de l'AN.

La production de ces auto-Ac et leurs affinités avec les peptides régulant l'appétit semble être dépendante du microbiote intestinal et des métabolites qu'il produit, qui représentent un des moyens de signalisation possible entre le microbiote et le reste de l'organisme.

La protéine bactérienne ClpB est une protéine bactérienne qui semble directement impliquée dans le dialogue microbiote-intestin-cerveau et qui semble contribué à la régulation de la prise alimentaire en situation physiologique et pathologique.

CHAPITRE 4

Implication de la protéine ClpB dans la régulation de la prise alimentaire

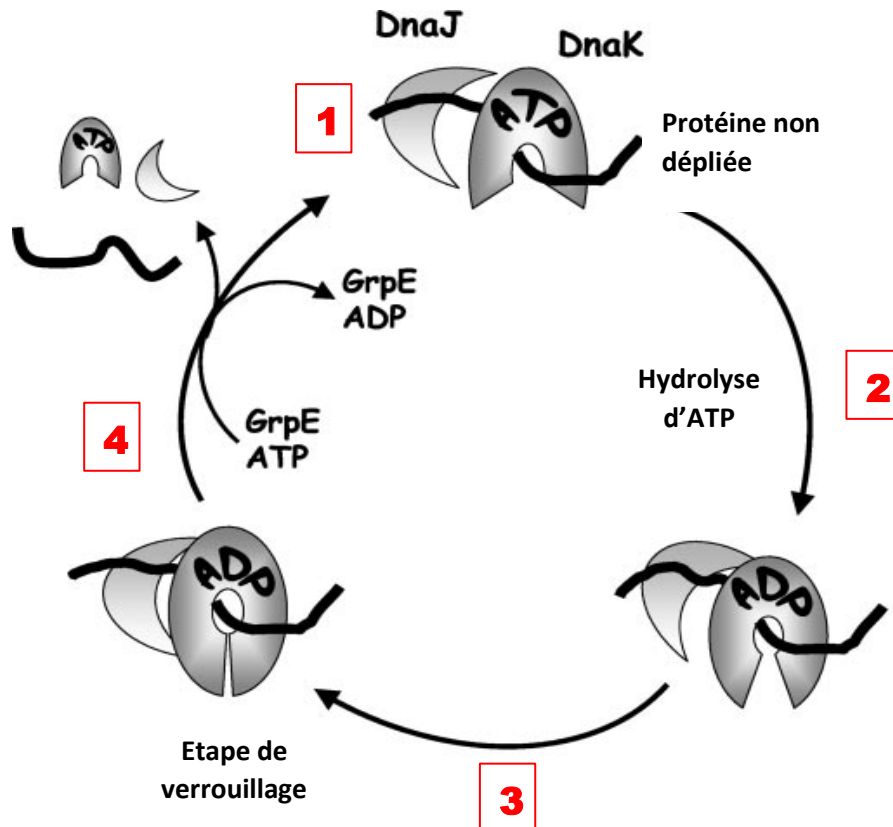


Figure 25. Modèle d'action du système DnaK /DnaJ /GrpE.

[1] Les protéines DnaK et DnaJ se lient simultanément à des sites distincts de chaînes polypeptidiques de la protéine non pliée. [2] La liaison adjacente de DnaJ et DnaK stimule l'activité ATPase intrinsèque de la DnaK ce qui conduit à des changements de conformations majeurs. [3] La forme DnaK-ADP a une affinité plus élevée pour son substrat et est capable de verrouiller les polypeptides non pliés dans son site de liaison au substrat. [4] Le facteur d'échange de nucléotides GrpE échange ensuite l'ADP avec de l'ATP et déverrouille la DnaK, pour libérer la protéine.

Issu de la publication de Linke et al., 2003

ATP : Adénosine triphosphate; ADP : Adénosine diphosphate

IV.1. FONCTION CHAPERONNE DE LA PROTEINE CLPB

IV.1.1. Généralités

Afin d'assurer le maintien de l'homéostasie des protéines qui est essentiel à la survie des cellules et de l'organisme, ces dernières doivent présenter une structure tridimensionnelle bien précise. Cependant, différents stress peuvent modifier les conditions intracellulaires (température, pH etc.) et entraîner une altération de la structure initiale de ces protéines. Cette modification conformationnelle induit une perte ou une altération de leurs fonctions potentiellement impliquée dans le développement de diverses maladies telles que Alzheimer, Parkinson (Wytttenbach and Arrigo 2013).

Afin de faire face à ce problème, les cellules ont mis au point des mécanismes d'adaptations pour assurer un maintien du protéome au sein de l'organisme – ils sont médiés par l'action des protéines chaperonnes. Il existe trois principaux systèmes de chaperons dépendants de l'ATP : le système DnaK/DnaJ/GrpE, le système GroEL/ES et le système ClpB/Hsp100. Grâce à leurs rôles bien définis et complémentaires ces systèmes coopèrent afin d'assurer leurs fonctions.

L'action de ces deux premiers systèmes consistent à protéger les protéines de l'agrégation et de générer le repliement de protéines nouvellement synthétisées, leurs conférant une conformation active et fonctionnelle. Ces systèmes peuvent également contribuer à la dégradation sélective des protéines en excès et/ou endommagées (Sauer et al. 2004). Les chaperons Clp/Hsp100, n'agissent pas sur le repliement des protéines mais elles ont la capacité de coopérer avec le système DnaK pour récupérer des protéines fonctionnelles à partir d'agrégats, une activité appelée « désagrégation de protéines ».

IV.1.2. Le système DnaK/DnaJ/GrpE (Hsp70)

De par ses interactions avec les co-chaperonnes DnaJ (Hsp40) et GrpE, la protéine DnaK (Hsp70) forme une importante machinerie qui interagit avec les substrats protéiques (Flynn et al. 1991) d'une manière ATP dépendante pour empêcher l'agrégation et favoriser le repliement des protéines (McCarty et al. 1995). En effet, en réponse à la liaison et à l'hydrolyse de l'ATP induit par la DnaJ (Hsp40), DnaK se lie avec une haute affinité aux substrats protéiques (Han and Christen 2003). Les substrats restent liés à la DnaK avec une grande affinité jusqu'à que GrpE convertisse son ADP en ATP (Packschies et al. 1997). Ensuite, la DnaK est immédiatement en mesure de démarrer un nouveau cycle de liaison au substrat protéique (**Figure 25**).

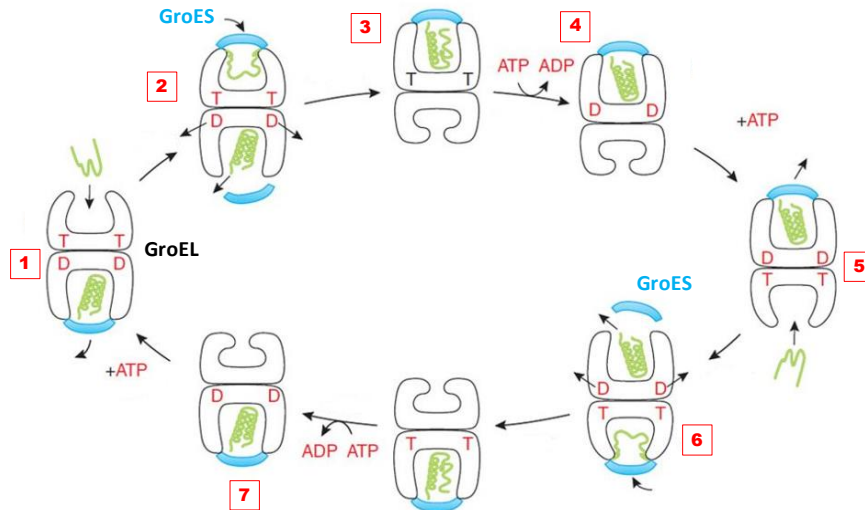


Figure 26. Modèle d'action du système GroEL/GroES.

Un cycle commence par [1] la liaison d'un polypeptide (vert) à GroEL suivi [2] d'une fixation de GroES (bleu) produisant un état dans lequel à la fois le polypeptide et GroES sont liés. [3] Une fois que GroES est relâché, il se produit d'importants mouvements qui transforment la chambre de pliage en forme de dôme. Après quelques secondes, [4] une hydrolyse de l'ATP se produit, [5] ce qui affaiblit l'assemblage et permet l'entrée de l'ATP dans l'anneau. [6] Cela envoie un signal allostérique qui permet une fixation de GroES sur l'autre partie de l'anneau, de sorte que GroES (bleu), le polypeptide (vert) et l'ADP partent. [7] Enfin un nouveau cycle de repliement commence sur le anneau lié à l'ATP.

Issu de la publication de Linke et al., 2003

ATP : Adénosine triphosphate; ADP : Adénosine diphosphate

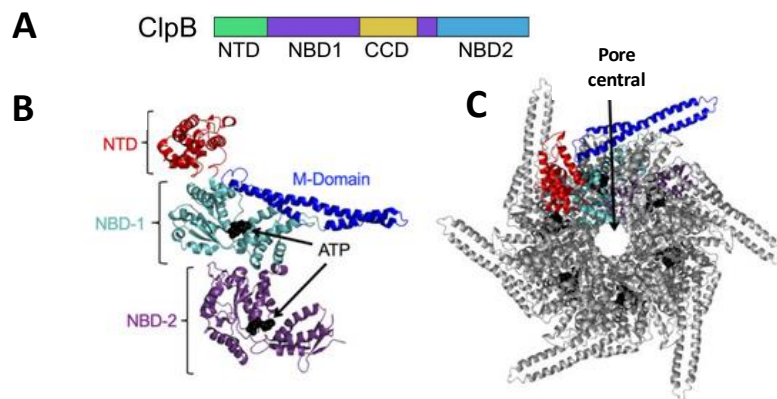


Figure 27. Structure de la protéine ClpB

(A) Domaines conservés de la protéine ClpB d'*E. coli*. La protéine ClpB est composée d'un domaine N-terminal (NTD, vert), deux domaines de liaison à l'ATP : NBD1, violet; NBD2, bleu) et d'un domaine d'insertion (CCD, jaune)

(B) Structure protomérique d'un monomère ClpB.

(C) Représentation de la forme hexamérique de la protéine ClpB constitué de plusieurs monomères

Issu de la publication de Rosenzweig et al., 2015; Lee et al., 2003

ATP : Adénosine triphosphate; ClpB : *Caseinolytic peptidase B*

IV.1.3. Le système GroEL/ES (Hsp60)

Le système GroEL est composé de 14 sous-unités identiques qui forment deux anneaux empilés, qui subissent alternativement des cycles de liaison à l'ATP et d'hydrolyses responsables de sa liaison aux protéines. En effet, les substrats protéiques non repliés se lient à une zone hydrophobe sur le bord intérieur de la cavité de GroEL formant ainsi un complexe avec la chaperonne (Xu, Horwich, and Sigler 1997). Lors de la liaison de ce complexe avec l'ATP, la co-chaperonne GroES se lie au complexe GroEL-substrat (Nojima et al. 2008), (Miyazaki et al. 2002). Cette liaison permet une rotation des sous-unités individuelles de la chaperonne de manière à ce que le substrat soit libéré dans la cavité centrale. Les actions de GroEL, ATP et GroES exercent sur le substrat des forces mécaniques pouvant entraîner le déploiement des protéines piégées et mal repliées (Lin, Madan, and Rye 2008). L'hydrolyse de l'ATP et la liaison d'une nouvelle protéine substrat dans la cavité opposée entraînent la dissociation de GroES et du substrat (Rye et al. 1997), (**Figure 26**).

IV.1.4. La protéine de désagrégation ClpB

La protéine chaperonne ClpB, connue également sous le nom de Hsp104 chez les levures et Hps100 chez les plantes appartient à la famille des protéines Clp/Hsp100. Contrairement au système GroEL/ES ou DnaK/DnaJ/GrpE, elle a la particularité de ne pas posséder de fonction dans le repliement des protéines nouvellement synthétisées ni d'activité dans la prise en charge de protéines endommagées. Elle est néanmoins essentielle au désassemblage et le déploiement des macromolécules (Schirmer et al. 1996) et donc indispensable au maintien des fonctions protéiques. Une étude a notamment montré qu'un déficit en ClpB était lié à des pathologies caractérisées par des atteintes neurologiques (Wortmann, Wevers, and de Brouwer 1993).

La forme active de la protéine ClpB est constituée d'un double anneau constitué de 8 unités. Chaque anneau est composé d'un domaine de liaison à l'ATP (NBD-1 et NBD-2) caractéristique des protéines de la famille AAA+ (Lee et al. 2003) et indispensable à l'activité de la protéine (Michal Zolkiewski 2006) (**Figure 27A,B**). Ces structures entourent un pore central (**Figure 27C**) qui contient un résidu Tyr251 permettant la liaison au substrat protéique (Weibezahn et al. 2004), (Schlieker et al. 2004).

Comme énoncé précédemment, la protéine ClpB ne possède pas d'activité dans le repliement protéique à proprement parler mais est impliquée dans le déploiement (Goloubinoff et al. 1999), (M. Zolkiewski 1999), sa coopération avec le système DnaK/DnaJ/GrpE et GroEL/ES est donc fondamentale. Cependant, les actions entre ces systèmes ne sont pas encore très claires.

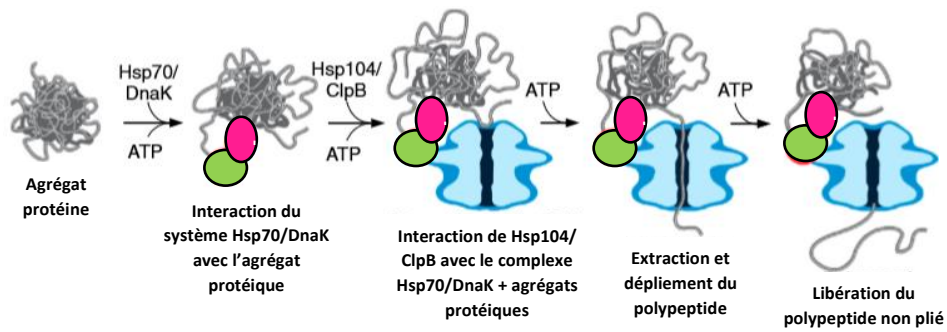


Figure 28. Modèle de désagrégation des protéines par le système DnaK/DnaJ/GprE et la protéine ClpB

Adapté de la publication de Miot et al., 2011

ATP : Adénosine triphosphate; ClpB : *Caseinolytic peptidase B*

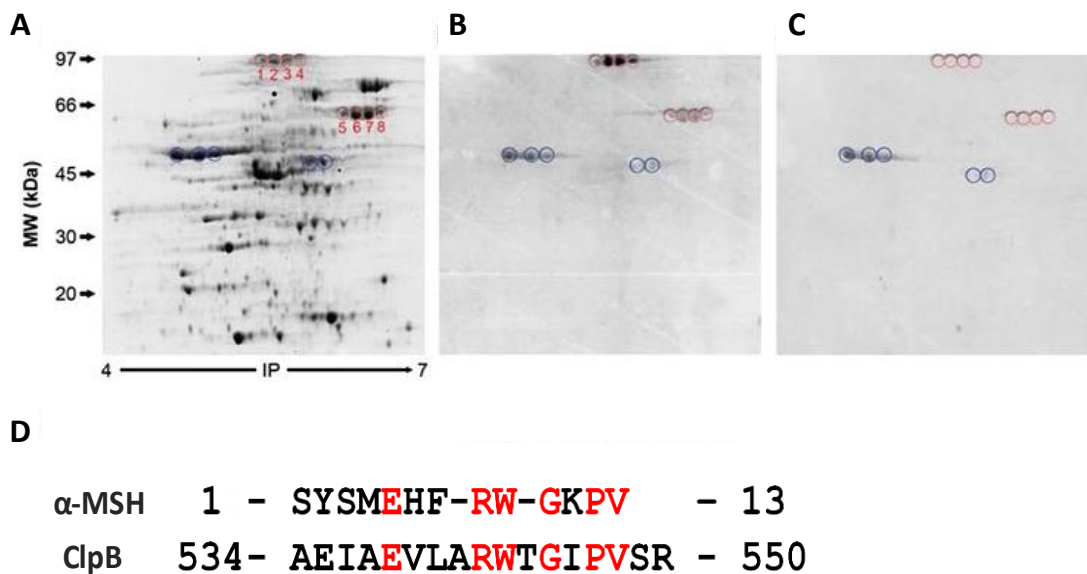


Figure 29. Identification protéomique du mimétisme moléculaire entre la protéine ClpB et l' α -MSH

(A) Analyse 2D de protéines cytoplasmiques d'*E. coli*. (B, C) Immunoblots de protéines d'*E. coli* détectés avec une IgG anti- α -MSH de lapin pré-absorbé (C) ou non (B) avec de l' α -MSH.

Les cercles de **couleur rouge** entourent les spots spécifiquement reconnus par une IgG anti- α -MSH qui est utilisée pour l'identification des protéines. Les cercles de **couleur bleu** indiquent des spots non spécifiques. Les protéines numérotées de 1 à 4 sont des isoformes de la protéine ClpB.

(D) Alignements de séquences d'acides aminés d' α -MSH et ClpB.

Issu de la publication de Tennoune et al., 2014

ClpB : *Caseinolytic peptidase B*; α -MSH : *α -melanocyte stimulating hormone*; IgG : immunoglobulines G; *E. coli* : *Escherichia coli*

A l'heure actuelle, trois hypothèses sont encore proposées (Durie, Duran, and Lucius 2018).

Une des premières hypothèses élaborée est que la protéine DnaK se lie au substrat protéique, le modifie afin d'être plus accessible à la protéine ClpB, qui peut ensuite procéder à la désagrégation des protéines (Zietkiewicz et al. 2006). La deuxième hypothèse quant à elle propose une liaison directe des agrégats avec la protéine ClpB. L'ATP produit pour cette liaison induit des modifications structurales de la protéine ClpB qui augmentent l'exposition des agrégats au système DnaK/DnaJ/GrpE (Goloubinoff et al. 1999). La troisième hypothèse conceptualisée est que les protéines DnaK et ClpB forment un complexe qui amplifie l'activité de désagrégation (Miot et al. 2011), (Rosenzweig et al. 2013), (Doyle et al. 2015) (**Figure 28**).

IV.2. PROTEINE CLPB ET REGULATION DE LA PRISE ALIMENTAIRE

IV.2.1. Spécificité de la protéine ClpB et α -MSH

A partir d'études protéomiques sur une culture d'*E. coli* K12 et en utilisant la technique de spectrométrie de masse, Tennoune et ses collaborateurs ont révélé 4 spots de hautes intensités révélés avec l'anticorps anti- α -MSH. Ces 4 spots ont été identifiés comme des isoformes de la ClpB (**Figure 29A, B, C**). Par la suite, une analyse d'homologie séquentielle des acides aminés entre l' α -MSH et la protéine ClpB a révélé une homologie de 6aa (**Figure 29D**), (Tennoune et al. 2014). La particularité de ce mimétisme séquentiel est qu'il est situé dans une des boucles inter-hélicoïdale de la structure de la protéine ClpB (Lee et al. 2003). De ce fait, il est exposé à la surface de la protéine et donc accessible à la liaison des auto-Ac pouvant faire de lui un potentiel site pharmacologique.

IV.2.2. Effets de la protéine ClpB sur la prise alimentaire *via* les Ac

L'immunisation de souris avec la protéine recombinante ClpB a permis d'induire une réaction immunitaire croisée avec l' α -MSH (Tennoune et al. 2014). En effet, les souris ayant reçu l'injection de protéine ClpB recombinante ont présenté un poids corporel inférieur au groupe témoin dans les jours suivant l'injection. *A contrario*, après avoir reçu une injection d' α -MSH, seules les souris immunisées avec la protéine ClpB étaient insensibles à l'effet anorexigène du neuropeptide. Les anticorps anti-ClpB par leur réaction croisée avec l' α -MSH sont donc responsables d'une réduction de l'activation du récepteur MC4-R en réponse à l' α -MSH, ce qui induit une augmentation de la prise alimentaire (Tennoune et al. 2014).

Par ailleurs, des gavages chroniques d'*E. coli* WT chez la souris ont réduit l'apport alimentaire et stimulé la production d'anticorps IgG et IgM anti-ClpB et anti- α -MSH contrairement aux gavages avec la souche

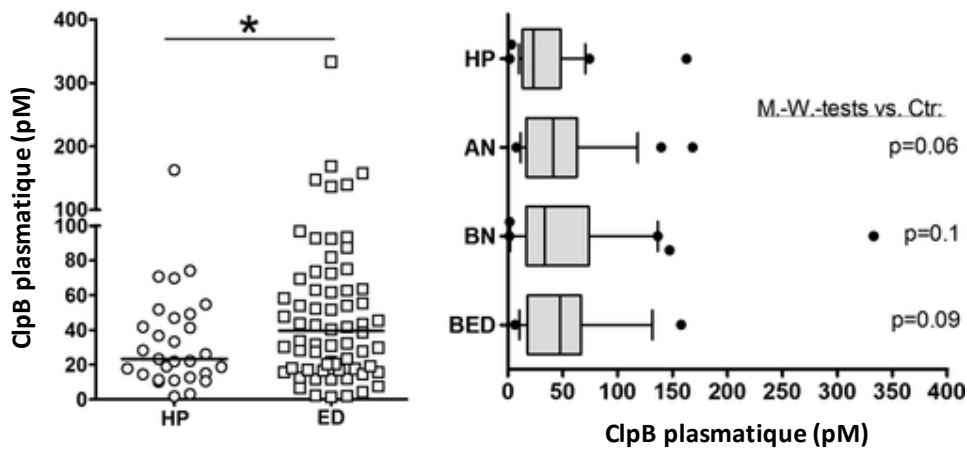


Figure 30. Comparaison des concentrations plasmatiques de ClpB chez les personnes saines (HP) ou souffrant de troubles du comportement alimentaire (ED)

Issu de la publication de Breton et al., 2016

ClpB : Caseinolytic peptidase B; AN (Anorexia nervosa) : Anorexie mentale; BED (Binge-eating disorders) : hyperphagie boulimique; BN (Bulimia nervosa) : boulimie nerveuse

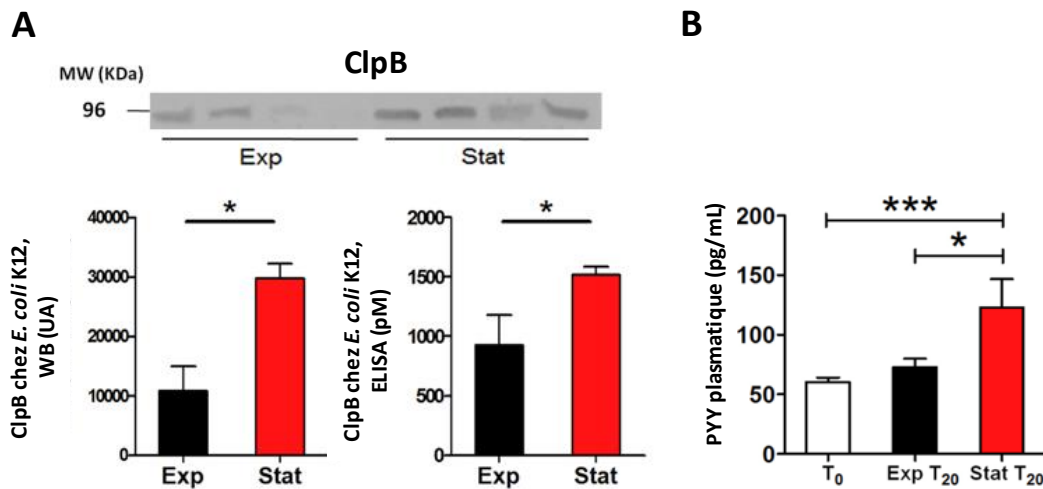


Figure 31. Identification et effets de la protéine ClpB sur des paramètres clés de la régulation de la prise alimentaire

Identification des taux de la protéine ClpB dans la phase exponentielle (EXP) et stationnaire (STAT) de croissance d'*E. coli* analysés par (A) Western-Blot et (B) ELISA. (C) Effets d'une perfusion colique de protéines issues des phases de croissance EXP et STAT d'*E. coli* sur la sécrétion de PYY chez le Rat.

Issu de la publication de Breton et al., 2016

ClpB : Caseinolytic peptidase B; PM : poids moléculaire; *E. coli* : *Escherichia coli*; PYY : Peptide YY

bactérienne *E. coli* déplétée en ClpB (*E. coli* Δ ClpB) qui n'ont induit aucun changement dans l'apport alimentaire et sur les niveaux d'anticorps. De plus, chez les patients atteints de TCA, les concentrations de ClpB étaient corrélées positivement avec les taux plasmatiques d'auto-anticorps réactifs avec l' α -MSH (Tennoune et al. 2014). Ces différents résultats impliquent donc que la protéine ClpB pourrait réguler la prise alimentaire, au moins en partie, en modifiant l'action des Ac anti- α -MSH (Tennoune et al. 2014).

IV.2.3. Effets de protéines bactériennes contenant la protéine ClpB sur la prise alimentaire

La protéine ClpB est produite par de nombreuses bactéries dont *E. coli*, une bactérie commensale de l'intestin qui appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Une étude de l'UMR 1073 s'était intéressée à comprendre l'influence de cette bactérie sur le contrôle de l'appétit *via* la libération de protéines telle que la protéine ClpB. A l'aide d'un dosage immunologique, il a pu être mis en évidence que cette protéine était présente naturellement dans le plasma des individus sains et que ses concentrations étaient plus élevées chez les individus avec un TCA sans toutefois de différence significative entre les différents types de TCA (Breton, Legrand, et al. 2016). Ces résultats descriptifs incitaient à poursuivre l'étude des liens entre la protéine ClpB bactérienne et la régulation du comportement alimentaire (**Figure 30**).

En effet, des gavages d'*E. coli* WT effectués chez la souris étaient accompagnés d'une augmentation de la concentration de ClpB au niveau plasmatique. *A contrario*, un même gavage effectué avec *E. coli* Δ ClpB n'a montré aucune augmentation du taux de ClpB au niveau plasmatique (Tennoune et al. 2014). Ce résultat a suggéré donc un lien entre la concentration plasmatique de ClpB et sa production par les bactéries du tractus gastro-intestinal.

Pour progresser dans ce questionnement, plusieurs séries d'expérimentations *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées (Breton, Tennoune, et al. 2016). Une première expérience *in vitro* a montré que cette protéine était produite en plus grande concentration pendant la phase stationnaire de croissance d'*E. coli* (**Figure 31A, B**). De plus, des injections IP (2 fois/jours) de protéines totales d'*E. coli* (0,1mg/kg) chez la souris C57Bl/6 a induit une réduction de la prise alimentaire et du poids corporel, une augmentation de la concentration plasmatique de PYY (**Figure 31C**). De plus, une expression accrue du marqueur *c-fos* dans l'ARC, identifié comme étant des neurones anorexigènes POMC a été mis en évidence après l'injection des protéines bactériennes.

Cette étude importante a suggéré que des protéines bactériennes participaient aux mécanismes de la satiété, et que cet effet était plus marqué pour les extraits protéiques plus riches en protéine ClpB. Néanmoins, cette étude n'a pas permis **de distinguer les effets propres de la protéine ClpB des autres facteurs bactériens.**

Objectifs de la thèse

L'objectif de cette thèse est d'étudier et de comprendre **les potentiels effets pharmacologiques de la protéine ClpB sur le comportement alimentaire.**

Comme expliqué précédemment, la protéine ClpB bactérienne est produite par des bactéries du microbiote intestinal telles qu'*E. coli* et d'autres bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae*. Il est aussi connu que ce microbiote est en contact permanent avec les aliments ingérés, et que mélange nutriments-microbiote peut stimuler les cellules entéro-endocrines intestinales productrices d'hormones satiétogènes tels que PYY et GLP-1. De ce fait, le type de macronutriments ingéré pourrait influencer sur les hormones libérées. Cependant aucune étude n'avait jusqu'ici montré l'influence du type de macronutriments sur la production de la protéine ClpB et si cette protéine elle-même pouvait augmenter la sécrétion de PYY. Ces questions ont été à la base de l'**ARTICLE 1, publié dans *Nutrients*.**

Des études antérieures par technique ELISA avaient montré que la protéine bactérienne ClpB était retrouvée dans le plasma d'individus sains mais aussi atteints de TCA. L'objectif de l'**ARTICLE 2** a été d'étudier si une restriction alimentaire, telle qu'elle est observée dans l'anorexie mentale, pouvait influencer les concentrations plasmatiques de ClpB. Cette étude expérimentale a été réalisée dans le modèle ABA afin d'améliorer les connaissances sur les mécanismes physiologiques impliqués dans l'anorexie. Cet article vient d'être **publié dans *Nutrients*.**

Enfin, l'injection de la bactérie *E. coli* en phase stationnaire de croissance où la quantité de la protéine ClpB est la plus importante a induit une diminution de la prise alimentaire chez le Rat laissant entrevoir des effets anorexigènes similaires à l' α -MSH. Cependant aucune étude n'a clairement mis en évidence de rôle anorexigène de la protéine ClpB. De plus, considérant la fragmentation naturelle de cette protéine, l'objectif de l'**ARTICLE 3** a été d'étudier les effets de la ClpB et de l'un de ses fragments majeurs sur la prise alimentaire. Cet article est en cours de publication dans *The Journal of Nutrition* et il est présenté sous forme de manuscrit soumis.

Outre les trois articles, l'intégration au sein de l'équipe TargEDys et de l'UMR 1073 a été l'occasion de collaborer à d'autres études sur le thème de la régulation de la prise alimentaire en lien avec le microbiote et l'axe intestin-cerveau, qui sont présentées en **ANNEXE 1 et 2.**

De plus, les travaux réalisés au cours de cette thèse ont fait l'objet de communications affichées ou orales lors de congrès qui sont présentées en **ANNEXE 3.**

RESULTATS

ARTICLE 1.

Effets des macronutriments sur la production *in vitro* de ClpB, une protéine mimétique bactérienne de l' α -MSH et son rôle éventuel dans la signalisation de la satiété*Effects of macronutrients on the in vitro production of ClpB, a bacterial mimetic protein of α -MSH and its possible role in the satiety signaling***Manon Dominique^{1,2,3}, Jonathan Breton^{2,3,4}, Charlène Guérin^{2,3}, Christine Bole-Feyssot^{2,3}, Grégory Lambert¹, Pierre Déchelotte^{1,2,3,4}, Sergueï Fetissov^{1,2,3,5*}**¹TargEDys SA, University of Rouen Normandy, 22, Boulevard Gambetta, Rouen, 76183, Cedex 1, France;²Nutrition, Gut and Brain Laboratory, Inserm UMR1073, University of Rouen Normandy, Rouen, 76183, France;³Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), University of Rouen Normandy, Rouen, 76183, France;⁴Rouen University Hospital, CHU Charles Nicolle, 76183, Rouen, France;⁵Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication, Inserm UMR1239, University of Rouen Normandy, Mont-Saint-Aignan, 76130, France.Acceptée dans *Nutrients* en Septembre 2019**RESUME**

Contexte et but de l'étude : De plus en plus d'études mettent en évidence l'influence du microbiote intestinal sur le comportement alimentaire de l'hôte. Cependant, les mécanismes mis en jeu restent encore à être élucidés. Récemment, la *Caseinolytic peptidase B* (ClpB), une protéine chaperonne de désagrégation d'*Escherichia coli*, a été identifiée comme un mimétique conformationnel de l' α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH), un neuropeptide anorexigène. Cette protéine s'est montrée nécessaire pour qu'*E. coli* WT induise un effet anorexigène chez la Souris suggérant son potentiel rôle dans la signalisation de la satiété. Afin de confirmer cette hypothèse, le but de cette étude a été d'étudier le rôle des macronutriments sur la sécrétion de ClpB et d'évaluer le rôle de cette dernière sur la sécrétion de PYY.

Matériels et méthodes : Après 48h de croissance dans un milieu Muller-Hinton, les cultures bactériennes d'*E. coli* ont été supplémentées avec trois macronutriments à une dose iso-caloriques : protéine (BSA, albumine de sérum bovin), glucide (D-fructose) et lipide (acide oléique). 2h après la supplémentation, un dosage par ELISA de la protéine ClpB a été réalisé dans le milieu de culture et dans les culots bactériens. L'expression de la protéine ClpB a été mesurée directement dans les culots bactériens. La présence de la protéine ClpB a été évaluée par une immunocytochimie à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-ClpB. Enfin, une culture de cellules de muqueuses intestinales primaires de Rat a été incubée avec la protéine ClpB recombinante intacte (ClpB96) ou bien avec des protéines



extraites d'*E. coli* WT et d'*E. coli*ΔClpB. La libération de PYY dans le surnageant a été analysée par technique ELISA.

Résultats : Les quantités iso-caloriques des trois macronutriments ajoutés à la culture continue d'*E. coli* ont augmenté l'immunoréactivité de ClpB. Cependant, une supplémentation en BSA s'est montrée nécessaire pour augmenter les niveaux protéiques et d'ARNm de ClpB dans les bactéries et les surnageants. Une concentration nanomolaire de la protéine ClpB d'*E. coli* a stimulée de manière dose-dépendante la sécrétion de PYY à partir des cultures de cellules primaires de la muqueuse intestinale de Rat. Les protéines totales extraites d'*E. coli* mais non de souches d'*E. coli* déficientes en ClpB (*E. coli* avaient également tendance à augmenter la sécrétion de PYY par ces cellules.

Conclusion : Ces données confirment un lien possible entre la protéine ClpB d'*E. coli* et la signalisation de la satiété induite par les protéines dans l'intestin.

Article

Effects of Macronutrients on the In Vitro Production of ClpB, a Bacterial Mimetic Protein of α -MSH and Its Possible Role in Satiety Signaling

Manon Dominique ^{1,2,3}, Jonathan Breton ^{2,3,4} , Charlène Guérin ^{2,3}, Christine Bole-Feysot ^{2,3}, Grégory Lambert ¹, Pierre Déchelotte ^{1,2,3,4} and Sergueï Fetissov ^{1,2,3,5,*} 

¹ TargEDys SA, Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Rouen Normandy, 22, Boulevard Gambetta, Cedex 01, 76183 Rouen, France

² Nutrition, Gut and Brain Laboratory, Inserm UMR1073, University of Rouen Normandy, 76183 Rouen, France

³ Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), University of Rouen Normandy, 76183 Rouen, France

⁴ Rouen University Hospital, CHU Charles Nicolle, 76183 Rouen, France

⁵ Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication, Inserm UMR1239, University of Rouen Normandy, 76130 Mont-Saint-Aignan, France

* Correspondence: Serguei.Fetissov@univ-rouen.fr

Received: 18 June 2019; Accepted: 1 September 2019; Published: 5 September 2019



Abstract: Gut microbiota can influence the feeding behavior of the host, but the underlying mechanisms are unknown. Recently, caseinolytic protease B (ClpB), a disaggregation chaperon protein of *Escherichia coli*, was identified as a conformational mimetic of α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH), an anorexigenic neuropeptide. Importantly, ClpB was necessary for *E. coli* to have an anorexigenic effect in mice, suggesting that it may participate in satiety signaling. To explore this further, we determined the short-term (2 h) effects of three macronutrients: protein (bovine serum albumin), carbohydrate (D-fructose) and fat (oleic acid), on the production of ClpB by *E. coli* and analyzed whether ClpB can stimulate the secretion of the intestinal satiety hormone, peptide YY (PYY). Isocaloric amounts of all three macronutrients added to a continuous culture of *E. coli* increased ClpB immunoreactivity. However, to increase the levels of ClpB mRNA and ClpB protein in bacteria and supernatants, supplementation with protein was required. A nanomolar concentration of recombinant *E. coli* ClpB dose-dependently stimulated PYY secretion from the primary cell cultures of rat intestinal mucosa. Total proteins extracted from *E. coli* but not from ClpB-deficient *E. coli* strains also tended to increase PYY secretion. These data support a possible link between *E. coli* ClpB and protein-induced satiety signaling in the gut.

Keywords: gut microbiota; satiety hormones; macronutrients; *E. coli*; ClpB; PYY

1. Introduction

The composition of the gut microbiota has been associated with host metabolic phenotypes. For instance, colonization of germ-free mice with gut microbiota harvested from conventionally raised obese or lean mice results in similar host fatness to that of the donor mice [1]. The underlying mechanisms are not completely understood. They may include both direct energy-extracting properties of the gut bacteria as well as the regulation of energy metabolism by bacteria-host interactions, including host appetite and nutrient intake [2]. For instance, proteins produced by commensal bacteria, such as *Escherichia coli*, were shown to stimulate satiety signaling in rodents [3]. The increased prevalence of *E. coli* in anorexic compared to obese individuals also supports a possible role of these common gut bacteria in the promotion of host satiety signaling [4].

The intestinal satiety pathways include the vagal afferents and the enteroendocrine cells located throughout the intestinal epithelium that secrete a variety of satiety hormones including peptide tyrosine-tyrosine (PYY). It is currently accepted that meal-derived macronutrients, i.e., protein, fat and carbohydrates, as well as products of their digestion, activate the intestinal satiety pathways by binding to receptors expressed by the enteroendocrine cells [5]. Of all the macronutrients, proteins have the best effect on satiety and are known to preferentially activate enteroendocrine L-cells to secrete PYY [6].

Gut bacteria, such as *E. coli*, reside on the surface of the gut epithelium suggesting that some bacterial metabolites and bacterial compounds generated after natural bacterial lysis can directly activate intestinal satiety pathways. It also suggests that gut bacteria could play a role in the interface between the nutrients and intestinal satiety pathways. Bacteria typically respond to nutrients by dividing and growing exponentially until they reach a threshold density of about 10^9 – 10^{12} cells/mL. At this point they enter the stationary growth phase. We have recently shown that supplying *E. coli* with regular nutrients, imitating two daily meals, induces immediate growth that continues for 20 min before entering the stationary phase. A similar dynamic of bacterial growth was observed after infusion of a nutritional medium in the rat colon, and moreover, infusion of *E. coli* proteins 2 h after onset of the stationary phase stimulated PYY secretion [3]. These data show that nutrient-induced bacterial growth dynamics in the gut correspond temporally to the activation of the intestinal satiety pathways, including PYY secretion. This suggests a functional role of gut bacteria in the regulation of host appetite [2].

Some metabolites such as short chain fatty acids (SCFA) produced during gut bacterial fermentation of mainly non-digestible fibers have been shown to activate PYY secretion [7]. It is, however, unknown whether *E. coli* can participate in macronutrient-induced activation of PYY, i.e., in triggering one of the main humoral satiety pathways. Our interest in the possible link between *E. coli* and host satiety began after the *E. coli* caseinolytic protease B (ClpB) protein was identified as a conformational mimetic of α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH), an anorexigenic neuropeptide [8]. ClpB is a 96 kDa heat shock chaperon that protects bacteria from protein aggregation [9]. The ClpB protein sequence has an α -MSH-like motif recognized by the α -MSH antibody. Importantly, ClpB was necessary for an anorexigenic effect and the reduction of body weight seen in mice treated intragastrically with *E. coli* [8]. This suggests that ClpB may participate in *E. coli*-mediated intestinal satiety signaling, but questions remain as to whether ClpB production in these bacteria is dependent on the macronutrient composition and whether ClpB can stimulate intestinal satiety pathways.

Thus, to address, at least partly, these questions, in the present work, we studied a possible role of *E. coli* ClpB in mediating the macronutrient led PYY secretion. For this purpose, we first analyzed the short-term in vitro effects of the three macronutrients (protein, carbohydrate and fat) on the production of ClpB by *E. coli*. Then we determined whether ClpB could directly stimulate the primary cell culture of rat intestinal mucosa to secrete PYY.

2. Materials and Methods

2.1. *E. coli* Bacterial Culture and Macronutrient Supplementation

E. coli K12 bacteria were cultured for 48 h at 37 °C in 40 mL of Mueller-Hinton (MH) medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) composed of beef infusion solids (2.0 g/L), casein hydrolysate (17.5 g/L), starch (1.5 g/L) at pH 7.4. Every 12 h, after a centrifugation step (4300 rpm, 5 min), the supernatant was discarded, and bacteria were supplemented by an equivalent volume of MH medium imitating two daily meals (Figure 1). Bacterial growth rate was monitored every hour by measuring the optical density using a spectrophotometer (BioMate, ThermoElectron Corporation, Waltham, MA, USA).

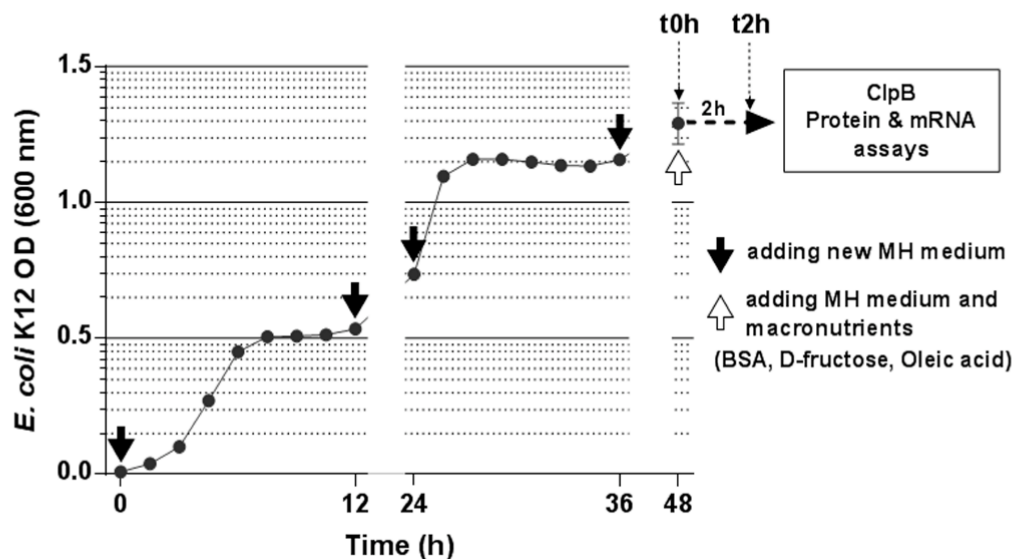


Figure 1. Growth curve of *E. coli* in continuous culture. *E. coli* K12 bacteria were cultured at 37 °C in Mueller-Hinton (MH) medium. Every 12 h, bacteria were supplemented with a new MH medium to imitate 2 daily meals (black arrow). After 48 h of culture (white arrow), ClpB mRNA and protein levels were analyzed immediately before (t0h) and 2 h after (t2h) supplementation of *E. coli* with MH medium of with isocaloric amounts of three macronutrients: BSA, D-fructose and oleic acid.

After 48 h of incubation (t0h), 20 mL of bacterial culture were taken and used for protein (10 mL) and the RNA (10 mL) extraction from the bacterial pellets after centrifugation (4300 rpm, 30 min, 4 °C). The remaining 20 mL were centrifuged (4300 rpm, 5 min), the supernatant was discarded and 20 mL of fresh MH medium or isocaloric amounts of macronutrients were added to the bacterial culture. This isocaloric amount was fixed at 1.68 calories, corresponding to the caloric value of 20 mL of MH medium.

All four experimental conditions were compared in quadruplicate: (1) “Control”, 20 mL of MH medium; (2) “Protein”, bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich, Mo, USA; 4 cal/g) was diluted in water at a concentration of 1.32 g/mL and 318 µL was adjusted by water to 20 mL; (3) “Carbohydrate”, D-fructose (Sigma; 3.73 cal/g) was diluted in water at a concentration of 1.69 g/mL and 266 µL was adjusted by water to 20 mL; (4) “Fat”, oleic acid (Sigma; 9.46 cal/g) was diluted in water at a concentration of 0.887 g/mL and 203 µL were adjusted by water to 20 mL. Although the food-derived oleic acid is mainly present in form of esters, the direct use of oleic acid was justified by the data showing that gut appetite-regulatory effects of lipids can be mediated by free fatty acids produced after hydrolysis of triglycerides [10,11].

After adding of macronutrients, the samples were incubated by stirring at 37 °C for 2 h. After 2 h of incubation (t2h), the cultures were divided in half (10 mL for protein and 10 mL for RNA extraction). After centrifugation (4300 rpm, 30 min, 4 °C), 1 mL of supernatant was recovered for the ClpB assay while protein and RNA were extracted from bacterial pellets as described below.

2.2. Immunocytochemistry

To visualize ClpB presence in bacterial cells we have used immunocytochemistry. A 20 µL sample from the bacterial pellet of each experimental condition ($n = 4$) at t0h and t2h (MH, BSA, D-fructose, oleic acid) was plated on glass slides and the bacteria were fixed with 100% ethanol at 37 °C. The glass slides were washed 3× with 0.3% phosphate-buffered saline (PBS)/Triton solution, and preincubated for 1 h with a blocking solution (PBS/5% BSA/0.3% Triton/0.2% NaN₃). For detection

of ClpB, slides were incubated with anti-ClpB monoclonal antibody (Delphi Genetics, Gosselies, Belgium) (1:50) for 1.5 h and after three washes with 0.3% PBS/Triton solution, with a secondary anti-mouse antibody (1:200) conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) (Jackson ImmunoResearch, Ely, Cambridgeshire, UK). Two drops of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma) were added to each slide to counterstain the bacterial DNA. The ClpB-immunofluorescence and DAPI staining were observed under a fluorescence microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) and images were taken using $\times 100$ objective from five areas/slide. The presence of ClpB was analyzed by quantifying the relative number of ClpB positive bacteria on the total number of DAPI stained bacteria on the visual field using ImageJ[®] software (LOCI, University of Wisconsin-Madison).

2.3. ClpB Concentration

The bacterial pellet was dissolved in a protein extraction buffer (PBS + 1% of a protease inhibitor cocktail, Sigma), sonicated (20% amplitude for 30 s) and centrifuged ($12,000\times g$, 5 min, 4 °C) to separate cellular debris from the cytoplasmic content. The latter was stored at -80 °C until the ClpB assay. ClpB protein concentrations were measured by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) previously validated and described in detail [3]. For this purpose, three antibodies were used: rabbit polyclonal anti-ClpB (Delphi Genetics) as a capture antibody, mouse monoclonal anti-ClpB as a detection antibody (Delphi Genetics) and an alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse revelation antibody (Jackson ImmunoResearch). The optical density of the ELISA reaction was measured at 405 nm using a microplate reader (Metertech 960, Taipei, Taiwan) and the ClpB concentration was determined using a ClpB (Delphi Genetics) standard curve. Each determination was performed in duplicate.

2.4. ClpB mRNA Expression

Total bacterial RNA was extracted in cold TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). After extraction, RNA concentrations were measured using a NanoDrop spectrophotometer (ThermoScientific, Waltham, MA, USA). To generate cDNA, a reverse transcription reaction was performed with 1 μ g of total RNA using of M-MLV reverse transcriptase (200 U/ μ L) (ThermoFisher). Quantitative polymerase chain reaction (PCR) was performed on all samples using a BioRad CFX96 Real Time PCR System (BioRad, Hercules, CA, USA) and SYBR Green Master Mix (Life Technologies, CA, USA). The primers for *ClpB* cDNA amplification were: 5'-GGAAAAGCAACTGGAAGCCG-3' and 3'-TACGCGATGGTGCAGTTCTT-5' ($T_m = 60$ °C) as previously described [8]. The relative, between groups, levels of ClpB mRNA expression were estimated by the inverse values of the amplification cycle threshold (Ct) for each cDNA sample curve.

2.5. Rat Primary Intestinal Culture

Animal experimental procedures were approved by the Local Ethical Committee of Normandy (approval n°5986). Seven-week old male Sprague Dawley rats were purchased from Janvier Labs (Genest-Saint-Isle, France) and were kept for 1 week in standard rat holding cages (two rats per cage) in a specialized animal facility to acclimatize them to the environmental conditions: 22 °C \pm 3 °C, relative humidity 40 \pm 20% and a 12/12 h dark/light cycle. All rats were given ad libitum access to drinking water and food (Kliba Nafag, Rheinfelden, Germany).

The protocol of the primary intestinal culture was adapted from Psichas et al. [7]. Rats were killed by decapitation, the colons and ileums were dissected and washed with an ice-cold PBS. Then, the intestinal tissue was cleaned with ice-cold L-15 (Leibowitz medium, Sigma) and digested with 0.4 mg/mL collagenase XI (Sigma) in high-glucose DMEM (+ 1% L-Glutamine + 1% Penicillin + 1% Streptomycin + 1% non-essential amino acids) for 10 min at 37 °C. Cell suspensions were centrifuged (10 min, $400\times g$) and the pellets were resuspended in high-glucose DMEM (the same as previously but with 10% Fetal Bovine Serum (FBS)). Cell suspensions were filtered through a nylon mesh (pore size 100 μ m, Merck Millipore, Burlington, MA, USA) and plated onto 24-well, 1% Matrigel-coated plates

(Corning, NY, US). The plates were incubated overnight at 37 °C in an atmosphere of 95% O₂ and 5% CO₂.

2.6. Gut Hormone Secretion Experiments

After 24 h of primary culture, intestinal cells were incubated for 20 min in a water bath with a secretion buffer (4 mM KCl, 138 mM NaCl, 1.2 mM NaHCO₃, 1.2 mM NaH₂PO₄, 2.6 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂ and 10 mM HEPES adjusted to pH 7.4 with NaOH). Recombinant 96 KDa ClpB protein (Delphi Genetics) was added to the secretion buffer at different concentrations in a pico- to a nano-molar range: 1.26 pM, 2.52 pM, 1.26 nM, 13 nM, 25 nM and 130 nM. Cells incubated with PBS were used for control. Additionally, 15 ng/μL of total protein extracted from *E. coli* K12 wild type (WT) or ClpB mutant (Δ ClpB) *E. coli* strains, previously generated in the Bernd Bukau's laboratory (Center for Molecular Biology, Heidelberg University, Germany), were tested in a similar fashion. After incubation for 20 min, the cells were treated with a lysis buffer (50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1% IGEPAL CA-630, 0.5% deoxycholic acid + protease inhibitor cocktail (Sigma). Cells were collected with a cell scraper, the lysates were centrifuged (12,000× g, 20 min,) and stored at −80 °C until the PYY assay using a Fluorescent Immunoassay Kit[®] (Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Phoenix, AZ, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.7. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using Prism 6.0 software (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). Data were analyzed using two-tailed unpaired *t*-test or Mann–Whitney test and one-way ANOVA (for a comparison between multiple groups) or two-way ANOVA (for a comparison between multiple groups and between t0h and t2h time-points) with Sidak's multiple comparisons test. Normality was evaluated by the Kolmogorov–Smirnov test. Data are shown as means ± standard error of means (SEM) and *p* < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Macronutrient Effects on ClpB Production and Expression

The bacterial growth dynamics using the 12-hourly MH culture medium provision data are shown in Figure 1. It shows the acceleration of the onset of the stationary phase after the third nutrient provision as previously reported [3]. The fifth nutrient provision, which was previously shown to trigger the onset of stationary phase in 20 min [3], was the starting point for the analysis of the effects of macronutrients on ClpB production (Figure 1).

The immunocytochemical detection of ClpB showed strong immunoreactivity only in a fraction of *E. coli* bacteria (about 14%) at t0h, before nutrient provision (Figure 2A,B). After 2 h of nutrient provision (MH medium or macronutrients), there was a visible increase in the immunoreactivity of ClpB, (Figure 2A,B) reaching about 28% of the total number of bacterial cells. This increase was significant in all experimental groups (Figure 2B). However, no significant differences in the relative increase of ClpB immunoreactivity were seen between the three macronutrient groups (Figure 2C).

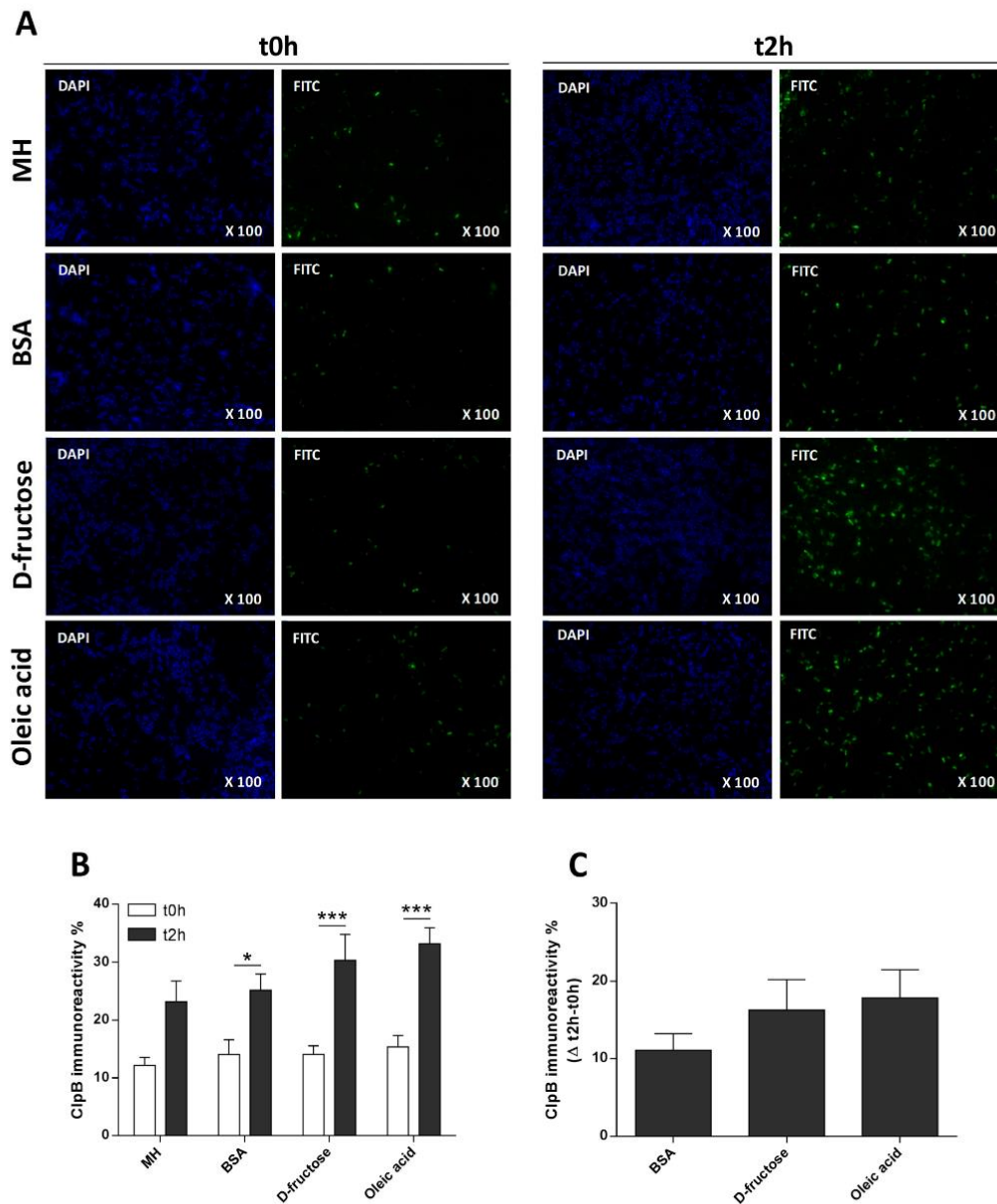


Figure 2. The effects of macronutrients on the ClpB immunoreactivity in *E. coli*. (A) Immunocytochemical detection of ClpB (FITC—green) in *E. coli* cells counterstained with DAPI (blue) at t0h (two left columns) and at t2h after supplementation with MH medium or macronutrients (two right columns). (B) The percentage of ClpB presence by the number of ClpB positive bacteria the total number of DAPI-stained bacteria (100%). (C) Relative to t0h increase in percentage of ClpB immunoreactivity at t2h after macronutrient supplementation. (B) *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$; two-way ANOVA, Sidak's multiple comparisons tests. MH t0h vs. t2h, unpaired t -test $p < 0.05$.

The effects of macronutrient provision on ClpB concentration were analyzed in bacterial cells. Whereas, the effects on the secreted fraction of ClpB were analyzed in culture medium supernatants. In bacterial cells, the concentration of ClpB increased at t2h compared to t0h only in the MH and BSA

groups (Figure 3A). Moreover, the ClpB concentration in the BSA group was higher than in the control MH and macronutrient groups (Figure 3A).

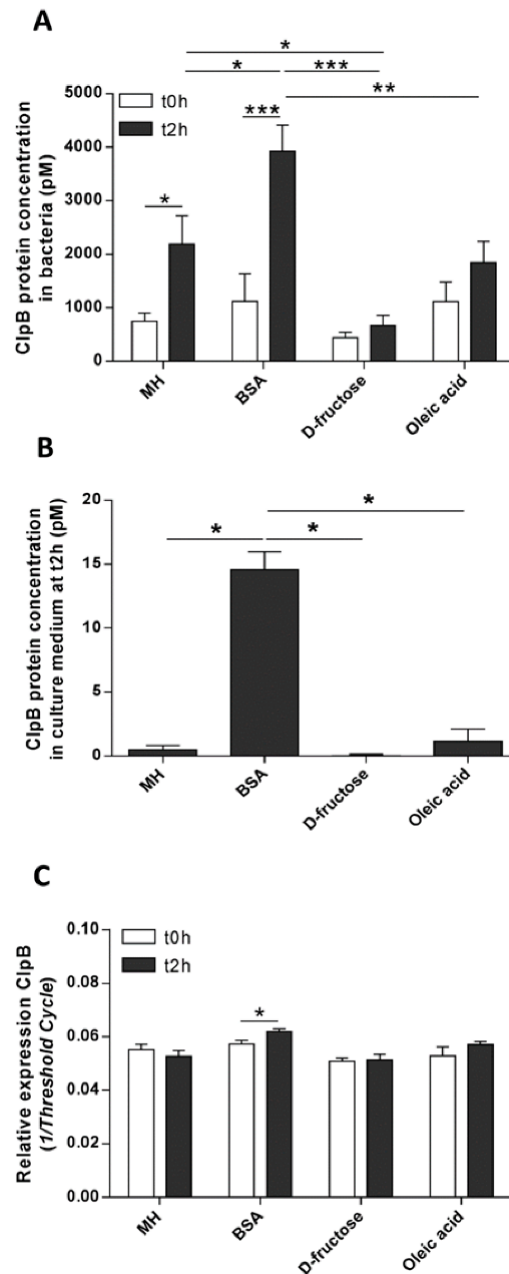


Figure 3. The effects of macronutrients on ClpB protein and mRNA expression. Concentrations of ClpB protein in bacteria (A) and in culture supernatants (B) before (t0h) and 2 h (t2h) after *E. coli* supplementation with MH medium and macronutrients. (C) The relative, between groups, levels of ClpB mRNA expression were estimated by the inverse values of the amplification cycle threshold (Ct) for each cDNA sample at t0h and at t2h. (A) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; two-way ANOVA, Sidak's multiple comparisons test. (B,C) * $p < 0.05$, Mann–Whitney tests.

Thus, the comparison of ClpB concentrations in bacterial cells between t0h and t2h demonstrates significant increases of 192% and 250% in the MH and BSA groups, respectively. No significant changes were found in the D-fructose (+51%) and oleic acid (+65%) groups.

After BSA supplementation, the ClpB protein concentration also increased in the culture medium supernatants compared to the other groups (Figure 3B).

The effect of macronutrients on the expression levels of ClpB mRNA in *E. coli* was analyzed at t0h and t2h after nutrient provision. Supplementation in BSA increased the ClpB mRNA expression (BSA, +18% vs. CTt2h) (Figure 3C). No significant differences in ClpB mRNA levels were observed between these time points among the other groups.

3.2. ClpB Effects on PYY Secretion

Incubation of the primary cell culture of rat intestinal mucosa with recombinant *E. coli* ClpB protein showed an increase of PYY secretion in a dose-dependent manner. The PYY secretion was significantly higher from the basal ClpB secretion level (+21%) starting at ClpB concentration of 1.26 nM and it was further increased (+58%) at the ClpB concentration of 130 nM (Figure 4A).

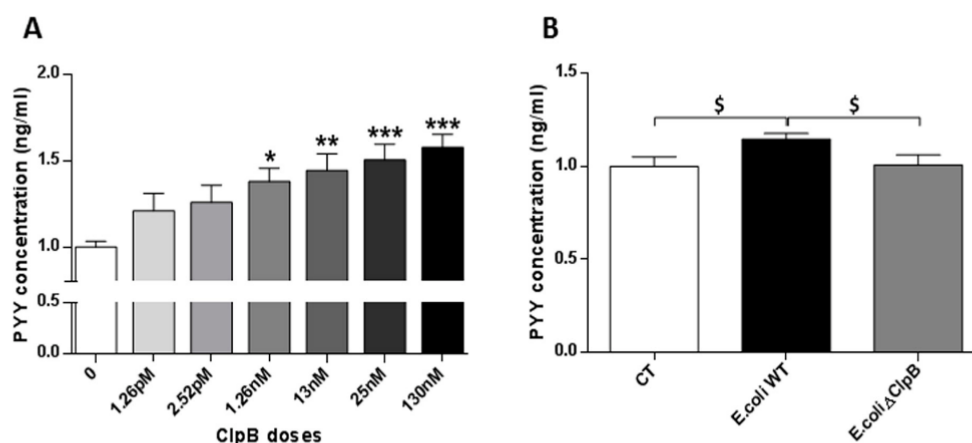


Figure 4. Effects of ClpB protein or *E. coli* total protein on peptide YY (PYY) secretion. PYY concentrations (ng/ μ L) in intestinal mucosal cell lysates after incubation with (A) increasing doses of *E. coli* recombinant ClpB protein or (B) with 15 ng/mL of total protein extracted from *E. coli* K12 wild type (WT) or *E. coli* K12 Δ ClpB. For control condition (CT), cells were incubated with PBS. (A) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (vs. basal concentration); one-way ANOVA, Sidak's multiple comparisons test. (B) $^{\$}$ $p < 0.10$, Mann–Whitney test.

To test the specificity of the ClpB-activating effect on PYY secretion among *E. coli* proteins, a primary cell culture of rat intestinal mucosa was incubated with total proteins extracted from *E. coli* WT or *E. coli* Δ ClpB strains. We found that only ClpB-containing *E. coli* protein extracts displayed a tendency to increase PYY secretion (Figure 4B).

4. Discussion

The present in vitro study revealed a differential effect of macronutrients on short-term bacterial ClpB production. This was confirmed by showing that protein supplementation was the strongest activator of both ClpB mRNA and protein levels in *E. coli*. Furthermore, we showed that *E. coli* ClpB was able to stimulate PYY secretion in rat intestinal mucosa. Taken together, these data point to the possible role of *E. coli* ClpB in the molecular signaling cascade of protein-induced satiety.

Using immunocytochemistry, we showed that ClpB immunoreactivity was detected only in a fraction of bacteria. This immunoreactivity was dependent on the duration of the stationary phase,

indicating that the functional regulation of ClpB during *E. coli*'s nutritional cycles. As such, at the end of the stationary growth phase, which is typically accompanied by the accumulation of various metabolic proteins, there is an increase in protein disaggregation to maintain cellular homeostasis. In other words, it requires increased activity of the chaperone system. To perform protein disaggregation, ClpB is bound to a molecular complex of the DnaK chaperone system [12]. It is likely that such a formation of a macromolecular complex may prevent ClpB detection by its antibody. Thus, although ClpB is expressed in every bacterial cell, its immunodetection may reflect unbound ClpB molecules which are not currently involved in the protein disaggregation process. This may explain a relatively small amount of immunopositive ClpB at t0h which corresponds to the end of the previous feeding cycles and more than 10 h of the stationary phase. In contrast, the beginning of the stationary phase (at t2h) may require less ClpB activity, this would explain its relatively high immunoreactivity. Therefore the immunodetection of ClpB appears to be independent from the ClpB production factor relevant to its functional activity. We did not observe any significant differences between the macronutrients effects on ClpB immunoreactivity. This suggests that the immunoreactivity was mainly linked to the duration of the stationary phase. Nevertheless, a non-significant trend of lower ClpB immunoreactivity in BSA vs. D-fructose or oleic acid groups suggests that protein supplementation may require more ClpB activity, in agreement with its role in protein disaggregation. Most importantly, increased ClpB production at both the mRNA and the protein levels were observed after protein supplementation. The bacteria were fed with a protein-rich, mixed macronutrient source (MH medium). This led to an increase in ClpB production, albeit to a lesser extent than the levels seen after protein only supplementation. These results confirm our previous observations in *E. coli* cultures maintained in a MH culture medium [3] and further reveal a key role of proteins in the stimulation of ClpB production.

Although the typical food has a mixed macronutrient composition, the relative amount of each macronutrient contributes differently to satiety. As such, a role of protein in the induction of prolonged satiety has been well established and may underlie the efficacy of protein-rich diets aimed at reducing total caloric intake and body weight in overweight and obese subjects [13–17]. The underlying effects may include activation by proteins and their derived peptides and amino acids of the intestinal humoral pathways of satiety such as L-cell PYY secretion [6,18]. Nevertheless, as a protein-rich diet can often lead to varying levels of PYY secretion and satiety response, there may be also co-regulatory factors interfering. Our present data, reveals an ability of *E. coli* ClpB to dose-dependently stimulate the PYY secretion, suggesting that this bacterial protein could be one of these regulatory factors. A factor that would depend on the composition of the gut microbiota i.e., on the presence of *E. coli* and possibly other species of ClpB-synthesizing bacteria. The biological significance of ClpB in the activation of host satiety (reducing nutrient intake) can be explained as a mechanism aimed at maintaining bacterial protein homeostasis. Of interest, our recent data showed that the *E. coli* ClpB protein, including the α -MSH-like motif, is specific to the order of *Enterobacteriales* and that the *Enterobacteriales* ClpB gene is depleted in gut microbiota of obese humans (submitted).

The phenomenon of the macronutrient effect on gut microbiota composition has been described as affecting preferential growth of certain bacterial families [19,20]. Similar with the macronutrient composition used in this study, it has been shown that supplementation of oleic acid increased the abundance of intestinal *Bifidobacteria* [21]. Moreover, mice fed with a diet rich in D-fructose have a lower proportion of Bacteroidetes compared to Proteobacteria [22]. A high-protein, low-carbohydrate diet resulted in increased rectal abundance of branched-chain fatty acids, reduced butyrate, and decreased *Roseburia/Eubacterium* [23]. Another rodent study also showed that rats fed protein-based foods isolated from cheese showed a significant increase in the numbers of *Bifidobacteria* or Lactobacilli in their feces [24]. No studies specifically looked at the impact of macronutrients on the *Enterobacteriales* proportion in the gut. In light of the present data, it would be interesting to see if *Enterobacteriaceae* could contribute to the beneficial anti-obesity effects of a protein-rich diet.

With regard to the potential mechanism of action of *E. coli* ClpB in meal-induced activation of PYY secretion, it is likely that it involves a cephalic unconditional reflex [25]. In fact, considering

the main location of the PYY secreting L-cells in the distal gut and their rapid activation after a meal (about 20 min), it is likely that these factors prevent their direct activation by the ingested nutrients. Thus, the cephalic reflex to ingestion by excretion of water together with previously digested nutrients and electrolytes in the gut lumen can be also involved in triggering the bacterial growth in the gut. According to such dynamics of bacterial growth, increased production of PYY, starting 20 min after nutrient provision, can be continuously stimulated by ClpB synthesized during the *E. coli* stationary phase. Indeed, our study showed that ClpB was increased in the bacterial supernatants after protein supplementation, supporting the idea that in vivo, ClpB can be released from both naturally lysed and alive bacteria in sufficient quantities to activate the enteroendocrine cells. Although the receptor linking the ClpB with PYY secretion has not yet been identified, it was shown that intestinal epithelial and L-cells express melanocortin receptors and that α -MSH can stimulate PYY secretion [26]. The presence of ClpB in the plasma of healthy humans further supports its physiological role in regulation of appetite [27]. Moreover, a slightly increased plasma ClpB level in patients with eating disorders correlated inversely with their eating disorder psychopathology and with anxiety scores supporting a direct physiological effect of this natural bacterial protein [27].

We also admit that the functional interpretations of the study results are limited to the use of a laboratory strain *E. coli* K12 bacteria and their derived ClpB protein. In fact, although *E. coli* K12 can be used as a model organism of human commensal Enterobacteria, it remains to be shown that macronutrients may influence ClpB production by those species of commensal *Enterobacteriaceae* which are commonly present in human gut and that their derived ClpB may activate the satiety pathways of the host. Moreover, considering the anaerobic conditions in the gut, we admit that the present in vitro model might not fully reflect the in vivo effects of macronutrients on ClpB production and the ClpB-mediated PYY secretion.

5. Conclusions

In conclusion, we have demonstrated that the macronutrient-dependent production of ClpB by *E. coli* was mainly due to the stimulatory effects of proteins on both ClpB mRNA and protein levels. There were no significant effects on ClpB production by fat or carbohydrates. Taken together with the dose-dependent effects of ClpB on PYY secretion from intestinal mucosal cells, our data support a possible link between *E. coli* ClpB and protein-induced satiety signaling in the gut.

Author Contributions: Conceptualization and Methodology, S.F.; Formal Analysis, M.D.; Investigation, M.D., J.B., C.G., C.B.F.; Resources, P.D, S.F., G.L.; Writing—Original Draft Preparation, M.D. and S.F.; Writing—Review & Editing, S.F., J.B., G.L., P.D.; Visualization, M.D.; Supervision, S.F.; Project Administration, S.F.; Funding Acquisition, P.D. and S.F., G.L.

Funding: Supported by European Union and Normandie Regional Council. Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Fund (ERDF). MD was supported by a PhD CIFRE program from the Ministry of Industry and Technology, France and TargEDys S.A., S.F. is supported by TMP, Inserm, France.

Conflicts of Interest: MD is an employee of TargEDys S.A.; S.F. and P.D. are co-founders and consultants of TargEDys S.A.; G.L. is the CEO of TargEDys SA. Other co-authors declare no conflict of interest.

References

1. Turnbaugh, P.J.; Ley, R.E.; Mahowald, M.A.; Magrini, V.; Mardis, E.R.; Gordon, J.I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **2006**, *444*, 1027–1131. [CrossRef]
2. Fetissov, S.O. Role of the gut microbiota in host appetite control: Bacterial growth to animal feeding behaviour. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2017**, *13*, 11–25. [CrossRef]
3. Breton, J.; Tannoune, N.; Lucas, N.; François, M.; Legrand, R.; Jacquemot, J.; Goichon, A.; Guérin, C.; Peltier, J.; Pestel-Caron, M.; et al. Gut commensal *E. coli* proteins activate host satiety pathways following nutrient-induced bacterial growth. *Cell Metab.* **2016**, *23*, 1–11. [CrossRef]
4. Million, M.; Angelakis, E.; Maraninchi, M.; Henry, M.; Giorgi, R.; Valero, R.; Vialettes, B.; Raoult, D. Correlation between body mass index and gut concentrations of *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis*, *Methanobrevibacter smithii* and *Escherichia coli*. *Int. J. Obes.* **2013**, *37*, 1460–1466. [CrossRef]

5. Spreckley, E.; Murphy, K.G. The L-Cell in Nutritional Sensing and the Regulation of Appetite. *Front. Nutr.* **2015**, *2*, 23. [[CrossRef](#)]
6. Batterham, R.L.; Heffron, H.; Kapoor, S.; Chivers, J.E.; Chandarana, K.; Herzog, H.; Le Roux, C.W.; Thomas, E.L.; Bell, J.D.; Withers, D.J. Critical role for peptide YY in protein-mediated satiation and body-weight regulation. *Cell Metab.* **2006**, *4*, 223–233. [[CrossRef](#)]
7. Psichas, A.; Sleeth, M.L.; Murphy, K.G.; Brooks, L.; Bewick, G.A.; Hanyaloglu, A.C.; Ghatei, M.A.; Bloom, S.R.; Frost, G. The short chain fatty acid propionate stimulates GLP-1 and PYY secretion via free fatty acid receptor 2 in rodents. *Int. J. Obes.* **2015**, *39*, 424–429. [[CrossRef](#)]
8. Tennoune, N.; Chan, P.; Breton, J.; Legrand, R.; Chabane, Y.N.; Akkermann, K.; Jarv, A.; Ouelaa, W.; Takagi, K.; Ghoulali, I.; et al. Bacterial ClpB heat-shock protein, an antigen-mimetic of the anorexigenic peptide [alpha]-MSH, at the origin of eating disorders. *Transl. Psychiatry* **2014**, *4*, e458. [[CrossRef](#)]
9. Mogk, A.; Schlieker, C.; Strub, C.; Rist, W.; Weibezahn, J.; Bukau, B. Roles of Individual Domains and Conserved Motifs of the AAA+ Chaperone ClpB in Oligomerization, ATP Hydrolysis, and Chaperone Activity. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 17615–17624. [[CrossRef](#)]
10. Little, T.J.; Russo, A.; Meyer, J.H.; Horowitz, M.; Smyth, D.R.; Bellon, M.; Wishart, J.M.; Jones, K.L.; Feinle-Bisset, C. Free Fatty Acids Have More Potent Effects on Gastric Emptying, Gut Hormones, and Appetite Than Triacylglycerides. *Gastroenterology* **2007**, *133*, 1124–1131. [[CrossRef](#)]
11. Madsen, J.L.; Damgaard, M.; Fuglsang, S.; Dirksen, C.; Holst, J.J.; Graff, J. Gastrointestinal motility, gut hormone secretion, and energy intake after oral loads of free fatty acid or triglyceride in older and middle-aged men. *Appetite* **2019**, *132*, 18–24. [[CrossRef](#)]
12. Mogk, A.; Schlieker, C.; Friedrich, K.L.; Schonfeld, H.J.; Vierling, E.; Bukau, B. Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 31033–31042. [[CrossRef](#)]
13. Blachier, F.; Beaumont, M.; Portune, K.J.; Steuer, N.; Lan, A.; Audebert, M.; Khodorova, N.; Andriamihaja, M.; Airinei, G.; Benamouzig, R.; et al. High-protein diets for weight management: Interactions with the intestinal microbiota and consequences for gut health. A position paper by the my new gut study group. *Clin. Nutr.* **2019**, *38*, 1012–1022. [[CrossRef](#)]
14. Drummen, M.; Tischmann, L.; Gatta-Cherifi, B.; Adam, T.; Westerterp-Plantenga, M. Dietary Protein and Energy Balance in Relation to Obesity and Co-morbidities. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 443. [[CrossRef](#)]
15. Skov, A.R.; Toubro, S.; Ronn, B.; Holm, L.; Astrup, A. Randomized trial on protein vs carbohydrate in ad libitum fat reduced diet for the treatment of obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **1999**, *23*, 528–536. [[CrossRef](#)]
16. Aller, E.E.; Larsen, T.M.; Claus, H.; Lindroos, A.K.; Kafatos, A.; Pfeiffer, A.; Martinez, J.A.; Handjjeva-Darlenska, T.; Kunesova, M.; Stender, S.; et al. Weight loss maintenance in overweight subjects on ad libitum diets with high or low protein content and glycemic index: The DIOGENES trial 12-month results. *Int. J. Obes.* **2014**, *38*, 1511–1517. [[CrossRef](#)]
17. Astrup, A.; Raben, A.; Geiker, N. The role of higher protein diets in weight control and obesity-related comorbidities. *Int. J. Obes.* **2015**, *39*, 721–726. [[CrossRef](#)]
18. Belza, A.; Ritz, C.; Sorensen, M.Q.; Holst, J.J.; Rehfeld, J.F.; Astrup, A. Contribution of gastroenteropancreatic appetite hormones to protein-induced satiety. *Am. J. Clin. Nutr.* **2013**, *97*, 980–989. [[CrossRef](#)]
19. Holmes, A.J.; Chew, Y.V.; Colakoglu, F.; Cliff, J.B.; Klaassens, E.; Read, M.N.; Solon-Biet, S.M.; McMahon, A.C.; Cogger, V.C.; Ruohonen, K.; et al. Diet-Microbiome Interactions in Health Are Controlled by Intestinal Nitrogen Source Constraints. *Cell Metab.* **2017**, *25*, 140–151. [[CrossRef](#)]
20. Madsen, L.; Myrmet, L.S.; Fjaere, E.; Liasset, B.; Kristiansen, K. Links between Dietary Protein Sources, the Gut Microbiota, and Obesity. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 1047. [[CrossRef](#)]
21. Mujico, J.R.; Baccan, G.C.; Gheorghe, A.; Diaz, L.E.; Marcos, A. Changes in gut microbiota due to supplemented fatty acids in diet-induced obese mice. *Br. J. Nutr.* **2013**, *110*, 711–720. [[CrossRef](#)]
22. Do, M.H.; Lee, E.; Oh, M.J.; Kim, Y.; Park, H.Y. High-Glucose or -Fructose Diet Cause Changes of the Gut Microbiota and Metabolic Disorders in Mice without Body Weight Change. *Nutrients* **2018**, *10*, 761. [[CrossRef](#)]
23. Russell, W.R.; Gratz, S.W.; Duncan, S.H.; Holtrop, G.; Ince, J.; Scobbie, L.; Duncan, G.; Johnstone, A.M.; Lobleby, G.E.; Wallace, R.J.; et al. High-protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health. *Am. J. Clin. Nutr.* **2011**, *93*, 1062–1072. [[CrossRef](#)]

24. Sprong, R.C.; Schonewille, A.J.; van der Meer, R. Dietary cheese whey protein protects rats against mild dextran sulfate sodium-induced colitis: Role of mucin and microbiota. *J. Dairy Sci.* **2010**, *93*, 1364–1371. [[CrossRef](#)]
25. Pavlov, I.P. *The Work of the Digestive Glands*; Charles Griffin Co. Ltd.: London, UK, 1902.
26. Panaro, B.L.; Tough, I.R.; Engelstoft, M.S.; Matthews, R.T.; Digby, G.J.; Møller, C.L.; Svendsen, B.; Gribble, F.; Reimann, F.; Holst, J.J.; et al. The melanocortin-4 receptor is expressed in enteroendocrine L cells and regulates the release of peptide YY and glucagon-like peptide 1 in vivo. *Cell Metab.* **2014**, *20*, 1018–1029. [[CrossRef](#)]
27. Breton, J.; Legrand, R.; Akkermann, K.; Järv, A.; Harro, J.; Déchelotte, P.; Fetissof, S.O. Elevated plasma concentrations of bacterial ClpB protein in patients with eating disorders. *Int. J. Eat. Disord.* **2016**, *49*, 805–808. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ARTICLE 2.

Modifications du microbiote et de la protéine bactérienne *Caseinolytic peptidase B* pendant la restriction alimentaire chez la souris : intérêt pour l'apparition et la perpétuation de l'anorexie mentale

Changes in microbiota and bacterial protein Caseinolytic peptidase B during food restriction in mice: relevance for the onset and perpetuation of anorexia nervosa

Manon Dominique^{1,2,3}, Romain Legrand¹, Marie Galmiche^{1,2,3}, Saïda Azhar¹, Camille Deroissart¹, Charlène Guérin^{2,3}, Jean-Luc do Rego^{3,5}, Fatima Leon^{3,5}, Séverine Nobis^{3,5}, Grégory Lambert¹, Nicolas Lucas¹, Pierre Déchelotte^{1,2,3,4*}

¹TargEDys SA, University of Rouen Normandy, 22, Boulevard Gambetta, Rouen, 76183, Cedex 1, France;

²Nutrition, Gut and Brain Laboratory, Inserm UMR1073, University of Rouen Normandy, Rouen, 76183, France;

³Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), University of Rouen Normandy, Rouen, 76183, France;

⁴Rouen University Hospital, CHU Charles Nicolle, 76183, Rouen, France;

⁵Animal Behavior Platform, Service Commun d'Analyse Comportementale (SCAC), University of Rouen Normandy, 76183 Rouen, France.

Accepté dans *Nutrients* en Septembre 2019

RESUME

Contexte et but de l'étude : Le microbiote intestinal contribue à la régulation du comportement alimentaire et pourrait être impliqué dans la physiopathologie de l'anorexie mentale. La *Caseinolytic peptidase B* (ClpB), produite principalement par la famille des *Enterobacteriaceae* a été identifiée comme étant un mimétique conformationnel de l' α -MSH qui pourrait lui conférer des effets anorexigènes similaires. Le but de cette étude a été de mettre en évidence le rôle du microbiote et de la protéine ClpB dans la dérégulation et l'auto-entretien de l'anorexie mentale.

Matériels et Méthodes : Des souris mâles C57Bl/6 ont été soumises au protocole ABA (*Activity-Based Anorexia*) : après 5 jours d'acclimatation, les souris ABA et LFA (*Limited Food Access*) qui recevaient la même quantité de nourriture que les souris ABA mais sans activité physique avaient progressivement un accès à la nourriture limité jusqu'au 17^{ème} jour. Au 10^{ème} et 17^{ème} jour, la perméabilité colique a été mesurée *ex vivo* par le flux de FITC-Dextran à travers la muqueuse colique montée en Chambre de Ussing. Les concentrations plasmatiques de ClpB et les taux d'anticorps IgG et IgM anti-ClpB et anti- α -MSH ont été mesurées par technique ELISA. La proportion d'*Enterobacteriaceae* dans le contenu colique a été analysée par qPCR. L'expression de POMC dans l'hypothalamus a été mesurée par RT-qPCR.

Résultats : Comme prévu, la restriction alimentaire a entraîné une perte de poids du 6^{ème} au 17^{ème} jour chez les souris LFA et ABA par rapport au souris témoins. Au 10^{ème} jour, la perméabilité du côlon et la concentration plasmatique de la protéine ClpB étaient significativement augmentées chez les souris LFA et ABA par rapport aux témoins. Au 17^{ème} jour, la concentration plasmatique de ClpB était augmentée chez les souris LFA et ABA et était corrélée à la proportion d'*Enterobacteriaceae* dans les fèces seulement chez les souris ABA. L'ARNm de POMC était augmenté dans l'hypothalamus des souris ABA et LFA au 10^{ème} et 17^{ème} jour.

Conclusion : L'ensemble de ces données confirme une augmentation des taux systémiques de la protéine ClpB dans un modèle d'anorexie expérimentale. Ces concentrations anormalement élevées de ClpB et tous les facteurs associés peuvent donc contribuer à l'initiation et/ou à la perpétuation de l'anorexie mentale en interférant avec la signalisation de la satiété.



ABSTRACT

Microbiota contributes to the regulation of eating behavior and might be implicated in the pathophysiology of anorexia nervosa. ClpB (Caseinolytic peptidase B) protein produced mainly by the *Enterobacteriaceae* family has been identified as a conformational mimetic of α -MSH, which could result in similar anorexigenic effects. The aim of this study was to highlight the role of the microbiome and the ClpB protein in deregulation and self-maintenance of anorexia pathology. Male C57Bl/6 mice were undergone to the ABA (Activity-Based Anorexia) protocol: after 5 days of acclimatization, both ABA and LFA (Limited Food Access) mice had progressively limited access to food until D17. At the end of protocol, the plasma ClpB concentration and *Enterobacteriaceae* DNA in colonic content were measured. As expected, dietary restriction induced lost weight in LFA and ABA mice. At D10, colonic permeability and plasma concentration of the ClpB protein were significantly increased in LFA and ABA mice vs controls. At D17, plasma concentration of ClpB was increased in LFA and ABA mice and, it was correlated with proportion of *Enterobacteriaceae* in the faeces. These abnormally high ClpB concentrations and all associated factors, and therefore might contribute to the initiation and/or perpetuation of anorexia nervosa by interfering with satiety signaling.

Keywords: Anorexia, Food restriction, ClpB, microbiota, *Enterobacteriaceae*

Article

Changes in Microbiota and Bacterial Protein Caseinolytic Peptidase B During Food Restriction in Mice: Relevance for the Onset and Perpetuation of Anorexia Nervosa

Manon Dominique ^{1,2,3}, Romain Legrand ¹ , Marie Galmiche ^{1,2,3}, Saïda Azhar ¹, Camille Deroissart ¹, Charlene Guérin ^{2,3}, Jean-Luc do Rego ^{3,4}, Fatima Leon ^{3,4}, Séverine Nobis ^{3,4}, Grégory Lambert ¹ , Nicolas Lucas ¹ and Pierre Déchelotte ^{1,2,3,5,*}

¹ TargEDys SA, University of Rouen Normandy, 76183 Rouen, France; mdominique@targedys.com (M.D.); legrandromain@hotmail.fr (R.L.); mgalmiche@targedys.com (M.G.); saïda-az@hotmail.fr (S.A.); camillederoissart@gmail.com (C.D.); glambert@targedys.com (G.L.); lucasnicolas@hotmail.fr (N.L.)

² Inserm UMR1073, Nutrition, Gut and Brain Laboratory, University of Rouen Normandy, Unirouen, 76183 Rouen, France; charlene.guerin@univ-rouen.fr

³ Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), University of Rouen Normandy, Unirouen, 76183 Rouen, France; jean-luc.do-rego@univ-rouen.fr (J.-L.d.R.); Fati.jpl@free.fr (F.L.); severine-nobis@orange.fr (S.N.)

⁴ Animal Behavior Platform, Service Commun d'Analyse Comportementale (SCAC), University of Rouen Normandy, 76183 Rouen, France

⁵ Rouen University Hospital, CHU Charles Nicolle, 76183 Rouen, France

* Correspondence: Pierre.Dechelotte@chu-rouen.fr; Tel.: +2-35-14-82-20

Received: 9 September 2019; Accepted: 15 October 2019; Published: 18 October 2019



Abstract: Microbiota contributes to the regulation of eating behavior and might be implicated in the pathophysiology of anorexia nervosa. ClpB (Caseinolytic peptidase B) protein produced mainly by the *Enterobacteriaceae* family has been identified as a conformational mimetic of α -MSH, which could result in similar anorexigenic effects. The aim of this study was to highlight the role of the microbiome and the ClpB protein in deregulation and self-maintenance of anorexia pathology. Male C57Bl/6 mice were undergone to the ABA (Activity-Based Anorexia) protocol: after 5 days of acclimatization, both ABA and LFA (Limited Food Access) mice had progressively limited access to food until D17. At the end of protocol, the plasma ClpB concentration and *Enterobacteriaceae* DNA in colonic content were measured. As expected, dietary restriction induced lost weight in LFA and ABA mice. At D10, colonic permeability and plasma concentration of the ClpB protein were significantly increased in LFA and ABA mice vs. controls. At D17, plasma concentration of ClpB was increased in LFA and ABA mice and, it was correlated with proportion of *Enterobacteriaceae* in the faeces. These abnormally high ClpB concentrations and all associated factors, and therefore might contribute to the initiation and/or perpetuation of anorexia nervosa by interfering with satiety signaling.

Keywords: anorexia; food restriction; ClpB; microbiota; *Enterobacteriaceae*

1. Introduction

Eating Disorders (ED) are public health problems that have continued to worsen in recent years with a prevalence of 3.5% from 2000–2006 to 7.8% in 2013–2018 [1]. Among these disorders, anorexia nervosa (AN) is characterized by a difficulty in maintaining a minimum weight and an obsession with weight and body shape [2], the pathophysiology of which is multifactorial and remains partially debated [3].

Among the proposed mechanisms of AN, the role of the gut microbiota in regulating the physiology of AN is increasingly recognized [4,5]. Indeed, studies have shown that intestinal microbial composition is influenced directly by food, in the short and long term [6–8]. Conversely, behavior [9] and appetite [10] are modulated at least in part by several gut-microbiota derived signals, among which bacterial products (e.g., peptides, neurotransmitters) have been shown to influence peripheral and central mechanisms of satiety, reward [11,12] and anxiety [13]. Finally, microbiota composition is implicated in the regulation of body composition: dysbiosis has been reported both in obese individuals [14] and in patients with AN [15]. Moreover, increased *Escherichia coli*, a leading representative of *Enterobacteriaceae* in gut microbiota was also observed in anorexic patients [16]. Altogether, these data strongly suggest that dysfunction of the microbiota-intestine-brain axis in response to exogenous triggering factors might be a key factor in the onset and/or perpetuation of ED [10,17]. Communication between microbiota, gut and brain may rely on various microbiota-derived signals, such as proteins, peptides, monoamines, metabolites, or even gut-produced immunoglobulins gaining access to the brain or modulating afferent neuronal or hormonal regulations generated in the splanchnic area [17]. Among bacterial proteins, ClpB (Caseinolytic peptidase B), a heat shock protein produced by *Enterobacteriaceae* [18] including *E. coli* is of particular relevance to the control of satiety [19] since it holds in common a six amino acid discontinuous epitope sharing molecular mimicry with α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH), the main central neuropeptide signaling satiety in the hypothalamus [20,21]. In addition, other studies have shown that α -MSH could also be found at peripheral level [22]. Moreover, α -MSH could induce the activation of MC4R present on intestinal enteroendocrine L cells [22,23]. Through this specificity, ClpB could stimulate the secretion by enteroendocrine L cells of the satiating hormones GLP-1 or PYY and activate vagal and hormonal pathways leading to hypothalamic activation of the POMC neurons releasing α -MSH [10,11]. In accordance with a role of this protein in the physiological and pathological regulation of eating behavior, ClpB was found naturally in the plasma of healthy subjects and at a higher level in patients with eating disorders [24].

In addition to the direct effect of ClpB mentioned previously, the hypothesis that microbial proteins may also modulate eating behavior through the intestinal production of specific immunoglobulins (Ig) can be suggested. Indeed, previous reports have detected Ig which react with α -MSH, in the sera of both healthy individuals and rats [25]. The levels of these Ig correlate with psychological traits characteristic of eating disorders [25]. This suggests that α -MSH reactive Ig may interfere with melanocortin signaling in both normal and pathological conditions. Moreover, a recent study showed that the levels of α -MSH-reactive IgG, the binding of melanocortin 4 receptor (MC4R) and the cellular internalization rate of MC4R-expressing cells were all lower in obese subjects [26]. Inverse results were found in anorexic and bulimic patients [26]. Other studies also confirmed the implication of α -MSH reactive Ig in the physiological regulation of feeding and mood [27]. In patients with eating disorders, increasing ClpB plasma levels correlated with plasma levels of anti-ClpB and anti- α -MSH Ig [19]. These factors emphasize the physiological involvement of anti- α -MSH Ig in the regulation of food intake.

Thus, bacterial ClpB protein appears as a candidate for interfering with endogenous pathway of satiety regulation. To get further insights in its involvement during food restriction, we performed the present study in a well-established model of food restriction in rodents, the Activity-Based Anorexia (ABA) model, and evaluated the impact of food restriction on the plasma ClpB protein and its related Ig and on the proportion of *Enterobacteriaceae*.

2. Materials and Methods

2.1. Animal Experimentation

Animal experimentation procedures were approved by the Local Ethical Committee of Normandy (approval CENOMEXA n°1112–05). Male C57Bl/6 mice (Janvier Labs, Genest-Saint-Isle, France), at 7 weeks old were kept in holding cages (four mice per cage) at environmental conditions 22 °C \pm 3 °C

and relative humidity of $40 \pm 20\%$ on a 12 h light-dark cycle with lights on at 10:00 a.m. During acclimatization period, all mice were given *ad libitum* access to water and standard food (Kliba Nafag, Germany).

At D1 of the protocol, all mice were randomized individually into 3 groups: An *ad libitum* group (Control, $n = 16$), a limited-food access group (LFA, $n = 16$) and an activity-based anorexia group (ABA, $n = 16$). ABA mice were placed individually in cages with an activity wheel connected to Running Wheel[®] software (Intellibio, Seichamps, France).

Food access was progressively limited in ABA and LFA groups from 6 h per day at D6, to 3 h at D9 and until the end of the experiment. Mice always had free access to water. Body weight, water and food intake were measured at 9:00 a.m. each day.

At D10, 8 mice of each group were chosen according to their weight and were anaesthetized by ketamine/xylazine (Imalgene[®] 1000, Murial/Xylazine Rompun 2%, Bayer) intraperitoneally and were euthanized by decapitation. Blood samples were taken from the mesenteric artery before decapitation. The hypothalamus was taken to perform qPCR to analyze the anorexigenic (POMC) and orexigenic (AgRP) neuronal populations. Intracolonic faeces were taken to perform qPCR to analyze the *Enterobacteriaceae* DNA. The plasma was recovered after centrifugation ($3000 \times g$, 20 min, 4°C). Samples were taken and stored at -80°C if their analysis was not done immediately.

At D17, the end of the experiment, remaining mice underwent the same procedures as D10.

2.2. Permeability

Colon permeability was assessed by measured FITC-dextran (4 kDa) (Sigma) by Ussing chambers. FITC-dextran (5 mg/mL) was placed on the mucosal side. After 3 h at 37°C , medium from the serosal side was removed and stored at -80°C . The fluorescence level of FITC-dextran (excitation at 485 nm, emission at 535 nm) was measured in a 96-well black plate with spectrometer Chameleon V (Hidex, Turku, Finland). Values were converted to concentration (mg/mL) using a concentration standard curve.

2.3. ClpB Concentration

The presence of the protein ClpB was measured by the technique of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) previously described by Breton et al., 2016 [9]. For this, two antibodies were used: rabbit polyclonal anti-ClpB (Delphi Genetics, Brussels, BEL) and a mouse monoclonal antibody anti-ClpB (Delphi Genetics, Brussels, BEL). The optical density was determined at 405 nm using a microplate reader Infinite F50 (Tecan Life Sciences, Switzerland). Each determination was performed in duplicate.

2.4. ClpB and α -MSH Ig Assay

Plasma levels of Ig reacting with ClpB or α -MSH were measured using enzyme-linked immunosorbent assay according to a published protocol [28]. For this, a concentration of 2 $\mu\text{g/mL}$ of ClpB protein (Delphi Genetics, Brussels, BEL) or α -MSH peptides (Bachem, Budendorf, Swiss) were used to coat 96-well Maxisorp plates (Nunc, Rochester, NY, USA). Mice plasma samples were diluted at 1:200 in dissociative buffer (3 M NaCl and 1.5 M glycine buffer, pH 8.9) to determine the total Ig levels. Two antibodies were used for detection: Alkaline phosphatase (AP)-conjugated goat anti-mouse IgG or anti-mouse IgM (1:2000) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, St. Thomas Place, Ely, UK). The optical density was determined at 405 nm using an Infinite F50 microplate reader (Tecan Life Sciences, Switzerland). Blank optical density values (without the addition of plasma samples) were subtracted from the sample optical density values. Each sample was done in duplicate.

2.5. qPCR Assay for Faecal *Enterobacteriaceae* DNA

Enterobacteriaceae DNA in faeces were extracted with the ZymoBIOMICS Kit according to the protocol given by the supplier (ZymoResearch, Irvine, CA, USA). After extraction, the total DNA was quantified using a NanoDrop spectrophotometer (ThermoScientific, Waltham, MA, USA). qPCR

was performed on 1 ng/ μ L of DNA and with Light Cycler[®]480 SYBR[®] Green I Master (Roche, Swiss). The primers for detection of *Enterobacteriaceae* were: 5'-TGTGCCCAGATGGGATTAGC-3' and 3'-TTAACCTTGCGGCCGTAATC-5'. The relative quantity of each DNA was calculated using standard curves normalized to a reference *16s DNA* gene.

2.6. RT-qPCR Assay for Hypothalamus Neuronal Populations mRNA

Hypothalamic total RNA was extracted within cold TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). After extraction, the total RNA was quantified using a NanoDrop spectrophotometer (ThermoScientific, Waltham, MA, USA). cDNA was generated by reverse transcription with 1 μ g of total RNA using M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/ μ L) (ThermoFisher, Waltham, MA, USA). RT-qPCR was performed on all samples using a BioRad CFX96 Real Time PCR System (BioRad, Hercules, CA, USA) and SYBR Green Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The primers for detection of *pomc* were: 5'-CCTCCTGCTTCAGACCTCCA-3' and 5'-GGCTGTTTCATCTCCGTTGC-3'; for *agrp*, 5'-GCAGACCGAGCAGAAGAT-3' and 5'-CTGTTGTCCCAAGCAGGA-3'. The relative quantity of each mRNA was calculated from standard curves, normalized to a reference *gapdh* gene.

2.7. Statistical Analysis

Data are shown as means \pm standard error of means (SEM). Before statistical analysis the normality was evaluated by the Kolmogorov-Smirnov test. Then, statistical significance was calculated by the unpaired *t*-test, one-way ANOVA or two-way ANOVA, as appropriate. All statistical calculations were performed using Prism 6.0 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) and $p < 0.05$ was considered as significant.

3. Results

3.1. Body Weight and Food Intake

During the adaptation phase (D1–D6), the animals had the weight between 20 g and 25 g. From the beginning of the dietary restriction (D6), the animals started to lose weight. The ABA and LFA mice lost significant weight compared to the control (** $p < 0.01$, D7, D8). This difference in weight loss continues until the end of the experiment (D17) (** $p < 0.001$, D9 to D17). From D10 until the end of endurance, ABA mice lost significantly more weight than the LFA mice (* $p < 0.05$, D10, D12; ** $p < 0.01$, D13 to D17) (Supplementary data, Figure 1A).

Food intake (Supplementary data, Figure 1B) of ABA mice increased between D4 and D6 as compared to LFA and the control mice (** $p < 0.001$) (Supplementary data, Figure 1B), (** $p < 0.001$, D6) (Supplementary data, Figure 1C). However, since the beginning of the limited access to food (D7), food intake decreased significantly in all groups (** $p < 0.001$) (Supplementary data, Figure 1B,C). At D10, when access time to food is shortest, food intake was significantly reduced compared to D6 (before restriction) (** $p < 0.001$) with a reduction of 34% in the LFA group and 58% in the ABA group (Supplementary data, Figure 1C).

From D11, restriction was even intensified for the ABA group compared to the LFA group (* $p < 0.05$, D12; ** $p < 0.01$, D13; ** $p < 0.001$, D15) (Supplementary data, Figure 1B) until the end of this experiment (reduction of 16.4%) (Supplementary data, Figure 1C).

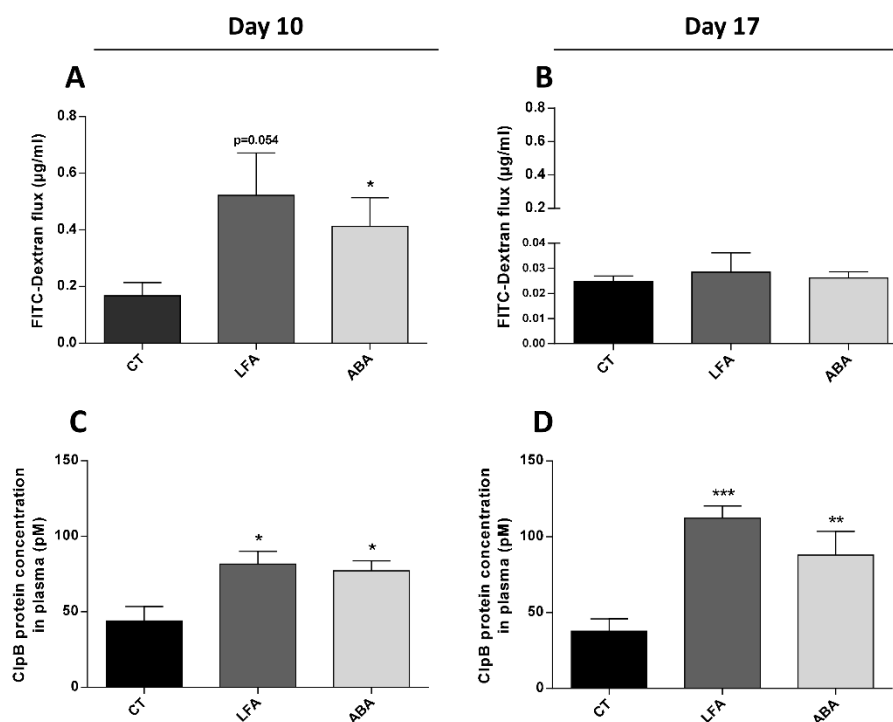


Figure 1. Intestinal permeability measure and ClpB concentration in plasma. The intestinal permeability was measured by an ELISA assay after FITC-dextran passage in the ussing chamber (A) at D10 and (B) at D17. The ClpB concentration was measured in plasma in pM by an ELISA assay (C) at D10 and (D) at D17. Data are means \pm SEM. Unpaired Mann-Whitney test (A, $p = 0.0541$) or ne-way ANOVA test with Holm-Sidak's post-tests (C,D), *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

3.2. Wheel Activity

Total wheel activity increased during the restriction phase (D6–D10) of ABA mice. (Supplementary data, Figure 2A,B) as compared to the adaptation phase (D2–D5) which resulted mainly from an increased activity during the dark phase. (Supplementary data, Figure 2C,D). From D9, wheel activity decreased during the dark phase (Supplementary data, Figure 2C,D), while it increased during the light phase (Supplementary data, Figure 2E,F) vs. D6–D10.

3.3. Intestinal Permeability, ClpB and Immunoglobulins Plasma Levels

Intestinal permeability assessed in vitro by FITC-dextran flux increased at D10 (Figure 1A) while no difference was observed at D17 (Figure 1B).

ClpB protein concentration in plasma increased significantly at D10 (Figure 1C) and D17 (Figure 1D) in ABA and LFA groups vs. controls.

The plasma levels of anti- α -MSH IgG were increased at D10 and D17 in LFA vs. controls and the ABA group (Figure 2A,B). IgM anti- α -MSH levels were increased at D10 and D17 in LFA and ABA vs. controls (Figure 2E,F). The anti-ClpB IgG were increased at D17, but not at D10 in LFA vs. controls and ABA group (Figure 2C,D). The anti-ClpB IgM were increased at D10 but not at D17 in LFA vs. controls and vs. ABA group at D10 (Figure 2G,H).

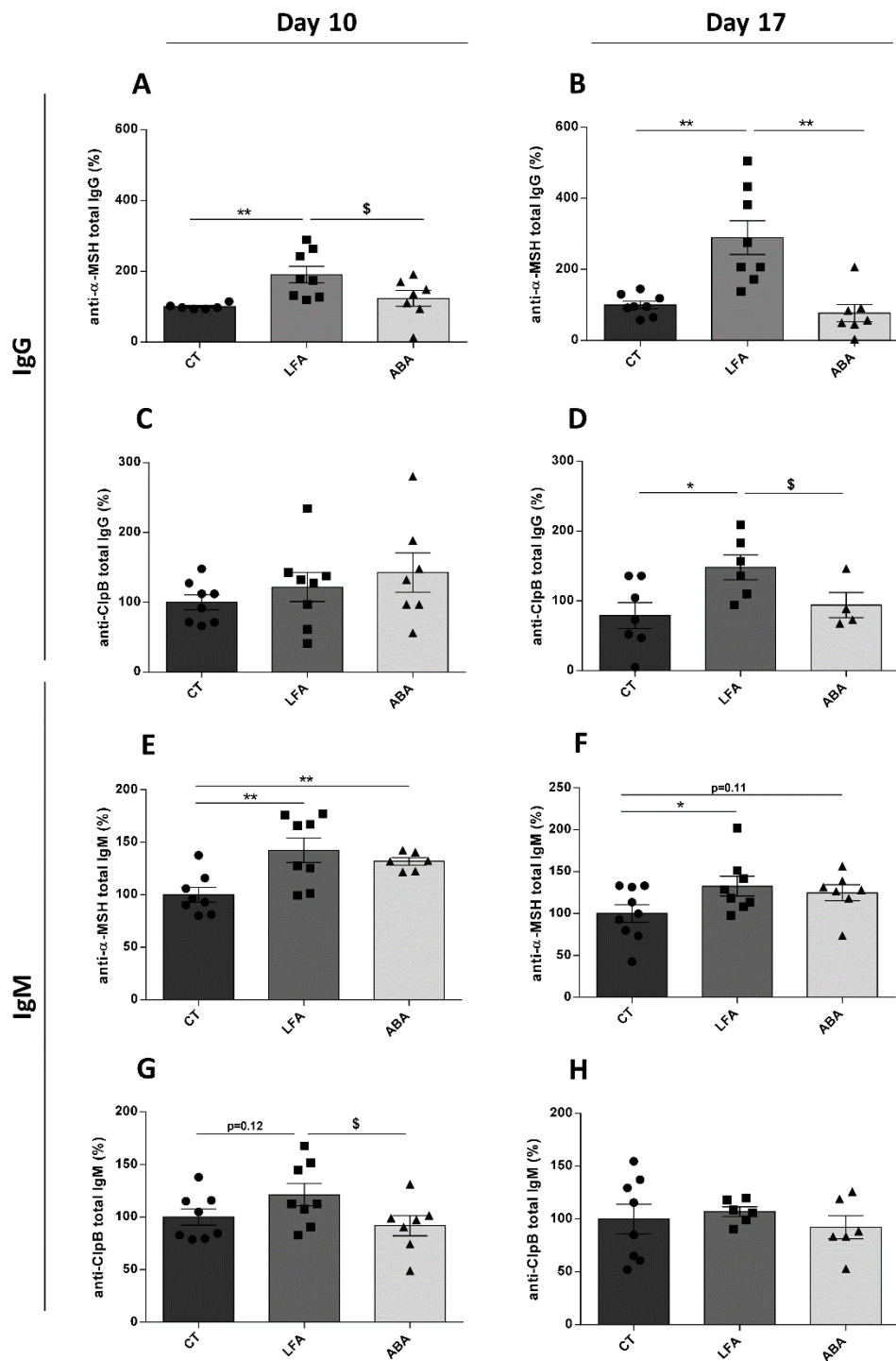


Figure 2. Impact of food restriction and physical activity on modulation of anti- α -MSH and anti-ClpB IgG and IgM. Anti- α -MSH and anti-ClpB IgG antibodies (%) (A,C) at D10 and (B,D) at D17 were measured in plasma. Anti- α -MSH and anti-ClpB IgM were measured in the same way at (E,G) at D10 and (F,H) at D17 in plasma. Data are means \pm SEM. Unpaired Mann-Whitney test (D,F) or unpaired *t*-test (A,B,E,G,H); *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, § $p < 0.10$.

3.4. Faecal *Enterobacteriaceae* DNA

Relative quantitative amount of *Enterobacteriaceae* DNA in faeces was not different at D10 (Figure 3A) but increased at D17 (Figure 3B). This increased in *Enterobacteriaceae* DNA is positively correlated with the ClpB plasma concentration (Figure 3C).

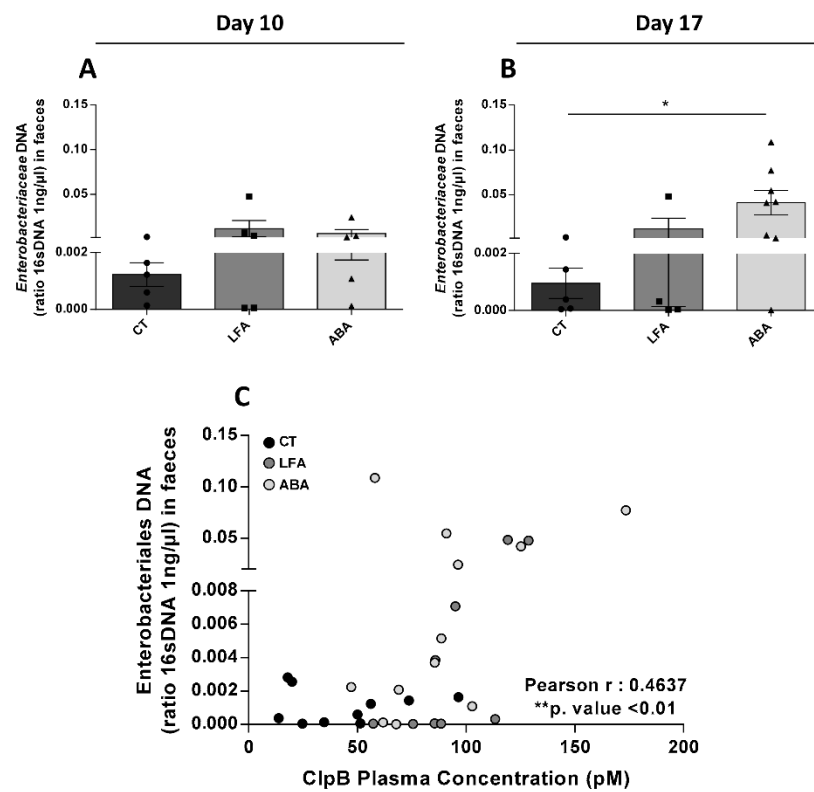


Figure 3. *Enterobacteriaceae* DNA in faeces and correlation with ClpB Plasma concentration. Relative quantitative expression of *Enterobacteriaceae* DNA in faeces by qPCR (A) at D10 and (B) at D17. The relative expression was calculated with a 1 ng/μL *Enterobacteriaceae* concentration normalized by 16sDNA gene. (C) Correlation between *Enterobacteriaceae* DNA in faeces and ClpB plasma concentration (pM). Data are means ± SEM. Unpaired Mann-Whitney test (A,B) or Pearson correlation (C); ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

3.5. Hypothalamic Neuropeptides

Hypothalamic POMC mRNA relative expression increased in LFA and ABA groups at D10 (Figure 4A) and D17 (Figure 4B). AgRP mRNA relative expression was not altered at either D10 (Figure 4C) or D17 (Figure 4D).

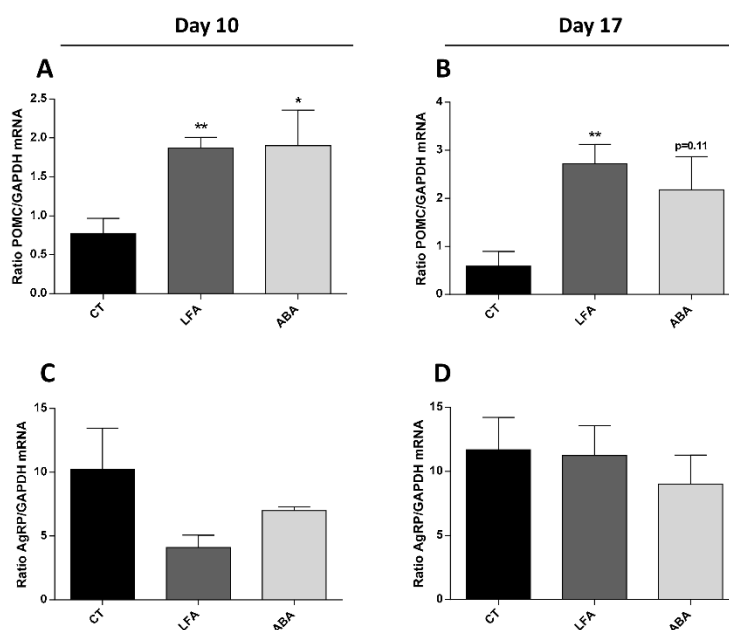


Figure 4. Impact of food restriction on neuronal population gene expression. Relative quantitative expression of (A,B) POMC and (C,D) AgRP mRNA in the hypothalamus by qPCR. The relative abundance of mRNA was calculated as the ratio of the normalized level (SQ of gene of interest mRNA/SQ of GAPDH mRNA). Data are means \pm SEM. Unpaired *t*-test (A,B); ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

4. Discussion

In this study, we highlighted that an increase of ClpB plasma concentration correlated with the relative amount of *Enterobacteriaceae* in faeces of food restricted mice. As expected in the ABA model, mice significantly lost weight which was amplified by the wheel activity of ABA mice [29,30]. Reduced food intake in ABA was not a consequence of wheel activity, since activity ceased when food was again available, which rather suggests that the hyperactivity was a consequence of food restriction.

Several studies have previously reported an increase permeability in the colon of ABA mice [31,32] which suggests that a dysfunction of the intestinal barrier may occur during anorexia nervosa. In the present study, the increased intestinal permeability observed at D10 was associated with an increase in the plasma concentration of the ClpB protein. Accordingly, a previous study from our group [33] reported alterations of the colonic mucosa proteome in ABA mice, suggesting that a decreased energy supply to the colonic mucosa may compromise its functional integrity metabolism [33].

No difference in intestinal permeability or ClpB levels were observed between the LFA and ABA groups. This suggests that physical activity alone has no significant effect on colonic barrier function in this model, and that food restriction induces the increase of ClpB protein plasma level. This increased ClpB may result from an increased transcellular passage of this protein across the enterocytes. In fact, the enterocyte endocytosis of intact proteins is a well-established process. Milk proteins such as β -lactoglobulin (18.36 kDa) and α -lactalbumin (14.2 kDa) can cross the enterocytes via a non-specific liquid phase endocytosis mechanism and reach the basolateral side by a transcytosis mechanism [34]. Even larger proteins such as the 44 kDa glycoprotein Horseradish Peroxidase (HRP) can enter the intestinal absorptive cells by apical endocytosis [35]. Thus, endocytosis of the whole 96 kDa ClpB looks plausible.

Alternatively, paracellular passage may be possible for lower molecular weight proteins or fragments. An increased paracellular passage may be allowed by a degradation of the intercellular tight junction proteins network (e.g., occludin, claudin-1) [36], as already reported in inflammatory

bowel diseases [37,38], irritable bowel syndrome [39,40], obesity [41] and malnutrition states [42] including the ABA model [31], and several intestinal diseases [43]. This paracellular pathway may be of relevance for the fragments of ClpB. Indeed, the ClpB protein has a capacity to fragment naturally as shown in vitro (Mogk et al., 1999), and smaller fragments may access the basolateral space before finally reaching the plasma compartment. This hypothesis is consistent with the increased ex vivo colonic passage of the FITC Dextran molecule (4 kDa) observed in food restricted mice. Our home-made ELISA test probably identified both the whole ClpB protein and several of its fragments.

In the present study, we also observed that food restriction induced changes in the plasma levels of anti- α -MSH IgG and IgM. The most consistent finding was an increase of anti- α -MSH IgG and IgM in the LFA group at D10 and D17. This immune activation may result from the activation of the hypothalamo-pituitary axis with the increased release of CRF and related-peptides such as α -MSH [44], and consequently an increase in the corresponding Ig. Our results suggest a higher increase of anti- α -MSH Ig as compared to anti-ClpB Ig. This may reflect the fact that the primary antibodies used for the ELISA assay may recognize other epitopes in the α -MSH structure in addition to those in common with ClpB. Furthermore, this increase could be a consequence of food restriction, with or without activity, which is stressful for mice. A previous study showed that repeated exposure of rats to mild stress induced by food restriction and repeated blood sampling increased the levels and affinity of α -MSH reactive IgG Ig [27]; passive transfer of these Ig purified from the blood of stressed to naïve animals induced acute food intake and suppressed anxiety. This suggests that the production of these Ig might be an adaptive response to stress aiming to counteract its effects by blunting the satiating effect of α -MSH. The moderate increase of anti- α -MSH Ig in the ABA group raises the question of a possible immunosuppressive effect caused by intense physical activity, which remains debated [45]. Although other studies need to be done, these results confirm the hypothesis proposed by Fetissov et al. that the anorexia physiopathology performed from altered signaling between the gut microbiota, the immune system and the neuropeptides involved in feeding behavior regulation [46].

In our study, colonic content analysis showed an increase proportion of *Enterobacteriaceae* DNA in the ABA group at D17 compared to controls, with intermediate values in the LFA group. This is in accordance with the increased ClpB plasma level at D17, since *Enterobacteriaceae* are known to produce the ClpB protein [18,24]. Already at D10 an increased production and/or release of ClpB by *Enterobacteriaceae* may have occurred before a significant growth of this family. Accordingly, the *Enterobacteriaceae* DNA correlated with ClpB plasma concentration across groups. Moreover, the significant correlation between the ClpB protein plasma levels and the relative amount of *Enterobacteriaceae* seen only in the anorexic mice suggests that dietary restriction impairs microbiota composition. The increased *Enterobacteriaceae* and ClpB protein production is in accordance with previous papers reporting increased *Enterobacteriaceae* in patients with anorexia and in malnourished animals [15]. Under critical dietary restriction conditions, an increased production of ClpB may also be an adaptive process to support the survival of the microorganism since ClpB is a chaperone protein [47]. Accordingly, Breton et al. reported that the production of ClpB by in vitro *E. coli* was increased in the stationary growth phase, after the disposal of added nutrients during the exponential phase [11]. The food restriction led to an increase in *Enterobacteriaceae* population, combined with an increase in both ClpB production and colonic permeability, together these factors have led to abnormally high plasma levels of ClpB.

The increased plasma concentration of ClpB or its fragments allows a direct central effect at the hypothalamic level of stimulating the POMC-related satiating pathways [11] which in turn contribute to either the onset or the perpetuation of anorexia and hyperactivity which could be explain by a satiating and anxiogenic effects of ClpB mimicking α -MSH [19].

It is important to emphasize that this biological approach of anorexia nervosa does not come in contradiction with the well-established triggering role of psychological stress. Indeed, stress might reduce food intake at the hypothalamic level or via the mesocorticolimbic system, but also at the peripheral level by increasing intestinal permeability [48,49] and altering microbiota virulence, proliferation and release of pro-inflammatory and anorexigenic signals acting on neuronal afferents [50,

51]. Using the data from this article and others, we can propose an integrative perspective (Figure 5) which links dietary restriction, stress, microbiota-gut-brain axis dysregulation (including increased ClpB signaling) and the on-going self-maintenance of anorexia nervosa. When fully confirmed, this approach may open innovative therapeutic perspectives via modulation of gut microbiota by different nutritional, microbial or pharmacological approaches [52,53].

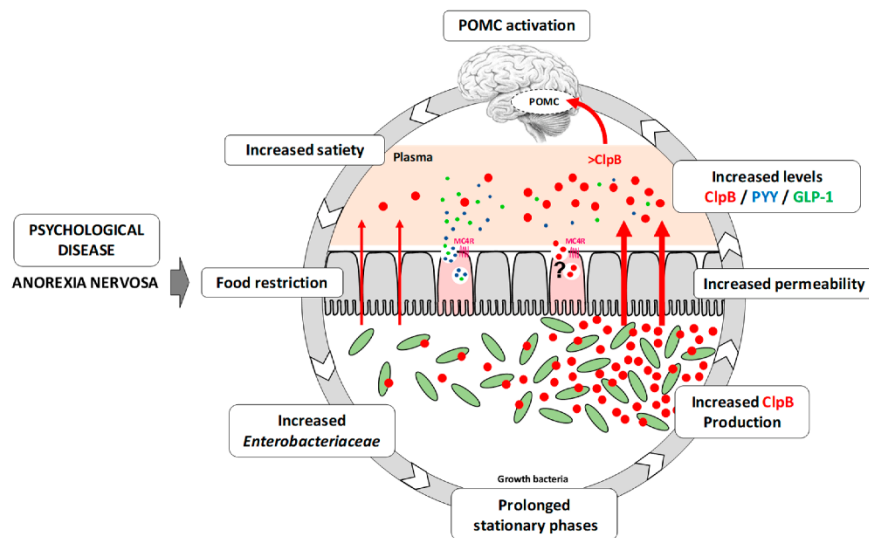


Figure 5. Vicious circle of the physiopathology of anorexia nervosa. Anorexia is characterized by psychological disorders (deformation of the self-image, obsessive fear of gaining weight) which are the cause of a restriction of food intake. This limited dietary intake leads to dysbiosis, characterized by an increase in *Enterobacteriaceae* within the microbiota. This increase generates an increased production of the ClpB protein, resulting from the prolongation of the stationary growth phase of these bacteria. In parallel, dietary restriction also causes an increase in intestinal permeability, which explains the increased passage of this protein through the intestinal mucosa. This protein is then found in the bloodstream with the other satietogenic peptides (GLP-1, PYY) released via the activation of the MC4R receptor present on the L cells. The mechanism of passage of this protein through the mucosa remains unknown, but hypotheses suggest that it may pass through the mucosa in fragments or through a mechanism of endocytosis. Finally, because of its anorectic action, the ClpB protein can activate anorexigenic neuronal populations such as POMC, whose response will lead to an increase in satiety. As well, the vicious cycle of the physiology of anorexia nervosa will continue...

5. Conclusions

In conclusion, we have shown here that bacterial ClpB plasma levels increase during dietary restriction in mice, regardless of physical activity, and correlates with amount of *Enterobacteriaceae* in feces. This brings additional arguments for the role of the gut microbiota in the mechanisms of eating disorders and so, suggests its impact in the perpetuation and self-maintenance of the anorexia. These data suggest that nutritional or probiotic interventions aiming to restore gut microbiota may be useful in the therapeutic strategy of eating disorders.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6643/11/10/2514/s1>, Figure S1: Food restriction model confirmation—Body weight and Food intake, Figure S2: ABA model confirmation—Wheel activity.

Author Contributions: Conceptualization, R.L., N.L., G.L., P.D.; methodology, R.L., N.L.; formal analysis, M.D.; investigation, M.D., M.G., S.A., C.D., C.G., F.L., S.N.; resources, J.-L.d.R., P.D., G.L.; writing—original draft preparation, M.D. and P.D.; writing—review & editing, R.L., N.L., G.L., P.D.; visualization, M.D.; supervision, P.D.; project administration, P.D.; funding acquisition, P.D. and G.L.

Funding: This research received no external funding

Acknowledgments: Supported by European Union and Normandie Regional Council. Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Fund (ERDF). The support of the TargEDys SA company and of the Ministry of Industry and Technology for the funding of M.D.'s PhD CIFRE thesis contract is acknowledged. The authors would like to thank Antonia Trower, Marketing Manager at TargEDys SA, for her help in manuscript proofreading.

Conflicts of Interest: M.D. and M.G. are PhD employee of TargEDys SA; N.L., R.L., S.A., C.D. were employees of TargEDys SA. P.D. is consultant for TargEDys SA, shareholder and cofounder of the company. G.L. is the CEO of TargEDys SA. Other co-authors declare no conflict of interest.

References

- Galmiche, M.; Déchelotte, P.; Lambert, G.; Tavolacci, M.P. Prevalence of eating disorders over the 2000–2018 period: A systematic literature review. *Am. J. Clin. Nutr.* **2019**, *109*, 1402–1413. [\[CrossRef\]](#)
- American Psychiatric Association. *DSM–5*, 5th ed.; University of Michigan: Ann Arbor, MI, USA, 2013.
- Gorwood, P.; Blanchet-Collet, C.; Chartrel, N.; Duclos, J.; Dechelotte, P.; Hanachi, M.; Fetissov, S.; Godart, N.; Melchior, J.-C.; Ramoz, N.; et al. New Insights in Anorexia Nervosa. *Front. Neurosci.* **2016**, *10*, 256. [\[CrossRef\]](#)
- Kleiman, S.C.; Carroll, I.M.; Tarantino, L.M.; Bulik, C.M. Gut feelings: A role for the intestinal microbiota in anorexia nervosa? *Int. J. Eat. Disord.* **2015**, *48*, 449–451. [\[CrossRef\]](#)
- Roubalová, R.; Procházková, P.; Papežová, H.; Smitka, K.; Bilej, M.; Tlaskalová-Hogenová, H. Anorexia nervosa: Gut microbiota-immune-brain interactions. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* **2019**. [\[CrossRef\]](#)
- David, L.A.; Maurice, C.F.; Carmody, R.N.; Gootenberg, D.B.; Button, J.E.; Wolfe, B.E.; Ling, A.V.; Devlin, A.S.; Varma, Y.; Fischbach, M.A.; et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* **2014**, *505*, 559–563. [\[CrossRef\]](#)
- Wu, G.D.; Chen, J.; Hoffmann, C.; Bittinger, K.; Chen, Y.-Y.; Keilbaugh, S.A.; Bewtra, M.; Knights, D.; Walters, W.A.; Knight, R.; et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* **2011**, *334*, 105–108. [\[CrossRef\]](#)
- Singh, R.K.; Chang, H.-W.; Yan, D.; Lee, K.M.; Ucmak, D.; Wong, K.; Abrouk, M.; Farahnik, B.; Nakamura, M.; Zhu, T.H.; et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J. Transl. Med.* **2017**, *15*, 73. [\[CrossRef\]](#)
- Dinan, T.G.; Cryan, J.F. Microbes, Immunity, and Behavior: Psychoneuroimmunology Meets the Microbiome. *Neuropsychopharmacology* **2017**, *42*, 178–192. [\[CrossRef\]](#)
- Van de Wouw, M.; Schellekens, H.; Dinan, T.G.; Cryan, J.F. Microbiota-Gut-Brain Axis: Modulator of Host Metabolism and Appetite. *J. Nutr.* **2017**, *147*, 727–745. [\[CrossRef\]](#)
- Breton, J.; Tennoune, N.; Lucas, N.; Francois, M.; Legrand, R.; Jacquemot, J.; Goichon, A.; Guérin, C.; Peltier, J.; Pestel-Caron, M.; et al. Gut Commensal *E. coli*. Proteins Activate Host Satiety Pathways following Nutrient-Induced Bacterial Growth. *Cell Metab.* **2016**, *23*, 324–334. [\[CrossRef\]](#)
- Strandwitz, P. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Res.* **2018**, *1693*, 128–133. [\[CrossRef\]](#)
- Lach, G.; Schellekens, H.; Dinan, T.G.; Cryan, J.F. Anxiety, Depression, and the Microbiome: A Role for Gut Peptides. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* **2018**, *15*, 36–59. [\[CrossRef\]](#)
- Castaner, O.; Goday, A.; Park, Y.-M.; Lee, S.-H.; Magkos, F.; Shiow, S.-A.T.E.; Schröder, H. The Gut Microbiome Profile in Obesity: A Systematic Review. *Int. J. Endocrinol.* **2018**, *2018*, 9. [\[CrossRef\]](#)
- Breton, J.; Déchelotte, P.; Ribet, D. Intestinal microbiota and Anorexia Nervosa. *Clin. Nutr. Exp.* **2019**, in press. [\[CrossRef\]](#)
- Million, M.; Angelakis, E.; Maraninchi, M.; Henry, M.; Giorgi, R.; Valero, R.; Vialettes, B.; Raoult, D. Correlation between body mass index and gut concentrations of *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis*, *Methanobrevibacter smithii* and *Escherichia coli*. *Int. J. Obes.* **2013**, *37*, 1460–1466. [\[CrossRef\]](#)
- Fetissov, S.O. Role of the gut microbiota in host appetite control: Bacterial growth to animal feeding behaviour. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2017**, *13*, 11–25. [\[CrossRef\]](#)
- Legrand, R.; Lucas, N.; Dominique, M.; Azhar, S.; Deroissart, C.; Le Sollic, M.-A.; Rondeaux, J.; Nobis, S.; Guérin, C.; Léon, F.; et al. Commensal *Hafnia alvei* strain reduces food intake and fat mass in obese mice—a new potential probiotic for appetite and body weight management. *Int. J. Obes.* **2019**, in press.

19. Tennoune, N.; Chan, P.; Breton, J.; Legrand, R.; Chabane, Y.N.; Akkermann, K.; Järv, A.; Ouelaa, W.; Takagi, K.; Ghouzali, I.; et al. Bacterial ClpB heat-shock protein, an antigen-mimetic of the anorexigenic peptide α -MSH, at the origin of eating disorders. *Transl. Psychiatry* **2014**, *4*, e458. [\[CrossRef\]](#)
20. Kim, M.S.; Rossi, M.; Abusnana, S.; Sunter, D.; Morgan, D.G.; Small, C.J.; Edwards, C.M.; Heath, M.M.; Stanley, S.A.; Seal, L.J.; et al. Hypothalamic localization of the feeding effect of agouti-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Diabetes* **2000**, *49*, 177–182. [\[CrossRef\]](#)
21. Guan, H.-Z.; Dong, J.; Jiang, Z.-Y.; Chen, X. α -MSH Influences the Excitability of Feeding-Related Neurons in the Hypothalamus and Dorsal Vagal Complex of Rats. *BioMed Res. Int.* **2017**, *2017*, 2034691. [\[CrossRef\]](#)
22. Manning, S.; Batterham, R.L. Enteroendocrine MC4R and energy balance: Linking the long and the short of it. *Cell Metab.* **2014**, *20*, 929–931. [\[CrossRef\]](#)
23. Panaro, B.L.; Tough, I.R.; Engelstoft, M.S.; Matthews, R.T.; Digby, G.J.; Møller, C.L.; Svendsen, B.; Gribble, F.; Reimann, F.; Holst, J.J.; et al. The melanocortin-4 receptor is expressed in enteroendocrine L cells and regulates the release of peptide YY and glucagon-like peptide 1 in vivo. *Cell Metab.* **2014**, *20*, 1018–1029. [\[CrossRef\]](#)
24. Breton, J.; Legrand, R.; Akkermann, K.; Järv, A.; Harro, J.; Déchelotte, P.; Fetissoff, S.O. Elevated plasma concentrations of bacterial ClpB protein in patients with eating disorders. *Int. J. Eat. Disord.* **2016**, *49*, 805–808. [\[CrossRef\]](#)
25. Fetissoff, S.O.; Harro, J.; Jaanisk, M.; Järv, A.; Podar, I.; Allik, J.; Nilsson, I.; Sakhivell, P.; Lefvert, A.K.; Hökfelt, T. Autoantibodies against neuropeptides are associated with psychological traits in eating disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 14865–14870. [\[CrossRef\]](#)
26. Lucas, N.; Legrand, R.; Bôle-Feysot, C.; Breton, J.; Coëffier, M.; Akkermann, K.; Järv, A.; Harro, J.; Déchelotte, P.; Fetissoff, S.O. Immunoglobulin G modulation of the melanocortin 4 receptor signaling in obesity and eating disorders. *Transl. Psychiatry* **2019**, *9*, 87. [\[CrossRef\]](#)
27. Sinno, M.H.; Do Rego, J.C.; Coëffier, M.; Bole-Feysot, C.; Ducrotté, P.; Gilbert, D.; Tron, F.; Costentin, J.; Hökfelt, T.; Déchelotte, P.; et al. Regulation of feeding and anxiety by alpha-MSH reactive autoantibodies. *Psychoneuroendocrinology* **2009**, *34*, 140–149. [\[CrossRef\]](#)
28. Fetissoff, S.O. Neuropeptide autoantibodies assay. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *789*, 295–302.
29. Lewis, D.Y.; Brett, R.R. Activity-based anorexia in C57/BL6 mice: Effects of the phytocannabinoid, Delta9-tetrahydrocannabinol (THC) and the anandamide analogue, OMDM-2. *Eur Neuropsychopharmacol.* **2010**, *20*, 622–631. [\[CrossRef\]](#)
30. Nobis, S.; Goichon, A.; Achamrah, N.; Guérin, C.; Azhar, S.; Chan, P.; Morin, A.; Bôle-Feysot, C.; do Rego, J.C.; Vaudry, D.; et al. Alterations of proteome, mitochondrial dynamic and autophagy in the hypothalamus during activity-based anorexia. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 7233. [\[CrossRef\]](#)
31. Jésus, P.; Ouelaa, W.; François, M.; Riachy, L.; Guérin, C.; Aziz, M.; Do Rego, J.-C.; Déchelotte, P.; Fetissoff, S.O.; Coëffier, M. Alteration of intestinal barrier function during activity-based anorexia in mice. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* **2014**, *33*, 1046–1053. [\[CrossRef\]](#)
32. Achamrah, N.; Nobis, S.; Breton, J.; Jésus, P.; Belmonte, L.; Maurer, B.; Legrand, R.; Bôle-Feysot, C.; do Rego, J.L.; Goichon, A.; et al. Maintaining physical activity during refeeding improves body composition, intestinal hyperpermeability and behavior in anorectic mice. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 21887. [\[CrossRef\]](#)
33. Nobis, S.; Achamrah, N.; Goichon, A.; L’Huillier, C.; Morin, A.; Guérin, C.; Chan, P.; do Rego, J.L.; do Rego, J.C.; Vaudry, D.; et al. Colonic Mucosal Proteome Signature Reveals Reduced Energy Metabolism and Protein Synthesis but Activated Autophagy during Anorexia-Induced Malnutrition in Mice. *Proteomics* **2018**, *18*, 1700395. [\[CrossRef\]](#)
34. Caillard, I.; Tomé, D. Transport of beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin in enterocyte-like Caco-2 cells. *Reprod. Nutr. Dev.* **1995**, *35*, 179–188. [\[CrossRef\]](#)
35. Blok, J.; Mulder-Stapel, A.A.; Ginsel, L.A.; Daems, W.T. Endocytosis in absorptive cells of cultured human small-intestinal tissue: Horseradish peroxidase, lactoperoxidase, and ferritin as markers. *Cell Tissue Res.* **1981**, *216*, 1–13. [\[CrossRef\]](#)
36. Buckley, A.; Turner, J.R. Cell Biology of Tight Junction Barrier Regulation and Mucosal Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2018**, *10*, a029314. [\[CrossRef\]](#)
37. Poritz, L.S.; Garver, K.I.; Green, C.; Fitzpatrick, L.; Ruggiero, F.; Koltun, W.A. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *J. Surg. Res.* **2007**, *140*, 12–19. [\[CrossRef\]](#)

38. Xu, P.; Elamin, E.; Elizalde, M.; Bours, P.P.H.A.; Pierik, M.J.; Masclee, A.A.M.; Jonkers, D.M.A.E. Modulation of Intestinal Epithelial Permeability by Plasma from Patients with Crohn's Disease in a Three-dimensional Cell Culture Model. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 2030. [CrossRef]
39. Bertiaux-Vandaële, N.; Youmba, S.B.; Belmonte, L.; Leclaire, S.; Antonietti, M.; Gourcerol, G.; Leroi, A.-M.; Déchelotte, P.; Ménard, J.-F.; Ducrotté, P.; et al. The expression and the cellular distribution of the tight junction proteins are altered in irritable bowel syndrome patients with differences according to the disease subtype. *Am. J. Gastroenterol.* **2011**, *106*, 2165–2173. [CrossRef]
40. Cheng, P.; Yao, J.; Wang, C.; Zhang, L.; Kong, W. Molecular and cellular mechanisms of tight junction dysfunction in the irritable bowel syndrome. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *12*, 3257–3264. [CrossRef]
41. Brun, P.; Castagliuolo, I.; Leo, V.D.; Buda, A.; Pinzani, M.; Palù, G.; Martines, D. Increased intestinal permeability in obese mice: New evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2007**, *292*, G518–G525. [CrossRef]
42. Genton, L.; Cani, P.D.; Schrenzel, J. Alterations of gut barrier and gut microbiota in food restriction, food deprivation and protein-energy wasting. *Clin. Nutr.* **2015**, *34*, 341–349. [CrossRef]
43. Bischoff, S.C.; Barbara, G.; Buurman, W.; Ockhuizen, T.; Schulzke, J.-D.; Serino, M.; Tilg, H.; Watson, A.; Wells, J.M. Intestinal permeability—a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol.* **2014**, *14*, 189. [CrossRef]
44. Dhillon, W.S.; Small, C.J.; Seal, L.J.; Kim, M.-S.; Stanley, S.A.; Murphy, K.G.; Ghatei, M.A.; Bloom, S.R. The Hypothalamic Melanocortin System Stimulates the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis in vitro and in vivo in Male Rats. *Neuroendocrinology* **2002**, *75*, 209–216. [CrossRef]
45. Nieman, D.C.; Nehlsen-Cannarella, S.L. The Effects of Acute and Chronic Exercise on Immunoglobulins. *Sports Med.* **1991**, *11*, 183–201. [CrossRef]
46. Fetissov, S.O.; Hökfelt, T. On the origin of eating disorders: Altered signaling between gut microbiota, adaptive immunity and the brain melanocortin system regulating feeding behavior. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2019**, *48*, 82–91. [CrossRef]
47. Lee, S.; Sowa, M.E.; Watanabe, Y.; Sigler, P.B.; Chiu, W.; Yoshida, M.; Tsai, F.T.F. The structure of ClpB: A molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state. *Cell* **2003**, *115*, 229–240. [CrossRef]
48. Vanuytsel, T.; van Wanrooy, S.; Vanheel, H.; Vanormelingen, C.; Verschuere, S.; Houben, E.; Salim Rasool, S.; Tóth, J.; Holvoet, L.; Farré, R.; et al. Psychological stress and corticotropin-releasing hormone increase intestinal permeability in humans by a mast cell-dependent mechanism. *Gut* **2014**, *63*, 1293–1299. [CrossRef]
49. Wallon, C.; Yang, P.-C.; Keita, A.V.; Ericson, A.-C.; McKay, D.M.; Sherman, P.M.; Perdue, M.H.; Söderholm, J.D. Corticotropin-releasing hormone (CRH) regulates macromolecular permeability via mast cells in normal human colonic biopsies in vitro. *Gut* **2008**, *57*, 50–58. [CrossRef]
50. Biaggini, K.; Borrel, V.; Szunerits, S.; Boukherroub, R.; N'Diaye, A.; Zébré, A.; Bonnin-Jusserand, M.; Duflos, G.; Feuilloley, M.; Drider, D.; et al. Substance P enhances lactic acid and tyramine production in *Enterococcus faecalis* V583 and promotes its cytotoxic effect on intestinal Caco-2/TC7 cells. *Gut Pathog.* **2017**, *9*, 20. [CrossRef]
51. Biaggini, K.; Barbey, C.; Borrel, V.; Feuilloley, M.; Déchelotte, P.; Connil, N. The pathogenic potential of *Pseudomonas fluorescens* MFN1032 on enterocytes can be modulated by serotonin, substance P and epinephrine. *Arch. Microbiol.* **2015**, *197*, 983–990. [CrossRef]
52. Lam, Y.Y.; Maguire, S.; Palacios, T.; Caterson, I.D. Are the Gut Bacteria Telling Us to Eat or Not to Eat? Reviewing the Role of Gut Microbiota in the Etiology, Disease Progression and Treatment of Eating Disorders. *Nutrients* **2017**, *9*, 602. [CrossRef]
53. Dominique, M.; Breton, J.; Guérin, C.; Bole-Feysot, C.; Lambert, G.; Déchelotte, P.; Fetissov, S. Effects of Macronutrients on the In Vitro Production of ClpB, a Bacterial Mimetic Protein of α -MSH and Its Possible Role in Satiety Signaling. *Nutrients* **2019**, *11*, 2115. [CrossRef]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

MANUSCRIT 1.

Effets de la protéine bactérienne ClpB et de l'un de ses fragments peptidiques sur la régulation de la prise alimentaire chez la Souris

Effects of bacterial protein ClpB and one of its peptide fragments on the regulation of food intake in mice

Manon Dominique^{1,2,3}, Nicolas Lucas¹, Romain Legrand¹, Illona Boulete¹, Christine Bôle-Feysot^{2,3}, Camille Deroissart¹, Fatima Léon^{3,5}, Séverine Nobis^{3,5}, Jean-Claude Do Rego^{3,5}, Sergueï Fetissov^{1,2}, Grégory Lambert¹, Pierre Déchelotte^{1,2,3,4*}

¹TargEDys SA, University of Rouen Normandy, 22, Boulevard Gambetta, Rouen, 76183, Cedex 1, France;

²Nutrition, Gut and Brain Laboratory, Inserm UMR1073, University of Rouen Normandy, Rouen, 76183, France;

³Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), University of Rouen Normandy, Rouen, 76183, France;

⁴Rouen University Hospital, CHU Charles Nicolle, 76183, Rouen, France;

⁵Animal Behavior Platform, Service Commun d'Analyse Comportementale (SCAC), University of Rouen Normandy, 76183 Rouen, France.

Soumis dans *The Journal of Nutrition* en Octobre 2019

RESUME

Contexte : La *Caseinolytic peptidase B* (ClpB) identifiée chez les bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* est une protéine mimétique de l' α -MSH. En conséquence, la protéine ClpB peut exercer des effets analogues à ceux de l' α -MSH sur la consommation alimentaire. Il a déjà été rapporté que cette protéine stimulait la production du peptide satiétogène PYY par les cellules entéro-endocrines chez les rongeurs. Cependant, aucune étude n'a encore confirmé *in vivo* l'effet anorexigène de la protéine ClpB. Aussi, il a été rapporté que la protéine ClpB peut se fragmenter naturellement. L'objectif de cette étude a donc été d'évaluer l'effet anorexigène de la protéine ClpB et de le comparer à l'un de ses fragments.

Matériels et méthodes : Des cultures de cellules de muqueuses intestinales primaires de Rat ont été incubées avec la protéine ClpB recombinante intacte (ClpB96) traitée thermiquement ou bien avec des protéines extraites d'*E. coli* WT et d'*E. coli* Δ ClpB, après fragmentation préalable par la trypsine. La libération de PYY dans le surnageant a été analysée par technique ELISA. Les fragments de la protéine ClpB après traitement thermique (45°C pendant 30min) ou avec la trypsine (37°C pendant 20min) ont été analysés par Western blot en utilisant des anticorps polyclonaux anti-ClpB et anti- α -MSH. L'effet sur la prise alimentaire quotidienne de la protéine ClpB96 ou du fragment de 25kDa (ClpB25) identifié précédemment a été évalué après une et des injection(s) intrapéritonéale(s) unique ou répétée(s) chez des souris mâles C57Bl/6 et *ob/ob* en utilisant le système BioDAQ®.

Résultats : La protéine ClpB fragmentée a augmenté *in vitro* la production de PYY par les cellules de la muqueuse intestinale. Les protéines bactériennes fragmentées d'*E. coli* WT mais pas d'*E. coli* Δ ClpB ont également augmenté la production de PYY. Le fragment de 25kDa de la protéine ClpB portant le mimétisme moléculaire avec l' α -MSH est identifié dans la protéine ClpB fragmentée par Western Blot. Les injections intrapéritonéales de protéine ClpB96, contrairement à celles du fragment ClpB25 ont réduit de manière significative la prise alimentaire cumulative sur 2h chez les souris C57Bl/6 et *ob/ob* (* $p < 0,05$), avec un effet plus prolongé chez ces dernières.

Conclusion : Cette étude confirme l'effet anorexigène de la protéine recombinante ClpB96. D'autres études sont nécessaires pour identifier d'autres fragments susceptibles de reproduire les effets anorexigènes de la protéine ClpB96 afin d'optimiser la cinétique de l'administration et de renforcer l'effet anorexigène de la protéine ClpB96 ou de ses fragments.

ABSTRACT

Background. Caseinolytic protease B (ClpB) identified in Enterobacteriaceae is a mimetic protein of the satiety-signaling peptide α -MSH. Accordingly, ClpB could exert α -MSH-like effects on food intake by the production of the satietogenic peptide PYY in rodents. Moreover, it has been reported that ClpB can fragment naturally.

Objective. The objective of this study was evaluated a potential anorexigenic effect of ClpB protein or one its fragments

Methods. Primary rat intestinal mucosal cells cultures were incubated with intact or heat-treated recombinant ClpB or with proteins extracted from *E. coli* WT and *E. coli* Δ ClpB incubated, after or without previous fragmentation by trypsin. PYY release in the supernatant was analyzed by ELISA. ClpB fragments after heat or trypsin treatment were analyzed by Western blot using anti-ClpB and anti- α -MSH antibodies. The effects on daily food intake of intact recombinant protein ClpB or the previously identified 25 kDa fragment were evaluated after single or repeated intraperitoneal injection in male C57Bl/6 and *ob/ob* mice using the BioDAQ® system.

Results. Fragmented ClpB protein increased PYY production by cultured intestinal mucosal cells (* $p < 0.05$). Accordingly, fragmented bacterial proteins from WT but not *E. coli* Δ ClpB also increased PYY production. A 25 kDa ClpB fragment bearing molecular mimicry was detected in fragmented ClpB. Intraperitoneal injections of intact ClpB protein but not of the 25 kDa fragment significantly decreased

2 h cumulative food intake in control (** $p < 0.01$) and *ob/ob* ($p < 0.05$) mice, with a more prolonged effect in the latter.

Conclusion. This work demonstrates an anorexigenic effect of the recombinant ClpB protein. Further studies are needed to identify fragments other than the 25kDa fragment that may reproduce the anorexic effects of the whole ClpB protein and to optimize the kinetics of ClpB or fragment administration to reinforce the anorexigenic effect.

Keywords: ClpB, fragments, obesity, microbiota

INTRODUCTION

Obesity is a major public health problem. In 2016, more than 650 million adults (> 18 years old) were obese (1). According to the WHO, obesity is defined by a body mass index (BMI) ≥ 30 mg/m² significantly affecting the quality of life of patients (2). It is also a risk factor for many diseases, such as type II diabetes (3), cancer (4) and cardiovascular disease (5).

The role of the microbiota in the pathophysiology of obesity is increasingly recognized and has already been suggested by early 16sRNA analysis, showing a dysbiosis with Bacteroidetes/Firmicutes ratio decreased in obese patients or in *ob/ob* mice, a genetic model of obesity (6). Others studies have also highlighted in obese patients a decrease of the archae *Methanobrevibacter smithii* and of *E. coli*, one of the main representatives of the order of Enterobacteriales (7). These data raise the question that under pathological conditions, the body adapts and reacts to the various associated disturbances, modifying the diversity and composition of the intestinal microbiota (8). Central orexigenic (NPY/AgRP) or anorexigenic (POMC/ α -MSH) neuronal populations (9) can integrate peripheral signals (metabolites, peptides, hormones etc.) present in the bloodstream (10) through the MC4R receptor presents in enteroendocrine cells (11). In addition, luminal or secreted satiety signals may also act on the MC4R receptors of the enteroendocrine L cells of the intestine (12). The impact of these signals and their actions at central and peripheral levels confirm the importance of an active communication along the "microbiota - gut - brain" axis (9), (10).

Furthermore, previous studies from our group (13) have highlighted that a bacterial protein, the caseinolytic peptidase B (ClpB), present in *E. coli* shares a common epitope of six amino acids with α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH), a central and peripheral anorexigenic neuropeptide (14), (11).

Accordingly, we previously suggested physiological and similar anorectic reactions to ClpB compared to α -MSH with *E. coli* K12 WT (producer of ClpB protein) while administration of *E. coli* K12 Δ ClpB, not producing ClpB protein, did not influence food intake nor body composition (13), (15). In addition, intraperitoneal injections of proteins from *E. coli* WT in rats decreased food intake and induced an increase of plasma PYY level (16) suggesting that the effect of ClpB protein is mediated at least in part by PYY secretion. This hypothesis was recently confirmed *in vitro* with a dose-dependent secretion of PYY by cultured rat intestinal cells treated with ClpB (Dominique et al. 2019).

In a pilot clinical study, ClpB protein was also found at an increased level in the plasma of patients with eating disorders (Breton et al. 2016). This increased of ClpB level was also observed in a mice model

of anorexia (19). By its molecular mimicry with α -MSH, plasma ClpB may modulate the mechanisms of appetite directly or by modulating of the action of anti- α -MSH and anti-ClpB antibodies (13), (20).

Another bacterium from the Enterobacteriales family, *H. alvei*, also produces ClpB protein and exerts anorexigenic effects in preclinical models of obesity (15). However, a direct effect of isolated ClpB protein on food intake had not been evaluated so far.

Otherwise, Mock and his collaborators showed that this protein has also the capacity to fragment naturally (21). However, it is not known whether the ClpB fragments generated by the microbiota can also stimulate the synthesis of PYY and GLP-1 or if have a direct effect in food intake.

To test this hypothesis, we first investigated whether fragments of ClpB protein could stimulate the *in vitro* production of PYY by cultured rat intestinal cells. And after to have identified a ClpB fragment sharing molecular mimicry with α -MSH, we evaluated *in vivo* the anorexigenic effect of ClpB protein and this fragment.

MATERIALS & METHODS

E. coli WT and *E. coli* Δ ClpB bacterial culture

E. coli K12 WT and *E. coli* K12 deleted for ClpB (*E. coli* Δ ClpB) were cultivated at 37 °C in Mueller-Hinton (MH) medium (Sigma-Aldrich, Mo, US). The growth rate of the bacteria was monitored every hour by measuring the optical density at 600 nm using a spectrophotometer (BioMate, ThermoElectron Corporation, Waltham, MA, USA) until reaching the stationary phase (7 h). After a centrifugation step (4300 rpm, 30 min, 4 °C), the bacterial pellet was used for protein extraction.

Bacterial proteins extraction

Bacterial pellet was dissolved in an extraction buffer (PBS + 1% of a protease inhibitor cocktail, Sigma), sonicated (20% amplitude for 30 s) and centrifuged (12 000 *g*, 5 min, 4 °C) to separate cellular debris from the cytoplasmic content. The supernatant was taken and stored at -80 °C if their analysis was not immediately.

Proteins fragmentation

Proteins *E. coli* K12 WT and *E. coli* Δ ClpB were fragmented with 0.25% trypsin without EDTA (Sigma, Poole, UK) during 20 min at 37 °C. Recombinant ClpB protein (total form) at 10.6 mg/ml was fragmented by a thermal shock (30 min at 45 °C in water bath). After incubation, the fragmentation was immediately stopped by placing tubes on ice.

ClpB fragments identification

After fragmentation, Laemli solution without β -mercaptoethanol was added to perform Western Blot on 20% acrylamide SDS gel in Tris-Glycine buffer (Biorad, Hercules, USA) and transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Orsay, France). The membrane was then blocked during 1 h at room temperature with 5% (w/v) BSA (Bovine Serum Albumine) in TBST (10 mmol/L, pH 8, 150 mmol/L NaCl) + 0.05% (w/v) Tween 20. The membrane was then incubated overnight at 4 °C with rabbit polyclonal anti-ClpB antibodies (1:5000, Delphi Genetics, Bxl, BEL) or rabbit polyclonal anti- α -MSH antibodies (1:1000, Phoenix Pharmaceuticals, Inc.). The membrane was then washed three times and the peroxidase reaction was revealed using the ECL detection kit (GE Healthcare, Orsay, France). Protein bands were compared to a molecular weight standard (Precision Plus, Biorad, Ca, USA) and films were scanned using ImageScanner III (GE Healthcare, Orsay, France).

ClpB Fragment (25 kDa) Production

The 25 kDa fragment was produced by Delphi Genetics according to the previously published sequence (22) at a final concentration of 0.28 mg/ml.

Rat intestinal cells primary culture

Animal experimentation procedures were approved by the Local Ethical Committee of Normandy (approval n°6701-2016083016464059 v5). 7 week male Sprague-Dawley rats were purchased from Janvier Labs (Genest-Saint-Isle, France) and were kept for 1 week in standard rat holding cages (two rats per cage) in a specialized animal facility to acclimate them to the environmental conditions: 22 °C \pm 3 °C, relative humidity 40 \pm 20% and 12 h of the dark/light cycle. All rats were given *ad libitum* access to drinking water and food (Kliba Nafag, Germany).

The protocol of intestinal cells primary culture was adapted from Psichas and al. (23). Rats were killed by decapitation, and the colon and ileum were taken and washed firstly with an ice-cold PBS and secondly with ice-cold Leibowitz L-15 medium (Sigma-Aldrich, Mo, US). The intestinal tissues were then scraped and the scraping digested with 0.4 mg/ml collagenase XI (Sigma) in high-glucose DMEM (1% L-Glutamine, 1% Penicillin, 1% Streptomycin, 1% and non-essential amino acids) during 10 min at 37 °C. Cells suspensions were centrifuged (10min, 400 g) and the pellets were resuspended in High-Glucose DMEM (the same as previously but with 10% fetal bovine serum (FBS)). Cell suspensions were finally filtered through a nylon mesh (pore size 100 μ m, Merck Millipore, Ms, USA) and put onto 24-well, 1% Matrigel-coated plates (Corning, NY, US). The plates were incubated overnight at 37 °C in an atmosphere of 95% O₂ and 5% CO₂.

Gut hormone secretion experiments

After 24 hours of culture, intestinal cells were placed in a water bath. The culture medium was gently aspirated and secretion buffer to the plates (4 mM KCl, 138 mM NaCl, 1.2 mM NaHCO₃, 1.2 mM NaH₂PO₄, 2.6 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂ and 10 mM HEPES adjusted to pH 7.4 with NaOH) further incubated for 20 min. Total protein extracted from *E. coli* K12 wild type (WT) or ClpB mutant (Δ ClpB) *E. coli* strains, previously generated in the Bernd Bukau's laboratory (Center for Molecular Biology, Heidelberg University, Germany) at 15 ng/ μ L and fragmented by trypsin (20 min, 37 °C) were included in the secretion buffer of respective groups. Additionally, recombinant 96 kDa ClpB protein (Delphi Genetics, Bxl, BEL) at two concentrations: (13 nM and 130 nM) and fragmented by thermal shock (30 min at 45 °C) were added to the secretion buffer. Cells incubated with PBS were used for controls. After 20 min of incubation, the buffer was aspirated and cells were treated with a lysis buffer (50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1% IGEPAL CA-630, 0.5% deoxycholic acid + protease inhibitor cocktail (Sigma). Cells were then collected with a cell scraper and the lysates were centrifuged (12 000 *g*, 20 min) and stored at -80 °C until the PYY assay using a Fluorescent Immunoassay Kit® (Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Phoenix, USA) according to the manufacturer's instructions.

In vivo single and repeated administration of ClpB in mice

Animal experimentation procedures were approved by the Local Ethical Committee of Normandy (approval n°6701-2016083016464059 v5). 7 week male C57Bl/6 and *ob/ob* mice rats were purchased from Janvier Labs (Genest-Saint-Isle, France) and were kept for 1 week in standard mice holding cages (three mice per cage) in a specialized animal facility to acclimate them to the environmental conditions: 22 °C \pm 3 °C, relative humidity 40 \pm 20% and 12 h of the dark/light cycle. All mice were given *ad libitum* access to drinking water and food (Kliba Nafag, Germany).

On the first day of experiment, male C57Bl/6 mice were placed in the individual BioDAQ mouse cages (Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ) to measure individual food intake (n=5 for controls, n=10 for ClpB groups). Each mouse received daily over 10 days intraperitoneal injections at 9:00 (single injection) and 9:00 and 16:00 (repeated injections) of either (1) physiological serum, (2) total ClpB (ClpB96) at 0.95 μ g/ml. (3) ClpB fragment of 25 kDa (ClpB25) at 0.50 μ g/ml. Mice were kept on free water access. Body weight, water and food intake were measured at 9:00 am each day before injection. At the end of the experiment, mice were anaesthetized by ketamine/xylazine intraperitoneally and were euthanized by decapitation. All data were analyzed using BioDAQ data viewer 2.3.07 (Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ).

Statistical analysis

Normality was evaluated by the Kolmogorov–Smirnov test. Statistical significance was calculated by unpaired t-test, one-way ANOVA or two-way ANOVA, as appropriate. Data are shown as means standard error of means (SEM). All statistical calculations were performed using Prism 6.0 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) and * $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Effects of bacterial proteins and ClpB protein on PYY secretion by cultured rat intestinal cells.

At the dose of 15 ng/ μ l *E. coli* WT proteins fragmented with trypsin stimulated significantly PYY secretion compared to control (* $p < 0.05$) and *E. coli* Δ ClpB groups ($\S p < 0.10$) (Figure 1A).

Heat-fragmented (45 °C during 30 min) 12.5 nM and 125 nM ClpB protein increased (both $p < 0.05$) PYY secretion (Figure 1B).

ClpB fragment (25kDa) identification

A first Western Blot of ClpB protein after enzymatic fragmentation with trypsin highlighted a ClpB fragment at molecular weight of 25 kDa revealed with polyclonal anti- α -MSH (Figure 2A) or anti-ClpB

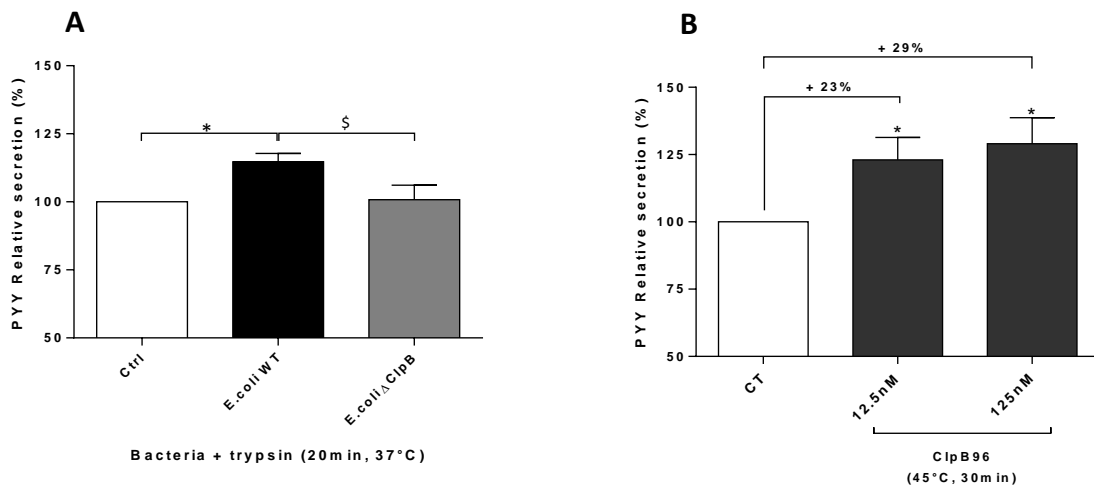


Figure 1. Effects of fragmentation on bacterial proteins and ClpB protein on PYY secretion.

PYY relative secretion (ng/ μ l) (A) after incubation of total proteins of *E. coli* K12 WT or *E. coli* Δ ClpB at 15ng/ml, after enzymatic fragmentation by trypsin (37°C, 20min) or (B) after incubation of ClpB protein at two concentrations: 13nM and 130nM, after thermal fragmentation (45°C, 30min). Data are means \pm SEM. Unpaired t-test (A, B); * $p < 0.05$, $\S p < 0.10$.

(Figure 2C) antibodies. A second Western Blot, after heat fragmentation (45°C during 30 min) of ClpB

protein, revealed a fragment of the same size with polyclonal anti- α -MSH (Figure 2B) or anti-ClpB (Figure 2D) antibodies.

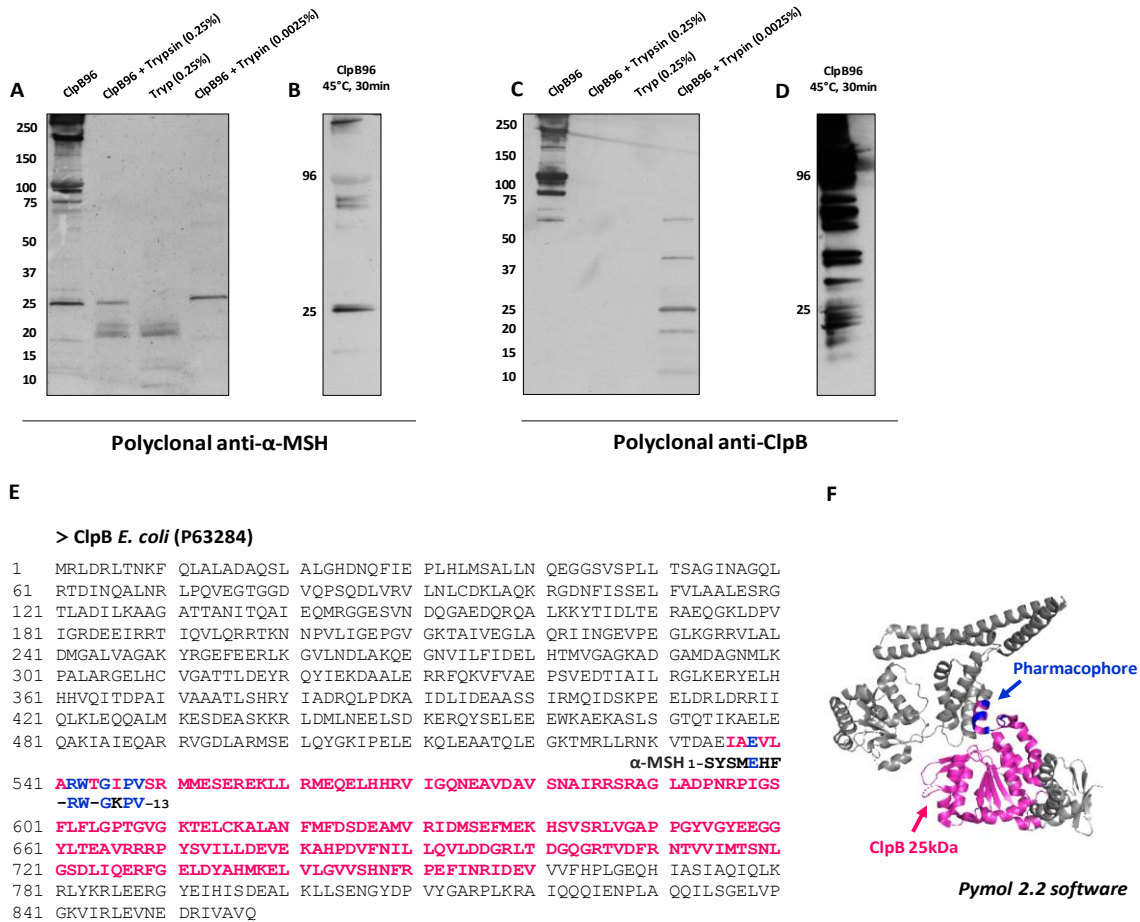


Figure 2. ClpB fragment (25kDa) identification by Western-Blot and localization on the sequence of ClpB protein.

Identification by Western Blot of a ClpB fragment (~25kDa) after enzymatic or thermal fragmentation revealed with (A, B) polyclonal anti- α -MSH and (C, D) polyclonal anti-ClpB. Localization of (A) the fragment (25kDa) on sequence of total ClpB protein according to the previously published by Axel Mogk et al. 2003. (B) ClpB25 position on ClpB protein three-dimensional structure realized by PyMOL software®.

Localization of the ClpB fragment (ClpB25) in ClpB protein sequence

The localization of the 25 kDa fragment ClpB was determined according to the previously published sequence(22). The sequence alignment between the Mogk fragment and the recombinant protein showed that this fragment was at the center of the ClpB protein and that it contained the molecular mimicry of α -MSH in its N-terminal part (Figure 2E). The 3D visualization performed on PyMOL software confirms these results (Figure 2F).

***In vivo* effects of ClpB in C57Bl/6 mice**

Single injection of ClpB96 or ClpB25 tended to decrease food intake, with a significant difference at 135 min after injection ($*p<0.05$) (Figure 3A). Compared to basal period, food intake decreased after injection of ClpB96 ($**p<0.01$) and ClpB25 ($\$p<0.10$) vs controls (Figure 3B). This decrease was more pronounced after ClpB96 than ClpB25 ($**p<0.01$) (Figure 3B). No difference in body weight was noted at the end of experiment (Figure 3C).

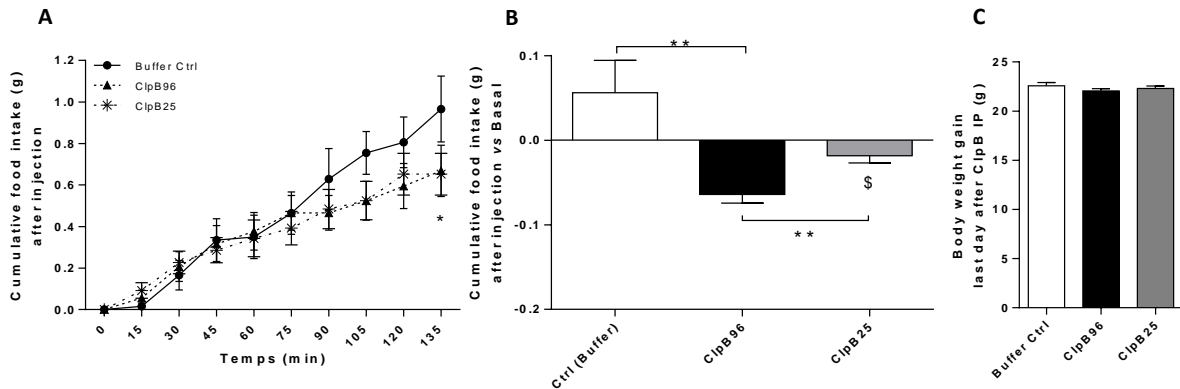


Figure 3. Effects of single injection of ClpB96 and ClpB25 on food intake in C57Bl/6.

(A) Cumulative food intake (g) measured 2h after one injection and (B) compared to basal period. (C) Body weight measured at the end of the experiment. Data are means \pm SEM. Two-way ANOVA test with Tukey's post-test (A), Unpaired t-test (B); $**p<0.01$, $*p<0.05$, $\$p<0.10$.

Repeated injections of ClpB96 at 0.95 $\mu\text{g/ml}$ in C57Bl/6 mice and *ob/ob* mice (Figure 4) significantly decreased food intake (Figure 4A, E). On average, food intake 2h after injection of ClpB96 over 11 days was reduced by 25% in C57Bl/6 (Figure 4B) and 22% in *ob/ob* mice (Figure 4F); the effect of each ClpB96 injection lasted approximately over 4 hours, and was followed by a rebound compensatory effect until the start of the day phase (Figure 4C, G). No difference on body weight was noted at the end of experiment (Figure 4D, H).

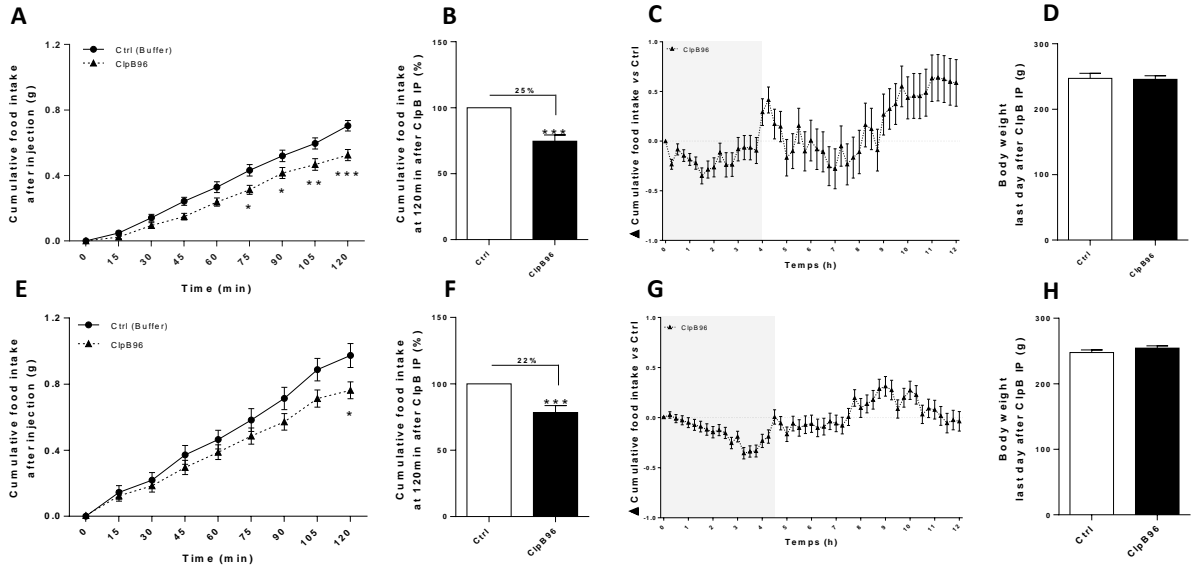


Figure 4. Effects of repeated injections of ClpB96 on food intake in C57Bl/6 and *ob/ob* mice.

Cumulative food intake (g) measured 2h after daily injection ClpB96 in (A, B, C) C57Bl/6 or (E, F, G) *ob/ob* mice for 11 days, (B and E) at the end of experiment, at 120min and (C, D) Δ cumulative food intake during 12h. Body weight gain (g) last day in (D) C57Bl/6 or (H) *ob/ob* mice. Data are means \pm SEM. Two-way ANOVA test with Sidak's post-test (A, E), Unpaired t-test (B, F); *** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05, $\$p$ <0.10.

Repeated injections of ClpB25 at 0.50 μ g/ml on C57Bl/6 or *ob/ob* mice (Figure 5) weren't decreased of food intake (Figure 5A, B, D, E). So, no difference on body weight was noted at the end of experiment (Figure 5C, F).

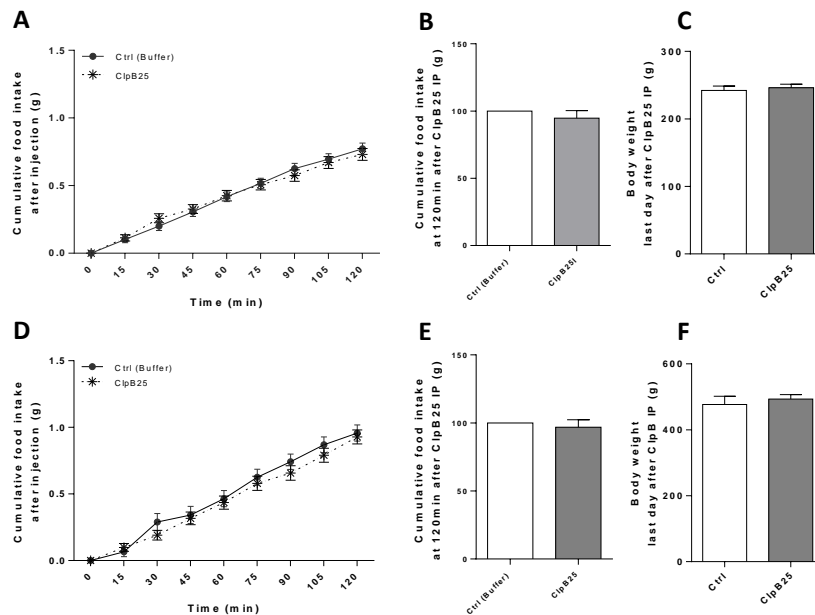


Figure 5. Effects of repeated injections of ClpB25 on food intake in C57Bl/6 and *ob/ob* mice.

Cumulative food intake (g) measured 2h after daily injection of ClpB25 in (A, B, C) C57Bl/6 or (E, F, G) *ob/ob* mice for 11 days, (B, E) at the end of experiment, at 120min. Body weight gain (g) last day in (C) C57Bl/6 or (F) *ob/ob* mice. Data are means \pm SEM. * p <0.05, $\$p$ <0.10.

Two repeated daily injections of ClpB96 at 0.95 $\mu\text{g}/\text{ml}$ on C57Bl/6 mice (**Figure 6**) significantly decreased food intake after 19 days of injection ($*p<0.05$) (**Figure 6A**) unlike injections of ClpB25 at 0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (**Figure 6C**). No difference on body weight was noted at the end of experiment (**Figure 6B, D**).

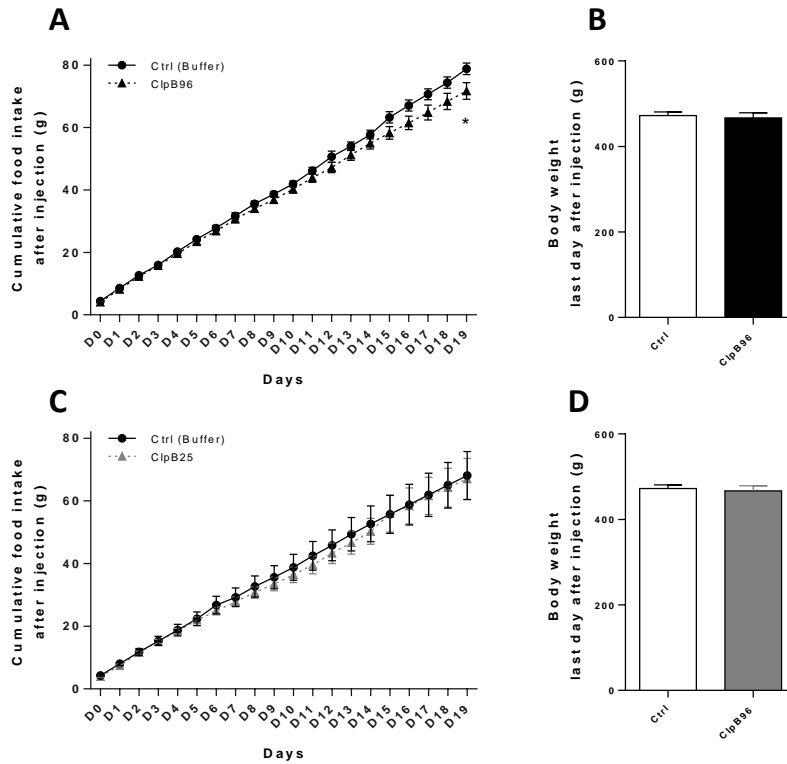


Figure 6. Effects of two daily repeated injections of ClpB96 and ClpB25 in C57Bl/6 mice.

Cumulative food intake (g) measured each day before injection of (A) ClpB96 and (C) ClpB25 in C57Bl/6 mice for 19 days. Body weight gain (g) last day in (B) for ClpB96 and (D) for ClpB25. Data are means \pm SEM. Two-way ANOVA test with Sidak's post-test (A) $*p<0.05$.

DISCUSSION

In this study, we demonstrated directly for the first time an *in vivo* anorexigenic effect of ClpB96 protein in mice. We also demonstrated an increase of PYY secretion in response to fragmented ClpB96 in an *in vitro* model of rat enteroendocrine intestinal cells; in contrast, the 25 kDa fragment of ClpB did influence *in vivo* food intake.

We recently reported that recombinant ClpB dose-dependently stimulated PYY secretion by rat intestinal enteroendocrine cells and that bacterial proteins of *E. coli* WT, containing ClpB protein also stimulated PYY secretion in this *in vitro* model while bacterial proteins of *E. coli* depleted of ClpB (*E.*

*coli*ΔClpB) did not affect PYY secretion (17). This PYY increase probably contributes at least in part to the anorexigenic effect of ClpB protein.

It is well established that enteroendocrine L-cells secrete satiety hormones, such as PYY or GLP-1 (24) and other studies have reported that PYY production may be elicited at least in part *via* activation of melanocortin 4 receptor (MC4R). Since ClpB has a molecular mimicry with α -MSH, the effects of ClpB on PYY secretion could be mediated by the MC4R receptor. However, this mechanism has not been confirmed so far.

The present study extends these findings by showing the anorexigenic potential of fragmented bacterial proteins of *E. coli* WT and of fragmented recombinant ClpB on PYY secretion by the rat intestinal enteroendocrine cells.

In this study, Western blot analysis with polyclonal anti- α -MSH and anti-ClpB of enzymatically or thermally fragmented ClpB revealed a high intensity band of 25 kDa (ClpB25). This fragment could be the same as that detected by Mock and collaborators in 2003 after incubation of the ClpB with the subtilisin enzyme (22). The fragment identified in this latter study held the pharmacophore's in the N-terminal position. By this characteristic, we can hypothesize that this fragment could account for the anorexigenic effects of ClpB protein. Due to its small size, this fragment may also pass the intestinal barrier and act centrally (16). For this reason, we have conducted *in vivo* studies on the effect of peritoneal injection of ClpB96 and ClpB25 on food intake. Single injection of ClpB96 or ClpB25 induced a decrease of food intake compared to the control, the stronger effect being obtained with ClpB96. Repeated injections confirmed a moderate anorexigenic effects of ClpB96 with a 20% decrease of food intake and that this effect lasted about 4 hours after injection as well in standard C57Bl/6 and in *ob/ob* mice. The lesser effect *ob/ob* mice could be related to the natural hyperphagic behavior of this model. Cessation of anorexigenic response to ClpB after a few hours may reflect the degradation of ClpB and/or return to baseline of PYY secretion, as already described in the post-prandial phase (28).

The central position of the pharmacophore of ClpB96 identified by sequence analysis is likely to confer protection against exonucleases in intestinal medium, explaining the anorexigenic effect of ClpB96. In contrast, the pharmacophore of ClpB25 is located in the N-terminal position, which can lead to a rapid degradation by exonucleases explaining the lack of effect of ClpB25 on food intake. Additional *in vivo* experiments with a modified formulation allowing protection of ClpB96 and of ClpB25 should be considered to determine if ClpB25 is really devoided of any anorexigenic effect and whether the anorexigenic effects of intact ClpB96 can be amplified.

Another issue is the limited duration of the anorexigenic effect after injection of ClpB96 in mice, followed by a compensatory effect (29) which can explain that no difference in body weight of standard C57Bl/6 or *ob/ob* mice was found at the end of experiments. Adapted timing of repeated dosage (e.g. every 4-6 hours) or development of prolonged delivery formulations may allow a sustained anorexigenic effect. Taking this into account, the continuous provision of ClpB producing bacteria such as *H. alvei* into the intestinal lumen *via* the oral route is already an efficient way of achieving a significant effect on body weight (15). However, further studies are needed to decipher the specific contribution of ClpB protein in the observed anorexigenic effect of this bacteria.

Finally, it would be interesting to evaluate the potential *in vivo* effects of fragments of the ClpB protein other than the ClpB25 one. Indeed, it looks plausible that the mechanisms of action of ClpB include a direct effect of the intact protein as well as additional effects of some of active fragments.

CONCLUSION

In conclusion, we confirmed in this study an anorexigenic effect of the recombinant ClpB protein on food intake. This brings additional arguments supporting the role of the gut microbiota and derived proteins and metabolites in the regulation of appetite. Our data suggest that improved formulations of ClpB protein and/or its fragments should be further evaluated for their potential utility in the therapeutic strategy of overweight and obesity.

DECLARATION OF INTEREST

MD is PhD employee of TargEDys. NL, RL, IB, CD were employees of TargEDys SA. PD and SF are consultant for TargEDys SA, shareholder and cofounder of the company. GL is the CEO of TargEDys SA. Other co-authors declare no conflict of interest.

STATEMENT OF AUTHORS' CONTRIBUTIONS

N.L., R.L., S.F., G.L., P.D., designed research; M.D., N.L., R.L., I.M.B., C.B.F., C.D., F.L., S.N., conducted research; J.C.d.R., provided essential materials; M.D., analyzed data; M.D., P.D., wrote the paper. P.D. had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

Supported by European Union and Normandie Regional Council. Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Fund (ERDF). The support of the TargEDys SA company and of

the Ministry of Industry and Technology for the funding of MD's PhD CIFRE thesis contract is acknowledged.

REFERENCES

1. World Health Organization (WHO). Obesity and Overweight [Internet]. 2018 [cited 2019 Sep 2]. Available from: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
2. Guh DP, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL, Anis AH. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*. 2009;9:88.
3. Hartemink N, Boshuizen HC, Nagelkerke NJD, Jacobs MAM, van Houwelingen HC. Combining risk estimates from observational studies with different exposure cutpoints: a meta-analysis on body mass index and diabetes type 2. *Am J Epidemiol*. 2006;163:1042–52.
4. Bergström A, Pisani P, Tenet V, Wolk A, Adami HO. Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. *Int J Cancer*. 2001;91:421–30.
5. Ni Mhurchu C, Rodgers A, Pan WH, Gu DF, Woodward M, Asia Pacific Cohort Studies Collaboration. Body mass index and cardiovascular disease in the Asia-Pacific Region: an overview of 33 cohorts involving 310 000 participants. *Int J Epidemiol*. 2004;33:751–8.
6. Castaner O, Goday A, Park Y-M, Lee S-H, Magkos F, Shioh S-ATE, Schröder H. The Gut Microbiome Profile in Obesity: A Systematic Review. *Int J Endocrinol* [Internet]. 2018 [cited 2019 Jun 16];2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5933040/>
7. Million M, Angelakis E, Maraninchi M, Henry M, Giorgi R, Valero R, Vialettes B, Raoult D. Correlation between body mass index and gut concentrations of *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis*, *Methanobrevibacter smithii* and *Escherichia coli*. *Int J Obes* 2005. 2013;37:1460–6.
8. Wang Y, Wang B, Wu J, Jiang X, Tang H, Nielsen OH. Modulation of Gut Microbiota in Pathological States. *Engineering*. 2017;3:83–9.
9. Fetissov SO. Role of the gut microbiota in host appetite control: bacterial growth to animal feeding behaviour. *Nat Rev Endocrinol*. 2017;13:11–25.
10. van de Wouw M, Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota-Gut-Brain Axis: Modulator of Host Metabolism and Appetite. *J Nutr*. 2017;147:727–45.
11. Manning S, Batterham RL. Enteroendocrine MC4R and energy balance: linking the long and the short of it. *Cell Metab*. 2014;20:929–31.
12. Panaro BL, Tough IR, Engelstoft MS, Matthews RT, Digby GJ, Møller CL, Svendsen B, Gribble F, Reimann F, Holst JJ, et al. The melanocortin-4 receptor is expressed in enteroendocrine L cells and regulates the release of peptide YY and glucagon-like peptide 1 in vivo. *Cell Metab*. 2014;20:1018–29.
13. Tennoune N, Chan P, Breton J, Legrand R, Chabane YN, Akkermann K, Järv A, Ouelaa W, Takagi K, Ghouzali I, et al. Bacterial ClpB heat-shock protein, an antigen-mimetic of the anorexigenic peptide α -MSH, at the origin of eating disorders. *Transl Psychiatry*. 2014;4:e458.
14. Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature*. 1997;385:165–8.
15. Legrand R, Lucas N, Dominique M, Azhar S, Deroissart C, Le Sollic M-A, Rondeaux J, Nobis S, Guérin C, Léon F, et al. Commensal *Hafnia alvei* strain reduces food intake and fat mass in obese mice - a new potential probiotic for appetite and body weight management (in press). *Int J Obes*. 2019;
16. Breton J, Tennoune N, Lucas N, Francois M, Legrand R, Jacquemot J, Goichon A, Guérin C, Peltier J, Pestel-Caron M, et al. Gut Commensal *E. coli* Proteins Activate Host Satiety Pathways following Nutrient-Induced Bacterial Growth. *Cell Metab*. 2016;23:324–34.

17. Dominique M, Breton J, Guérin C, Bole-Feysot C, Lambert G, Déchelotte P, Fetissov SO. Effects of macronutrients on the in vitro production of ClpB, a bacterial mimetic protein of α -MSH and its possible role in the satiety signaling. 2019;
18. Breton J, Legrand R, Akkermann K, Järv A, Harro J, Déchelotte P, Fetissov SO. Elevated plasma concentrations of bacterial ClpB protein in patients with eating disorders. *Int J Eat Disord*. 2016;49:805–8.
19. Dominique M, Legrand R, Galmiche M, Azhar S, Deroissart C, Guérin C, Do Rego J-L, Léon F, Nobis S, Lambert G, et al. Changes in microbiota and bacterial protein Caseinolytic peptidase B during food restriction in mice: relevance for the etiology and perpetuation of anorexia nervosa. 2019;
20. Fetissov SO, Hökfelt T. On the origin of eating disorders: altered signaling between gut microbiota, adaptive immunity and the brain melanocortin system regulating feeding behavior. *Curr Opin Pharmacol*. 2019;48:82–91.
21. Mogk A, Tomoyasu T, Goloubinoff P, Rüdiger S, Röder D, Langen H, Bukau B. Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J*. 1999;18:6934–49.
22. Mogk A, Schlieker C, Strub C, Rist W, Weibezahn J, Bukau B. Roles of individual domains and conserved motifs of the AAA+ chaperone ClpB in oligomerization, ATP hydrolysis, and chaperone activity. *J Biol Chem*. 2003;278:17615–24.
23. Psichas A, Sleeth ML, Murphy KG, Brooks L, Bewick GA, Hanyaloglu AC, Ghatei MA, Bloom SR, Frost G. The short chain fatty acid propionate stimulates GLP-1 and PYY secretion via free fatty acid receptor 2 in rodents. *Int J Obes* 2005. 2015;39:424–9.
24. Spreckley E, Murphy KG. The L-Cell in Nutritional Sensing and the Regulation of Appetite. *Front Nutr* [Internet]. 2015 [cited 2019 Mar 17];2. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4507148/>
25. Ericson MD, Schnell SM, Freeman KT, Haskell-Luevano C. A fragment of the *Escherichia coli* ClpB heat-shock protein is a micromolar melanocortin 1 receptor agonist. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015;25:5306–8.
26. Li SZ, Lee JH, Lee W, Yoon CJ, Baik JH, Lim SK. Type I beta-turn conformation is important for biological activity of the melanocyte-stimulating hormone analogues. *Eur J Biochem*. 1999;265:430–40.
27. Hogan K, Peluso S, Gould S, Parsons I, Ryan D, Wu L, Visiers I. Mapping the Binding Site of Melanocortin 4 Receptor Agonists: A Hydrophobic Pocket Formed by I3.28(125), I3.32(129), and I7.42(291) Is Critical for Receptor Activation. *J Med Chem*. 2006;49:911–22.
28. Adrian TE, Ferri GL, Bacarese-Hamilton AJ, Fuessl HS, Polak JM, Bloom SR. Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology*. 1985;89:1070–7.
29. Hambly C, Speakman JR. Contribution of different mechanisms to compensation for energy restriction in the mouse. *Obes Res*. 2005;13:1548–57.

Discussion et Perspectives

L'ensemble des résultats présentés dans cette thèse confirme l'implication du microbiote intestinal dans les mécanismes de régulation de l'appétit, par la production de la protéine ClpB dont les effets anorexigènes ouvrent des perspectives thérapeutiques prometteuses.

I. MODULATION DE LA PRODUCTION DE LA PROTEINE CLPB

I.1. Impact de l'alimentation

Il apparaît clairement aux vu des résultats présentés dans l'**Article 1**, que le type de macronutriments a une action différentielle à court terme sur la production de la protéine ClpB, avec un effet de la BSA qui augmente significativement sa production et son expression. Ces résultats corroborent avec la littérature où des études récentes montrent que les composants alimentaires tels que les protéines, les peptides ou encore les acides aminés sont capables d'activer le système Hsp (Moura et al. 2017). La glutamine, par exemple, induit une expression accrue de l'Hsp70 (Ehrenfried et al. 1995), (Wischmeyer 2002), (Singleton and Wischmeyer 2007) par opposition à un régime alimentaire riche en graisses qui réduit l'expression des protéines Hsp (Chung et al. 2008), (Henstridge, Whitham, and Febbraio 2014). Ces données suggèrent la raison pour laquelle dans notre étude *in vitro*, l'acide oléique n'a induit ni de production ni d'expression accrue de la protéine ClpB. D'autres études seraient nécessaires afin de comparer les effets de différents types de lipides (saturés, insaturés etc.) sur la production d'Hsp par les bactéries intestinales.

Au contraire, une restriction en acides aminés diminue l'activité du facteur de choc thermique HSF1, qui joue un rôle important dans la synthèse des protéines Hsp (Hensen et al. 2012). La protéine ClpB appartenant à cette famille, il est possible que sa production soit également médiée par les composants alimentaires présents tels que les protéines, les peptides où les acides aminés. De ce fait, la protéine ClpB pourrait contribuer à l'effet anorexigène des régimes hyperprotéidiques. Néanmoins, la composition de chaque macronutriment a des propriétés spécifiques qui peuvent induire des différences sur les concentrations de ClpB produites. Afin de contrecarrer ce biais, il serait intéressant d'effectuer de nouvelles études *in vivo* en testant différents régimes de valeurs protéiques croissantes et de vérifier s'il existe une corrélation entre la concentration en protéines et celle de la protéine ClpB. De plus, aucune étude n'a spécifiquement mis en évidence l'impact des macronutriments sur la proportion d'entérobactéries commensales au sein de l'intestin. Des analyses du microbiote par technique MALDI-TOF ou des études de métagénomique après un régime riche en protéines chez le Rongeur devraient permettre de confirmer le lien entre ce type d'alimentation riche en protéines et des proportions accrues d'*Enterobacteriaceae* et donc de la protéine ClpB.

Une supplémentation en glutamine de l'alimentation pourrait également être testée pour rechercher un effet sur la production de ClpB et sur la prise alimentaire et la sensibilité à l'insuline. Certaines études récentes indiquent en effet que la glutamine a des effets favorables sur l'insulino-résistance et qu'elle influence la composition du microbiote chez des patients obèses (Perna et al. 2019), (Prada et al. 2007). Cependant, ces études n'ont pas évalué la concentration de ClpB ni la proportion d'entérobactéries commensales.

II. MECANISMES DE PASSAGE DE LA PROTEINE CLPB A TRAVERS LA BARRIERE INTESTINALE

L'intégrité de la barrière intestinale est maintenue par des jonctions intercellulaires qui relient les entérocytes adjacents. Dans des conditions pathologiques tels que les troubles gastrointestinaux fonctionnels, la perméabilité intestinale est augmentée impliquant le passage accru de métabolites bactériens dans la circulation sanguine (Fukui 2016), (Shin et al. 2019). Concernant les troubles liés à l'alimentation, les études restent assez controversées particulièrement en ce qui concerne l'AN. En effet, une étude a montré une augmentation de la perméabilité colique dans le modèle ABA murin (Jésus et al. 2014) tandis qu'une autre étude a montré une diminution de la perméabilité de l'intestin grêle chez les patients atteints d'AN (Monteleone et al. 2004). Par ce manque d'informations, un des objectifs du laboratoire Inserm U 1073 est d'étudier de nombreux paramètres physiologiques caractéristiques de l'AN, dont la perméabilité intestinale chez une cohorte composée de 17 patientes atteintes d'AN et de 34 volontaires sains (cohorte PIANO). L'étude est actuellement en cours d'analyse.

Concernant l'obésité, les études sont plus en accord : les personnes touchées présentent une augmentation de la perméabilité intestinale (Teixeira et al. 2012).

Ces informations peuvent expliquer les concentrations plasmatiques élevées de ClpB retrouvées chez les patients atteints de TCA (Breton, Legrand, et al. 2016). Cependant à l'heure actuelle, le passage de la protéine ClpB à travers la muqueuse intestinale reste encore à être élucidé et plusieurs hypothèses peuvent être proposées :

II.1. Dans les cas pathologiques

Conformément aux données élaborées ultérieurement par le laboratoire (Breton, Legrand, et al. 2016), les données du **Manuscrit 1** indiquent qu'une augmentation de la protéine ClpB plasmatique après

une restriction alimentaire est corrélée à une augmentation de l'ADN des *Enterobacteriaceae* présent au niveau fécal.

En effet, plusieurs chercheurs ont rapporté qu'une restriction alimentaire stimulait la production et la réponse aux protéines de choc thermique (Moore et al. 1998), (Raynes et al. 2012). La restriction en nutriment peut donc être considérée comme un stress alimentaire qui peut induire une augmentation de l'expression des protéines Hsp ; et donc par analogie de la protéine ClpB.

Un déficit en ClpB peut avoir de graves conséquences sur les fonctions vitales de l'organisme. En effet, ce dernier peut entraîner une neutropénie ou encore des problèmes neurologiques (Wortmann, Wevers, and de Brouwer 1993) et peut même être à l'origine de maladie tels que Parkinson ou encore Alzheimer (Ross and Poirier 2004). Mais son augmentation peut aussi entretenir l'anorexie. Comme précisé précédemment, les pathologies intestinales sont associées à une augmentation de la perméabilité intestinale (Fukui 2016), ce qui implique un passage accru de molécules produites par le microbiote, de pathogènes ou de nutriments qui se retrouvent dans la circulation sanguine. Mais la structure et la perméabilité de la barrière intestinale tiennent surtout de la présence des espèces bactériennes qui la compose (Hayes et al. 2018), (Natividad and Verdu 2013). Des expériences de colonisation de microbiotes chez des souris axéniques ont montré que ce microbiote était responsable de la formation de la couche de mucus entre les bactéries et les cellules épithéliales (Hayes et al. 2018). Par conséquent, la perte d'efficacité de la barrière intestinale requière souvent d'une dysbiose intestinale.

Ces dysbioses sont spécifiques de la pathologie. En effet, les patients atteints de TCA, comme l'AN présentent des taux de Firmicutes plus faibles (Breton, Déchelotte, and Ribet 2019) que ceux atteints d'obésité (Castaner et al. 2018). De plus, les études des espèces microbiennes présentes dans l'anorexie mentale (AN) (*E. coli*) corroborent avec l'augmentation des bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* retrouvées dans le contenu colique des souris ABA.

II.2. Via des mécanismes de passages transcellulaires

Dans le cas d'une restriction alimentaire comme c'est le cas dans l'AN, l'augmentation des bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* engendrent nécessairement une hausse importante des concentrations de ClpB et de ses fragments naturels au niveau de la lumière intestinale. De ce fait, en fonction de leurs tailles, ces molécules pourraient traverser librement en fonction d'un gradient de concentration la membrane de façon dites « passive ».

Néanmoins, comme il l'a été suggéré plusieurs fois au sein de ce manuscrit, le passage de la protéine ClpB et/ou de ses fragments à travers la muqueuse pourrait nécessiter l'action d'un transporteur

spécifique. C'est le cas, des protéines issues de l'alimentation par exemple. Leurs transporteurs sont spécifiques à chaque acide aminé et sont pour la plupart ions dépendants (cf Chapitre 2, Partie A, 5).

Par ailleurs, en raison de la structure physique de la membrane plasmique de l'entérocyte, il est peu probable que les macromolécules puissent traverser la bicouche lipidique. Contrairement aux petites molécules, les macromolécules pénètrent majoritairement par un mécanisme d'endocytose spécifique : la pinocytose (Conner and Schmid 2003) ; qui permet la capture de macromolécules et de fluides dans de petites vésicules.

Le transport de peptides et de protéines intactes et biologiquement actives à travers la lumière intestinale est un phénomène qui existe et qui est déjà connu avec l'insuline (Gardner 1988), (Ziv and Bendayan 2000). Le passage de la protéine ClpB selon ce mécanisme permettrait d'expliquer qu'elle puisse conservée ses effets. Néanmoins, les mécanismes par lesquels ces molécules sont transférées de la lumière intestinale à la circulation sanguine font encore l'objet de nombreux débats et restent à être confirmés. Par son haut poids moléculaire (96kDa), la protéine ClpB pourrait être transportée par des mécanismes de transcytose/endocytose à travers la muqueuse colique. En effet, des protéines du lait telles que la β -lactoglobuline (18,36 kDa) et l' α -lactalbumine (14,2 kDa) peuvent traverser les entérocytes *via* un mécanisme d'endocytose et atteindre le côté basolatéral par un mécanisme de transcytose (Caillard et Tomé 1995). Une protéine, d'un poids moléculaire supérieur, telle que la peroxydase de raifort (HRP), une glycoprotéine de 44 kDa, peut pénétrer dans les cellules absorbantes intestinales par un mécanisme d'endocytose apicale (Blok et al., 1981).

II.3. *Via* des mécanismes de passages paracellulaires

Dans certaines situations pathologiques, l'espace intercellulaire entre les entérocytes est augmenté (Buckley and Turner, 2018). De ce fait, les petits fragments issus de la fragmentation de la protéine ClpB pourraient traverser la barrière intestinale par des voies paracellulaires. Pour cela, le TEER (*Trans Epithelial Electrical Resistance*) est une technique utilisée afin de caractériser les voies d'entrées des molécules à travers la muqueuse colique et de différencier leurs passages par la voie intracellulaire de la voie paracellulaire. Cette technique aurait pu permettre de confirmer le potentiel passage des fragments de la protéine ClpB à travers la muqueuse colique.

III. EFFETS ANOREXIGENES DE LA PROTEINE CLPB

III.1. *Via* la sécrétion de peptides satiétogènes

Les résultats de l'**Article 1** mettent en évidence la première preuve selon laquelle la protéine ClpB stimule la sécrétion de PYY par les cellules entéro-endocrines de l'intestin. Une étude de l'UMR 1073,

avait montré en 2016 qu'une injection aiguë de protéines totales extraites d'*E. coli* WT chez le Rat augmentait la concentration de PYY dans les conditions où les concentrations de la protéine ClpB étaient les plus élevées (phase stationnaire de croissance d'*E. coli*) (Breton, 2016). Cependant aucune étude n'avait encore montré réellement l'effet direct de cette protéine sur la libération de PYY.

Même si le mécanisme utilisé pour cette libération reste encore à être éclairci, une des hypothèses proposées actuellement serait que la protéine ClpB puisse libérer les peptides satiétogènes *via* l'activation du récepteur MC4-R. En effet, ce récepteur localisé sur la face basale des cellules entéro-endocrines de l'intestin est en contact direct avec les métabolites de la circulation sanguine. La protéine ClpB circulante pourrait par son mimétisme avec l' α -MSH, être capable d'activer le récepteur MC4-R et stimuler la libération de PYY et le GLP-1. Des expérimentations sont actuellement en cours afin de confirmer cette hypothèse. En effet, la séquence minimale requise pour l'activation de ce récepteur est His-Phe-Arg-Trp (Chapman et al. 2010), cependant, la protéine ClpB ne contient pas les résidus His et Phe. Par ailleurs, une étude de l'équipe d'Ericson ayant synthétisé un fragment de la protéine ClpB (535-548aa) contenant le mimétisme moléculaire de la ClpB avec l' α -MSH n'a montré aucune activation du récepteur MC4-R *in vitro* (Ericson et al. 2015). L'activation de ce récepteur requiert des conditions conformationnelles très spécifiques comme : une conformation β -turn de type comprenant des résidus Asp-His- (DPhe) -Arg qui est nécessaire pour la sélectivité avec l' α -MSH (Li et al. 1999) ; ou la présence d'une poche hydrophobe et aliphatique formée avec les résidus 125, 129 et 291, qui joue un rôle crucial dans le mécanisme d'activation du MC4R (Hogan et al. 2006). L'ensemble de ces études révèle la faible probabilité de l'activation directe de la protéine ClpB sur le MC4-R. Néanmoins, des études sont actuellement en cours afin de le confirmer. Même si le mécanisme d'action de la protéine ClpB sur la libération des peptides satiétogènes reste encore inconnu, les travaux de l'**Article 1** apportent une réelle preuve de son implication sur leurs sécrétions et particulièrement celle de PYY.

III.2. *Via* la sécrétion d'auto-Ac

Les résultats du **Manuscrit 1** suggèrent un rôle de la protéine ClpB sur la production des auto-Ac anti-ClpB et anti- α -MSH. La restriction alimentaire peut à elle seule induire une augmentation de la sécrétion d'auto-Ac anti- α -MSH (Sinno et al. 2009) et la sécrétion accrue de la protéine ClpB chez les personnes présentant un TCA (Breton, Legrand, et al. 2016) en est sûrement aussi la cause principale. De plus, les personnes atteintes d'AN et de BN présentent également de fortes concentrations plasmatiques d'anticorps anti- α -MSH (Lucas et al. 2019) qui sont capables de former un complexe avec l' α -MSH et d'activer le MC4-R (Lucas et al. 2019).

Bien que d'autres études soient nécessaires, la protéine ClpB pourrait déréguler les mécanismes de l'appétit en modifiant l'action des auto-Ac anti- α -MSH *via* la production d'auto-Ac anti-ClpB.

III.3. Action directe de la protéine ClpB recombinante

Appuyé par les effets de la protéine ClpB sur le PYY, la suite des travaux présentée dans le **Manuscrit 2** a pu confirmer l'action anorexigène modérée de la protéine ClpB recombinante (ClpB96) jamais démontré auparavant. Ces résultats sont en adéquation avec les études précédentes effectuées au laboratoire UMR 1073 montrant que l'injection de protéines bactériennes d'*E. coli* (productrice de la protéine ClpB) induit une diminution de la prise alimentaire et une augmentation du PYY plasmatique chez le Rat (Breton, Tennoune, et al. 2016b). Les résultats du **Manuscrit 2** décrivent néanmoins que la protéine ClpB induit une diminution modérée de la prise alimentaire mais sans effet sur le poids corporel des animaux à la fin de l'expérience. Ce résultat peut être expliqué par un effet compensatoire des souris qui recommencent à manger afin de revenir à un état d'équilibre énergétique normal (Hambly and Speakman 2005). Par ailleurs, l'hyperphagie des souris *ob/ob* peut expliquer pourquoi l'injection de la ClpB a induit une diminution de la prise alimentaire plus faible que pour les souris contrôles.

La protéine ClpB a induit une diminution de la prise alimentaire de 25 et 22%, chez la souris C57Bl/6 et la souris *ob/ob* respectivement, 120min après l'injection. Dans des conditions physiologiques, la protéine ClpB peut être dégradée par des exonucléases qui peuvent impacter ses fonctions. En effet, la protéine ClpB est composée de deux domaines de liaison à l'ATP : NBD-1 et NBD-2 (Axel Mogk et al. 2003) qui sont essentiels dans son rôle de désagrégation des protéines et qui par conséquent peuvent également l'être dans son rôle modulateur de l'appétit. La conformation de cette protéine n'étant plus assurée, elle ne peut pas induire la sécrétion de PYY.

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle l'action des exonucléases peut réprimer l'action de la protéine ClpB, il serait nécessaire de réitérer ces expérimentations en protégeant la protéine en modifiant sa forme galénique par exemple.

III.4. Action anorexigène des fragments de la protéine ClpB

Les travaux du **Manuscrit 2** ont également permis de mettre en lumière, le phénomène de fragmentation naturelle de la protéine ClpB (A. Mogk et al. 1999) et de s'intéresser spécifiquement à l'action anorexigène de l'un de ses fragments. Ce fragment (~25kDa) nommé ClpB25 n'a pas induit d'effet sur la prise alimentaire des souris.

Un fragment d'un même poids moléculaire a été généré par une fragmentation thermique et enzymatique (par la trypsine). La trypsine hydrolyse les liaisons peptidiques situées au niveau d'un résidu lysine ou arginine qui ne sont pas des acides aminés présents au niveau du mimétisme moléculaire que la ClpB a en commun avec l' α -MSH (pharmacophore). Ce fragment n'est donc pas dégradé par l'enzyme. Cependant, l'alignement de ClpB25 avec la séquence totale de la protéine ClpB96 montre que la séquence similaire au pharmacophore de l' α -MSH est située au niveau de la séquence N-terminale de la protéine ClpB. En présence d'exonucléases, il serait en premier dégradé ce qui entraînerait une perte d'effets de ce fragment, si l'effet anorexigène est réellement médié par la présence du pharmacophore. Comme pour la protéine ClpB, des études de galénique seraient aussi nécessaires afin d'assurer la protection du fragment et d'étudier sa réelle efficacité.

Des études de protéomiques sont actuellement en cours afin de confirmer que le fragment généré par les trois types de fragmentations envisagées (naturelle, thermique et enzymatique) présenterait une séquence identique à celle testée *in vivo* (ClpB25). Ceci a été un des objectifs de cette thèse durant les deux dernières années. Pour cela plusieurs techniques ont été utilisées telles que des analyses 2D et des immunoprécipitations par billes d'agaroses ou magnétiques etc. Cependant face à des difficultés de mise au point des techniques nécessaires à l'élaboration de ce projet, aucun résultat interprétable n'a pu être généré pour le moment.

III.5. Action centrale de la protéine ClpB

La question sur l'action centrale de la ClpB est également une question à laquelle il serait intéressant de répondre. En effet, une étude d'électrophysiologie avait montré que la protéine ClpB était capable de stimuler des neurones POMC isolés (Breton, Tennoune, et al. 2016), confirmant ainsi sa possible activité au niveau central. Cependant, des expériences d'immunomarquages après injections IP de ClpB (1nM) chez la souris C57Bl/6 n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de la protéine ClpB au niveau de l'ARC ou de l'éminence médiane (Données non présentées ou publiées, Master 2 - Pauline Tirelle). Même si ces résultats concluent sur la faible probabilité de retrouver la protéine ClpB au niveau central, ces expériences devront être répétées et confirmées en utilisant une dose anorexigène similaire à celle utilisée dans le **Manuscrit 2** et en utilisant un système de marquage de la protéine.

Par ailleurs, des études récentes ont montré que les cellules entéro-endocrines de l'intestin étaient innervées et qu'elles présentaient un processus cytoplasmique basal, appelé « neuropode », qui pourrait constituer une véritable liaison entre l'intestin et le cerveau (Bohórquez et al. 2011),

(Bohórquez et al. 2014). Par le biais de ces structures, il est possible d'imaginer que la protéine ClpB puisse induire des effets anorexigènes sur la prise alimentaire.

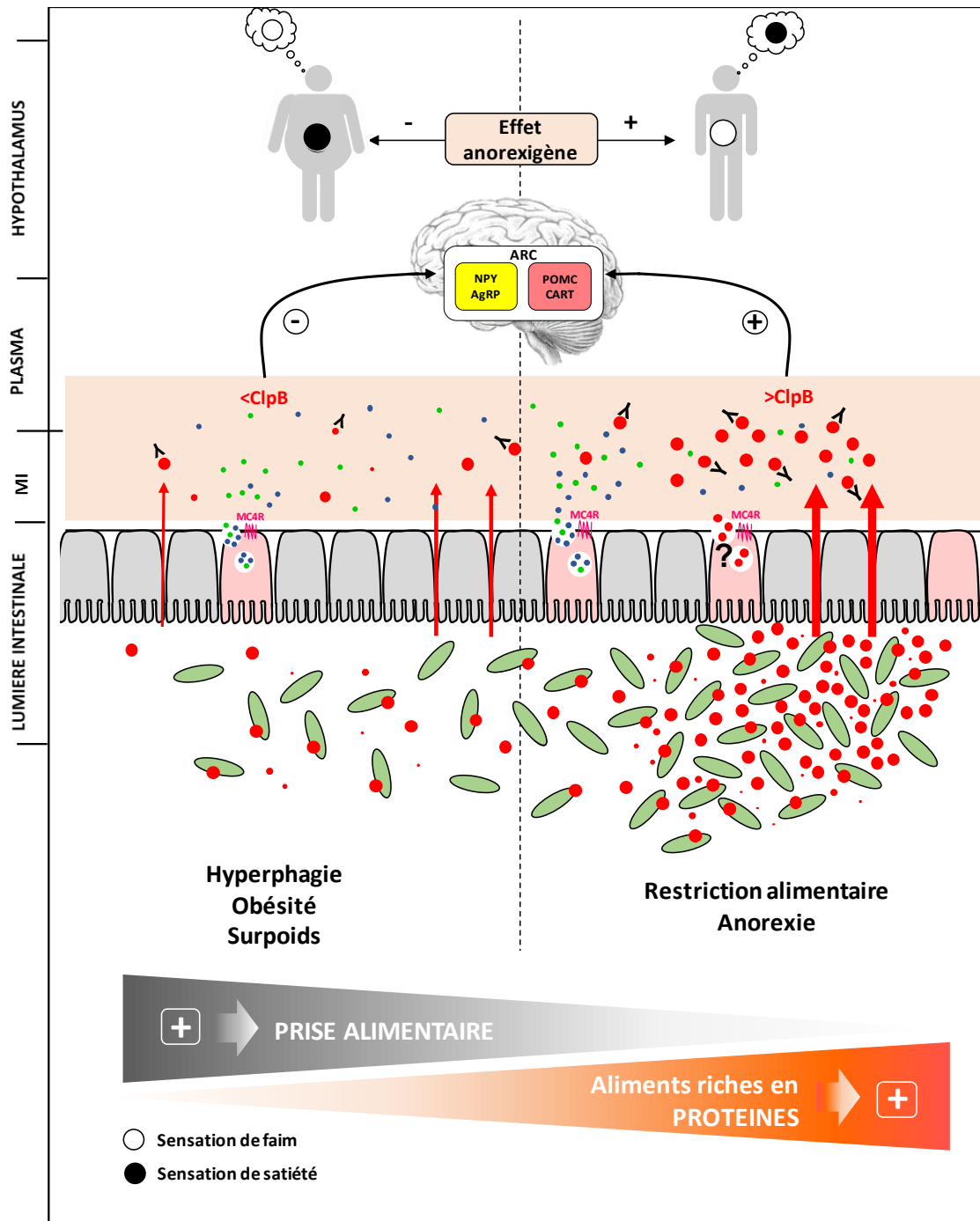


Figure 32. Modèle hypothétique des mécanismes physiologiques mis en jeu dans les troubles liés à l'alimentation

Le manque d'apport alimentaire lors d'une restriction alimentaire va conduire à une dysbiose au niveau du microbiote qui est caractérisée par une augmentation du nombre d'entérobactéries (ovale vert). Cette augmentation va générer une production accrue de la protéine ClpB (rond rouge). Une alimentation riche en protéine peut également contribuer à amplifier cette production. Par la suite, la protéine ClpB va pouvoir traverser la barrière intestinale par plusieurs mécanismes qui restent encore à être déterminés (transcytose, endocytose, via l'activation du MC4-R, etc (?)). Dans la lumière intestinale, les fragments naturels de la protéine ClpB engendrés par l'action de diverses enzymes gastro-intestinales pourraient traverser la barrière intestinale selon les mêmes mécanismes utilisés par la protéine ClpB native (pour les fragments de plus grande taille) par des mécanismes de passage paracellulaires. Cette protéine se retrouve ensuite dans la circulation sanguine avec les peptides satiétogènes (GLP-1 (rond vert), PYY (rond bleu)) qui sont libérés via l'activation du récepteur MC4-R (rose) présent sur les cellules L (rose clair). Par la présence de la protéine ClpB et par la restriction alimentaire, des auto-anticorps anti-ClpB et anti- α -MSH sont sécrétés dans la circulation sanguine (γ). Chez les patients atteints d'AN, la protéine ClpB, en raison de son action anorexigène pourra activer les populations neuronales anorexigènes POMC ce qui entraînera une augmentation de la sensation de satiété alors que cela ne sera pas le cas réellement. Chez les patients obèses au contraire, les concentrations de ClpB sont plus faibles ce qui entraîne peu ou pas de modification de la satiété. La sensation de faim revient alors très vite ce qui explique les apports alimentaires démesurés et inadaptés chez ces patients.

Conclusion

L'ensemble des données présentée dans ce manuscrit de thèse ont permis de caractériser de nouveaux éléments pour une meilleure compréhension du rôle du microbiote et des mécanismes physiologiques mis en jeu dans les troubles liés à l'alimentation, par l'implication de la production de la protéine ClpB. Un modèle hypothétique prenant en compte l'ensemble de ces éléments est résumé dans la **Figure 31**.

Conformément à cette hypothèse, un probiotique sous le nom d'EnteroSatys® a été développé par la société TargEDys SA, à partir de la souche bactérienne *H. alvei*.

Même si les études *in vivo* présentées dans ce manuscrit montrent que cette protéine ne semble offrir qu'un effet anorexigène limité et à court terme sur la prise alimentaire, elle apporte tout de même des explications intéressantes sur la régulation de l'appétit. De plus, sa production est dépendante de l'alimentation et plus particulièrement du type de macronutriments ingéré. Cela amène à envisager, d'un point de vue thérapeutique, la proposition d'une supplémentation du probiotique EnteroSatys® avec un régime riche en protéine comme un traitement plus efficace dans le contrôle et la perte du poids chez les personnes obèses.

Dans le cas de l'AN, le modèle explicatif proposé et la corrélation positive entre la protéine ClpB plasmatique et les *Enterobacteriaceae* au niveau du microbiote apportent des explications sur « l'altération de la sensation de faim », chez les patients AN mais révèle également la réelle complexité de la maladie. La restriction alimentaire étant une caractéristique importante de cette pathologie, la prise de probiotiques et/ou prébiotiques visant à restaurer le microbiote intestinal pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante à développer pour ces patients.

Par ailleurs, l'action similaire de la fragmentation de la protéine ClpB sur la sécrétion de PYY dans un modèle *in vitro* de culture intestinale de Rat laisse envisager une action anorexigène plus forte, des fragments de la ClpB ou de l'un d'eux en particulier sur la prise alimentaire. La découverte des ou du fragment responsable de l'effet anorexigène serait un élément clé dans la thérapie de l'obésité.

Mêmes si toutes ces stratégies thérapeutiques restent toute de même très hypothétique compte tenu du caractère complexe de ces pathologies et du facteur psychologique important dans les TCA, l'ensemble de ces éléments ouvrent de réelles perspectives thérapeutiques dans les troubles liés à l'alimentation.

Références bibliographiques

- Abbott, C. R., M. Rossi, A. M. Wren, K. G. Murphy, A. R. Kennedy, S. A. Stanley, A. N. Zollner, et al. 2001. "Evidence of an Orexigenic Role for Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript after Administration into Discrete Hypothalamic Nuclei." *Endocrinology* 142 (8): 3457–63. <https://doi.org/10.1210/endo.142.8.8304>.
- Adrian, T. E., G. L. Ferri, A. J. Bacarese-Hamilton, H. S. Fuessl, J. M. Polak, and S. R. Bloom. 1985. "Human Distribution and Release of a Putative New Gut Hormone, Peptide YY." *Gastroenterology* 89 (5): 1070–77.
- Aja, S., S. Sahandy, E. E. Ladenheim, G. J. Schwartz, and T. H. Moran. 2001. "Intracerebroventricular CART Peptide Reduces Food Intake and Alters Motor Behavior at a Hindbrain Site." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 281 (6): R1862–1867. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.281.6.R1862>.
- Akerberg, Helena, Bengt Meyerson, Marie Sallander, Anne-Sofie Lagerstedt, Ake Hedhammar, and Dan Larhammar. 2010. "Peripheral Administration of Pancreatic Polypeptide Inhibits Components of Food-Intake Behavior in Dogs." *Peptides* 31 (6): 1055–61. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.03.019>.
- Akhavan, Tina, and G. Harvey Anderson. 2007. "Effects of Glucose-to-Fructose Ratios in Solutions on Subjective Satiety, Food Intake, and Satiety Hormones in Young Men." *The American Journal of Clinical Nutrition* 86 (5): 1354–63. <https://doi.org/10.1093/ajcn/86.5.1354>.
- Allen, Y. S., T. E. Adrian, J. M. Allen, K. Tatemoto, T. J. Crow, S. R. Bloom, and J. M. Polak. 1983. "Neuropeptide Y Distribution in the Rat Brain." *Science (New York, N.Y.)* 221 (4613): 877–79.
- Alon, Tamar, and Jeffrey M. Friedman. 2006. "Late-Onset Leanness in Mice with Targeted Ablation of Melanin Concentrating Hormone Neurons." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (2): 389–97. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1203-05.2006>.
- Anand, Bal K., and John R. Brobeck. 1951. "Hypothalamic Control of Food Intake in Rats and Cats." *The Yale Journal of Biology and Medicine* 24 (2): 123–40.
- Anderson, G. Harvey, Sandy N. Tecimer, Deepa Shah, and Tasleem A. Zafar. 2004. "Protein Source, Quantity, and Time of Consumption Determine the Effect of Proteins on Short-Term Food Intake in Young Men." *The Journal of Nutrition* 134 (11): 3011–15. <https://doi.org/10.1093/jn/134.11.3011>.
- Anderson, G. Harvey, and Dianne Woodend. 2003. "Consumption of Sugars and the Regulation of Short-Term Satiety and Food Intake." *The American Journal of Clinical Nutrition* 78 (4): 843S–849S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.4.843S>.
- Andreeva, Valentina A., Marie-Pierre Tavalacci, Pilar Galan, Joel Ladner, Camille Buscail, Sandrine Péneau, Marie Galmiche, Serge Hercberg, Pierre Déchelotte, and Chantal Julia. 2019.

- “Sociodemographic Correlates of Eating Disorder Subtypes among Men and Women in France, with a Focus on Age.” *J Epidemiol Community Health* 73 (1): 56–64. <https://doi.org/10.1136/jech-2018-210745>.
- Aponte, Yexica, Deniz Atasoy, and Scott M. Sternson. 2011. “AGRP Neurons Are Sufficient to Orchestrate Feeding Behavior Rapidly and without Training.” *Nature Neuroscience* 14 (3): 351–55. <https://doi.org/10.1038/nn.2739>.
- Arletti, R., A. Benelli, and A. Bertolini. 1989. “Influence of Oxytocin on Feeding Behavior in the Rat.” *Peptides* 10 (1): 89–93.
- Armougom, Fabrice, Mireille Henry, Bernard Vialettes, Denis Raccach, and Didier Raoult. 2009. “Monitoring Bacterial Community of Human Gut Microbiota Reveals an Increase in Lactobacillus in Obese Patients and Methanogens in Anorexic Patients.” *PloS One* 4 (9): e7125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007125>.
- Asakawa, A., A. Inui, T. Kaga, H. Yuzuriha, T. Nagata, N. Ueno, S. Makino, et al. 2001. “Ghrelin Is an Appetite-Stimulatory Signal from Stomach with Structural Resemblance to Motilin.” *Gastroenterology* 120 (2): 337–45. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.22158>.
- Asakawa, Akihiro, Akio Inui, Hideki Yuzuriha, Naohiko Ueno, Goro Katsuura, Mineko Fujimiya, Masayuki A. Fujino, Akira Niiijima, Michael M. Meguid, and Masato Kasuga. 2003. “Characterization of the Effects of Pancreatic Polypeptide in the Regulation of Energy Balance.” *Gastroenterology* 124 (5): 1325–36.
- Asp, N. G. 1994. “Nutritional Classification and Analysis of Food Carbohydrates.” *The American Journal of Clinical Nutrition* 59 (3 Suppl): 679S-681S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/59.3.679Sa>.
- Azadbakht, Leila, Parvin Mirmiran, Ahmad Esmailzadeh, and Fereidoun Azizi. 2007. “Better Dietary Adherence and Weight Maintenance Achieved by a Long-Term Moderate-Fat Diet.” *The British Journal of Nutrition* 97 (2): 399–404. <https://doi.org/10.1017/S0007114507328602>.
- Baba, N. H., S. Sawaya, N. Torbay, Z. Habbal, S. Azar, and S. A. Hashim. 1999. “High Protein vs High Carbohydrate Hypoenergetic Diet for the Treatment of Obese Hyperinsulinemic Subjects.” *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 23 (11): 1202–6.
- Baggio, Laurie L., Qingling Huang, Theodore J. Brown, and Daniel J. Drucker. 2004. “Oxyntomodulin and Glucagon-like Peptide-1 Differentially Regulate Murine Food Intake and Energy Expenditure.” *Gastroenterology* 127 (2): 546–58. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.04.063>.
- Bagnol, D., X. Y. Lu, C. B. Kaelin, H. E. Day, M. Ollmann, I. Gantz, H. Akil, G. S. Barsh, and S. J. Watson. 1999. “Anatomy of an Endogenous Antagonist: Relationship between Agouti-Related Protein

- and Proopiomelanocortin in Brain.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19 (18): RC26.
- Baldini, Giulia, and Kevin D. Phelan. 2019. “The Melanocortin Pathway and Control of Appetite-Progress and Therapeutic Implications.” *The Journal of Endocrinology* 241 (1): R1–33. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0596>.
- Balland, Eglantine, Julie Dam, Fanny Langlet, Emilie Caron, Sophie Steculorum, Andrea Messina, S. Rasika, et al. 2014. “Hypothalamic Tanycytes Are an ERK-Gated Conduit for Leptin into the Brain.” *Cell Metabolism* 19 (2): 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.12.015>.
- Balthasar, Nina, Roberto Coppari, Julie McMinn, Shun M. Liu, Charlotte E. Lee, Vinsee Tang, Christopher D. Kenny, et al. 2004. “Leptin Receptor Signaling in POMC Neurons Is Required for Normal Body Weight Homeostasis.” *Neuron* 42 (6): 983–91. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.06.004>.
- Banting, F. G., C. H. Best, J. B. Collip, W. R. Campbell, and A. A. Fletcher. 1922. “Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus.” *Canadian Medical Association Journal* 12 (3): 141–46.
- Batterham, R. L., C. W. Le Roux, M. A. Cohen, A. J. Park, S. M. Ellis, M. Patterson, G. S. Frost, M. A. Ghatei, and S. R. Bloom. 2003. “Pancreatic Polypeptide Reduces Appetite and Food Intake in Humans.” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88 (8): 3989–92. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030630>.
- Batterham, Rachel L., Michael A. Cowley, Caroline J. Small, Herbert Herzog, Mark A. Cohen, Catherine L. Dakin, Alison M. Wren, et al. 2002. “Gut Hormone PYY(3-36) Physiologically Inhibits Food Intake.” *Nature* 418 (6898): 650–54. <https://doi.org/10.1038/nature00887>.
- Batterham, Rachel L., Helen Heffron, Saloni Kapoor, Joanna E. Chivers, Keval Chandarana, Herbert Herzog, Carel W. Le Roux, E. Louise Thomas, Jimmy D. Bell, and Dominic J. Withers. 2006. “Critical Role for Peptide YY in Protein-Mediated Satiation and Body-Weight Regulation.” *Cell Metabolism* 4 (3): 223–33. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.08.001>.
- Beaumont, K., M. A. Kenney, A. A. Young, and T. J. Rink. 1993. “High Affinity Amylin Binding Sites in Rat Brain.” *Molecular Pharmacology* 44 (3): 493–97.
- Bednarek, M. A., S. D. Feighner, S. S. Pong, K. K. McKee, D. L. Hreniuk, M. V. Silva, V. A. Warren, A. D. Howard, L. H. Van Der Ploeg, and J. V. Heck. 2000. “Structure-Function Studies on the New Growth Hormone-Releasing Peptide, Ghrelin: Minimal Sequence of Ghrelin Necessary for Activation of Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a.” *Journal of Medicinal Chemistry* 43 (23): 4370–76.
- Begrache, Karima, Gregory M. Sutton, and Andrew A. Butler. 2011. “Homeostatic and Non-Homeostatic Functions of Melanocortin-3 Receptors in the Control of Energy Balance and

- Metabolism.” *Physiology & Behavior* 104 (4): 546–54.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.04.007>.
- Bellinger, Larry L., and Lee L. Bernardis. 2002. “The Dorsomedial Hypothalamic Nucleus and Its Role in Ingestive Behavior and Body Weight Regulation: Lessons Learned from Lesioning Studies.” *Physiology & Behavior* 76 (3): 431–42. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(02\)00756-4](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(02)00756-4).
- Bellissimo, Nick, and Tina Akhavan. 2015. “Effect of Macronutrient Composition on Short-Term Food Intake and Weight Loss.” *Advances in Nutrition* 6 (3): 302S–308S. <https://doi.org/10.3945/an.114.006957>.
- Belza, Anita, Christian Ritz, Meise Q. Sørensen, Jens J. Holst, Jens F. Rehfeld, and Arne Astrup. 2013. “Contribution of Gastroenteropancreatic Appetite Hormones to Protein-Induced Satiety.” *The American Journal of Clinical Nutrition* 97 (5): 980–89. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.047563>.
- Bendtsen, Line Q., Janne K. Lorenzen, Nathalie T. Bendtsen, Charlotte Rasmussen, and Arne Astrup. 2013. “Effect of Dairy Proteins on Appetite, Energy Expenditure, Body Weight, and Composition: A Review of the Evidence from Controlled Clinical Trials.” *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)* 4 (4): 418–38. <https://doi.org/10.3945/an.113.003723>.
- Benjamin Cumming*. 2007. Pearson Education.
- Berglund, Eric D., Chen Liu, Jong-Woo Sohn, Tiemin Liu, Mi Hwa Kim, Charlotte E. Lee, Claudia R. Vianna, Kevin W. Williams, Yong Xu, and Joel K. Elmquist. 2013. “Serotonin 2C Receptors in Pro-Opiomelanocortin Neurons Regulate Energy and Glucose Homeostasis.” *The Journal of Clinical Investigation* 123 (12): 5061–70. <https://doi.org/10.1172/JCI70338>.
- Bernardis, L. L., and L. L. Bellinger. 1996. “The Lateral Hypothalamic Area Revisited: Ingestive Behavior.” *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 20 (2): 189–287.
- Bewick, Gavin A., James V. Gardiner, Waljit S. Dhillon, Aysha S. Kent, Nicholas E. White, Zoe Webster, Mohammad A. Ghatei, and Stephen R. Bloom. 2005. “Post-Embryonic Ablation of AgRP Neurons in Mice Leads to a Lean, Hypophagic Phenotype.” *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (12): 1680–82. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3434fje>.
- Bhavsar, S., J. Watkins, and A. Young. 1998. “Synergy between Amylin and Cholecystokinin for Inhibition of Food Intake in Mice.” *Physiology & Behavior* 64 (4): 557–61. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(98\)00110-3](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(98)00110-3).
- Bi, S., E. E. Ladenheim, G. J. Schwartz, and T. H. Moran. 2001. “A Role for NPY Overexpression in the Dorsomedial Hypothalamus in Hyperphagia and Obesity of OLETF Rats.” *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 281 (1): R254–260. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.281.1.R254>.

- Bi, Sheng, Yonwook J. Kim, and Fenping Zheng. 2012. "Dorsomedial Hypothalamic NPY and Energy Balance Control." *Neuropeptides* 46 (6): 309–14. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2012.09.002>.
- Bi, Sheng, Benjamin M. Robinson, and Timothy H. Moran. 2003. "Acute Food Deprivation and Chronic Food Restriction Differentially Affect Hypothalamic NPY mRNA Expression." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 285 (5): R1030-1036. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00734.2002>.
- Bingham, Nathan C., Kimberly K. Anderson, Anne L. Reuter, Nancy R. Stallings, and Keith L. Parker. 2008. "Selective Loss of Leptin Receptors in the Ventromedial Hypothalamic Nucleus Results in Increased Adiposity and a Metabolic Syndrome." *Endocrinology* 149 (5): 2138–48. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1200>.
- Blom, Wendy A. M., Anne Lluch, Annette Stafleu, Sophie Vinoy, Jens J. Holst, Gertjan Schaafsma, and Henk F. J. Hendriks. 2006. "Effect of a High-Protein Breakfast on the Postprandial Ghrelin Response." *The American Journal of Clinical Nutrition* 83 (2): 211–20. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.2.211>.
- Blouet, Clemence, and Gary J. Schwartz. 2012. "Brainstem Nutrient Sensing in the Nucleus of the Solitary Tract Inhibits Feeding." *Cell Metabolism* 16 (5): 579–87. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.10.003>.
- Blüher, Matthias, M. Dodson Michael, Odile D. Peroni, Kohjiro Ueki, Nathan Carter, Barbara B. Kahn, and C. Ronald Kahn. 2002. "Adipose Tissue Selective Insulin Receptor Knockout Protects against Obesity and Obesity-Related Glucose Intolerance." *Developmental Cell* 3 (1): 25–38.
- Blundell, J. E., and J. I. MacDiarmid. 1997. "Fat as a Risk Factor for Overconsumption: Satiety, Satiety, and Patterns of Eating." *Journal of the American Dietetic Association* 97 (7 Suppl): S63-69.
- Blundell, J. E., R. J. Stubbs, C. Golding, F. Croden, R. Alam, S. Whybrow, J. Le Noury, and C. L. Lawton. 2005. "Resistance and Susceptibility to Weight Gain: Individual Variability in Response to a High-Fat Diet." *Physiology & Behavior* 86 (5): 614–22. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.08.052>.
- Bohórquez, Diego V., Rashmi Chandra, Leigh Ann Samsa, Steven R. Vigna, and Rodger A. Liddle. 2011. "Characterization of Basal Pseudopod-like Processes in Ileal and Colonic PYY Cells." *Journal of Molecular Histology* 42 (1): 3–13. <https://doi.org/10.1007/s10735-010-9302-6>.
- Bohórquez, Diego V., Leigh A. Samsa, Andrew Roholt, Satish Medicetty, Rashmi Chandra, and Rodger A. Liddle. 2014. "An Enteroendocrine Cell-Enteric Glia Connection Revealed by 3D Electron Microscopy." *PloS One* 9 (2): e89881. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089881>.
- Boirie, Y., M. Dangin, P. Gachon, M. P. Vasson, J. L. Maubois, and B. Beaufrère. 1997. "Slow and Fast Dietary Proteins Differently Modulate Postprandial Protein Accretion." *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (26): 14930–35.
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14930>.
- “BRAINMAPS.” 2005. 2005. <http://brainmaps.org/>.
- Bray, G. A., and T. F. Gallagher. 1975. “Manifestations of Hypothalamic Obesity in Man: A Comprehensive Investigation of Eight Patients and a Review of the Literature.” *Medicine* 54 (4): 301–30.
- Brennan, Ixchel M., Natalie D. Luscombe-Marsh, Radhika V. Seimon, Bärbel Otto, Michael Horowitz, Judith M. Wishart, and Christine Feinle-Bisset. 2012. “Effects of Fat, Protein, and Carbohydrate and Protein Load on Appetite, Plasma Cholecystokinin, Peptide YY, and Ghrelin, and Energy Intake in Lean and Obese Men.” *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 303 (1): G129–40. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00478.2011>.
- Breton, Jonathan, Pierre Déchelotte, and David Ribet. 2019. “Intestinal Microbiota and Anorexia Nervosa.” *Clinical Nutrition Experimental*, May. <https://doi.org/10.1016/j.yclnex.2019.05.001>.
- Breton, Jonathan, Romain Legrand, Kirsti Akkermann, Anu Järv, Jaanus Harro, Pierre Déchelotte, and Sergueï O. Fetissov. 2016. “Elevated Plasma Concentrations of Bacterial ClpB Protein in Patients with Eating Disorders.” *The International Journal of Eating Disorders* 49 (8): 805–8. <https://doi.org/10.1002/eat.22531>.
- Breton, Jonathan, Naouel Tennoune, Nicolas Lucas, Marie Francois, Romain Legrand, Justine Jacquemot, Alexis Goichon, et al. 2016. “Gut Commensal E. Coli Proteins Activate Host Satiety Pathways Following Nutrient-Induced Bacterial Growth.” *Cell Metabolism* 23 (2): 324–34. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.10.017>.
- Brobeck, J. R. 1946. “Mechanism of the Development of Obesity in Animals with Hypothalamic Lesions.” *Physiological Reviews* 26 (4): 541–59. <https://doi.org/10.1152/physrev.1946.26.4.541>.
- Broberger, Christian, Marc Landry, Helen Wong, John N. Walsh, and Tomas Hökfelt. 1997. “Subtypes Y1 and Y2 of the Neuropeptide Y Receptor Are Respectively Expressed in Pro-Opiomelanocortin- and Neuropeptide-Y-Containing Neurons of the Rat Hypothalamic Arcuate Nucleus.” *Neuroendocrinology* 66 (6): 393–408. <https://doi.org/10.1159/000127265>.
- Brock. 2009. *Biology of Microorganisms*. Pearson Education, 12ème édition.
- Broglio, F., C. Gottero, F. Prodam, C. Gauna, G. Muccioli, M. Papotti, T. Abribat, A. J. Van Der Lely, and E. Ghigo. 2004. “Non-Acylated Ghrelin Counteracts the Metabolic but Not the Neuroendocrine Response to Acylated Ghrelin in Humans.” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89 (6): 3062–65. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031964>.

- Bronstein, David M., Martin K. -H. Schafer, Stanley J. Watson, and Huda Akil. 1992. "Evidence That β -Endorphin Is Synthesized in Cells in the Nucleus Tractus Solitarius: Detection of POMC mRNA." *Brain Research* 587 (2): 269–75. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91007-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91007-2).
- Brüning, J. C., D. Gautam, D. J. Burks, J. Gillette, M. Schubert, P. C. Orban, R. Klein, W. Krone, D. Müller-Wieland, and C. R. Kahn. 2000. "Role of Brain Insulin Receptor in Control of Body Weight and Reproduction." *Science (New York, N.Y.)* 289 (5487): 2122–25. <https://doi.org/10.1126/science.289.5487.2122>.
- Burns, A. A., M. B. E. Livingstone, R. W. Welch, A. Dunne, and I. R. Rowland. 2002. "Dose-Response Effects of a Novel Fat Emulsion (Olibra) on Energy and Macronutrient Intakes up to 36 h Post-Consumption." *European Journal of Clinical Nutrition* 56 (4): 368–77. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601326>.
- Campfield, L. A., F. J. Smith, Y. Guisez, R. Devos, and P. Burn. 1995. "Recombinant Mouse OB Protein: Evidence for a Peripheral Signal Linking Adiposity and Central Neural Networks." *Science (New York, N.Y.)* 269 (5223): 546–49. <https://doi.org/10.1126/science.7624778>.
- Cani, Patrice D., Jens J. Holst, Daniel J. Drucker, Nathalie M. Delzenne, Bernard Thorens, Rémy Burcelin, and Claude Knauf. 2007. "GLUT2 and the Incretin Receptors Are Involved in Glucose-Induced Incretin Secretion." *Molecular and Cellular Endocrinology* 276 (1): 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.06.003>.
- Caro, J. F., J. W. Kolaczynski, M. R. Nyce, J. P. Ohannessian, I. Opentanova, W. H. Goldman, R. B. Lynn, P. L. Zhang, M. K. Sinha, and R. V. Considine. 1996. "Decreased Cerebrospinal-Fluid/Serum Leptin Ratio in Obesity: A Possible Mechanism for Leptin Resistance." *Lancet (London, England)* 348 (9021): 159–61. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(96\)03173-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)03173-x).
- Carreiro, Alicia L, Jaapna Dhillon, Susannah Gordon, Ashley G Jacobs, Kelly A Higgins, Breanna M McArthur, Benjamin W Redan, Rebecca L Rivera, Leigh R Schmidt, and Richard D Mattes. 2016. "The Macronutrients, Appetite and Energy Intake." *Annual Review of Nutrition* 36 (July): 73–103. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-121415-112624>.
- Castaner, Olga, Albert Goday, Yong-Moon Park, Seung-Hwan Lee, Faidon Magkos, Sue-Anne Toh Ee Shiow, and Helmut Schröder. 2018. "The Gut Microbiome Profile in Obesity: A Systematic Review." *International Journal of Endocrinology* 2018 (March). <https://doi.org/10.1155/2018/4095789>.
- Charlton, Karen E., Linda C. Tapsell, Marijka J. Batterham, Rebecca Thorne, Jane O'Shea, Qingsheng Zhang, and Eleanor J. Beck. 2011. "Pork, Beef and Chicken Have Similar Effects on Acute Satiety and Hormonal Markers of Appetite." *Appetite* 56 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2010.10.013>.

- Chelikani, Prasanth K., Alvin C. Haver, and Roger D. Reidelberger. 2004. "Comparison of the Inhibitory Effects of PYY(3-36) and PYY(1-36) on Gastric Emptying in Rats." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 287 (5): R1064-1070. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00376.2004>.
- Chen, A. S., D. J. Marsh, M. E. Trumbauer, E. G. Frazier, X. M. Guan, H. Yu, C. I. Rosenblum, et al. 2000. "Inactivation of the Mouse Melanocortin-3 Receptor Results in Increased Fat Mass and Reduced Lean Body Mass." *Nature Genetics* 26 (1): 97–102. <https://doi.org/10.1038/79254>.
- Chen, H., O. Charlat, L. A. Tartaglia, E. A. Woolf, X. Weng, S. J. Ellis, N. D. Lakey, et al. 1996. "Evidence That the Diabetes Gene Encodes the Leptin Receptor: Identification of a Mutation in the Leptin Receptor Gene in Db/Db Mice." *Cell* 84 (3): 491–95. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81294-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81294-5).
- Cheng, Jing, Airi M. Palva, Willem M. de Vos, and Reetta Satokari. 2013. "Contribution of the Intestinal Microbiota to Human Health: From Birth to 100 Years of Age." *Current Topics in Microbiology and Immunology* 358: 323–46. https://doi.org/10.1007/82_2011_189.
- Choi, Sungwon, Mike Lee, Amy L. Shiu, Sek Jin Yo, Gunnel Halldén, and Gregory W. Aponte. 2007. "GPR93 Activation by Protein Hydrolysate Induces CCK Transcription and Secretion in STC-1 Cells." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 292 (5): G1366-1375. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00516.2006>.
- Chooi, Yu Chung, Cherlyn Ding, and Faidon Magkos. 2019. "The Epidemiology of Obesity." *Metabolism: Clinical and Experimental* 92 (March): 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.09.005>.
- Chronwall, B. M., D. A. DiMaggio, V. J. Massari, V. M. Pickel, D. A. Ruggiero, and T. L. O'Donohue. 1985. "The Anatomy of Neuropeptide-Y-Containing Neurons in Rat Brain." *Neuroscience* 15 (4): 1159–81.
- Chung, Jason, Anh-Khoi Nguyen, Darren C. Henstridge, Anna G. Holmes, M. H. Stanley Chan, Jose L. Mesa, Graeme I. Lancaster, et al. 2008. "HSP72 Protects against Obesity-Induced Insulin Resistance." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (5): 1739–44. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705799105>.
- Clark, John T., Pushpa S. Kalra, William R. Crowley, and Satya P. Kalra. 1984. "NEUROPEPTIDE Y AND HUMAN PANCREATIC POLYPEPTIDE STIMULATE FEEDING BEHAVIOR IN RATS." *Endocrinology* 115 (1): 427–29. <https://doi.org/10.1210/endo-115-1-427>.
- Cohen, Mark A., Sandra M. Ellis, Carel W. Le Roux, Rachel L. Batterham, Adrian Park, Michael Patterson, Gary S. Frost, Mohammad A. Ghatei, and Stephen R. Bloom. 2003. "Oxyntomodulin Suppresses Appetite and Reduces Food Intake in Humans." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88 (10): 4696–4701. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030421>.

- Coleman, D. L. 1973. "Effects of Parabiosis of Obese with Diabetes and Normal Mice." *Diabetologia* 9 (4): 294–98.
- Coll, Anthony P. 2007. "Effects of Pro-Opiomelanocortin (POMC) on Food Intake and Body Weight: Mechanisms and Therapeutic Potential?" *Clinical Science* 113 (4): 171–82. <https://doi.org/10.1042/CS20070105>.
- Cone, R. D., M. A. Cowley, A. A. Butler, W. Fan, D. L. Marks, and M. J. Low. 2001. "The Arcuate Nucleus as a Conduit for Diverse Signals Relevant to Energy Homeostasis." *International Journal of Obesity* 25 (5): S63. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801913>.
- Cone, Roger D. 2006. "Studies on the Physiological Functions of the Melanocortin System." *Endocrine Reviews* 27 (7): 736–49. <https://doi.org/10.1210/er.2006-0034>.
- Conlon, Michael A., and Anthony R. Bird. 2014. "The Impact of Diet and Lifestyle on Gut Microbiota and Human Health." *Nutrients* 7 (1): 17–44. <https://doi.org/10.3390/nu7010017>.
- Conner, Sean D., and Sandra L. Schmid. 2003. "Regulated Portals of Entry into the Cell." *Nature* 422 (6927): 37–44. <https://doi.org/10.1038/nature01451>.
- Coquerel, Quentin, Maria Hamze Sinno, Nabile Boukhattala, Moïse Coëffier, Mutsumi Terashi, Christine Bole-Feysot, Denis Breuillé, Pierre Déchelotte, and Sergueï O. Fetissov. 2012. "Intestinal Inflammation Influences α -MSH Reactive Autoantibodies: Relevance to Food Intake and Body Weight." *Psychoneuroendocrinology* 37 (1): 94–106. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.05.008>.
- Corp, E. S., J. McQuade, T. H. Moran, and G. P. Smith. 1993. "Characterization of Type A and Type B CCK Receptor Binding Sites in Rat Vagus Nerve." *Brain Research* 623 (1): 161–66. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90024-h](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90024-h).
- Corp, E. S., S. C. Woods, D. Porte, D. M. Dorsa, D. P. Figlewicz, and D. G. Baskin. 1986. "Localization of 125I-Insulin Binding Sites in the Rat Hypothalamus by Quantitative Autoradiography." *Neuroscience Letters* 70 (1): 17–22. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(86\)90430-1](https://doi.org/10.1016/0304-3940(86)90430-1).
- Cotero, Victoria E., and Vanessa H. Routh. 2009. "Insulin Blunts the Response of Glucose-Excited Neurons in the Ventrolateral-Ventromedial Hypothalamic Nucleus to Decreased Glucose." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 296 (5): E1101-1109. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90932.2008>.
- Cowley, M. A., J. L. Smart, M. Rubinstein, M. G. Cerdán, S. Diano, T. L. Horvath, R. D. Cone, and M. J. Low. 2001. "Leptin Activates Anorexigenic POMC Neurons through a Neural Network in the Arcuate Nucleus." *Nature* 411 (6836): 480–84. <https://doi.org/10.1038/35078085>.
- Cummings, D. E., J. Q. Purnell, R. S. Frayo, K. Schmidova, B. E. Wisse, and D. S. Weigle. 2001. "A Preprandial Rise in Plasma Ghrelin Levels Suggests a Role in Meal Initiation in Humans." *Diabetes* 50 (8): 1714–19. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.8.1714>.

- Cummings, David E., and Joost Overduin. 2007. "Gastrointestinal Regulation of Food Intake." *The Journal of Clinical Investigation* 117 (1): 13–23. <https://doi.org/10.1172/JCI30227>.
- Dakin, C. L., I. Gunn, C. J. Small, C. M. B. Edwards, D. L. Hay, D. M. Smith, M. A. Ghatei, and S. R. Bloom. 2001. "Oxyntomodulin Inhibits Food Intake in the Rat." *Endocrinology* 142 (10): 4244–50. <https://doi.org/10.1210/endo.142.10.8430>.
- Dakin, Catherine L., Caroline J. Small, Rachel L. Batterham, Nicola M. Neary, Mark A. Cohen, Michael Patterson, Mohammad A. Ghatei, and Stephen R. Bloom. 2004. "Peripheral Oxyntomodulin Reduces Food Intake and Body Weight Gain in Rats." *Endocrinology* 145 (6): 2687–95. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1338>.
- Daly, Kristian, Miran Al-Rammahi, Andrew Moran, Marco Marcello, Yuzo Ninomiya, and Soraya P. Shirazi-Beechey. 2013. "Sensing of Amino Acids by the Gut-Expressed Taste Receptor T1R1-T1R3 Stimulates CCK Secretion." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 304 (3): G271-282. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00074.2012>.
- Darzi, Julia, Gary S. Frost, and M. Denise Robertson. 2011. "Do SCFA Have a Role in Appetite Regulation?" *The Proceedings of the Nutrition Society* 70 (1): 119–28. <https://doi.org/10.1017/S0029665110004039>.
- Date, Y., M. Kojima, H. Hosoda, A. Sawaguchi, M. S. Mondal, T. Suganuma, S. Matsukura, K. Kangawa, and M. Nakazato. 2000. "Ghrelin, a Novel Growth Hormone-Releasing Acylated Peptide, Is Synthesized in a Distinct Endocrine Cell Type in the Gastrointestinal Tracts of Rats and Humans." *Endocrinology* 141 (11): 4255–61. <https://doi.org/10.1210/endo.141.11.7757>.
- Davenport, Anthony P., Tom I. Bonner, Steven M. Foord, Anthony J. Harmar, Richard R. Neubig, Jean-Philippe Pin, Michael Spedding, Masayasu Kojima, and Keniji Kangawa. 2005. "International Union of Pharmacology. LVI. Ghrelin Receptor Nomenclature, Distribution, and Function." *Pharmacological Reviews* 57 (4): 541–46. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.1>.
- David, Lawrence A., Corinne F. Maurice, Rachel N. Carmody, David B. Gootenberg, Julie E. Button, Benjamin E. Wolfe, Alisha V. Ling, et al. 2014. "Diet Rapidly and Reproducibly Alters the Human Gut Microbiome." *Nature* 505 (7484): 559–63. <https://doi.org/10.1038/nature12820>.
- Desiraju, T., M. G. Banerjee, and B. K. Anand. 1968. "Activity of Single Neurons in the Hypothalamic Feeding Centers: Effect of 2-Deoxy-d-Glucose." *Physiology & Behavior* 3 (5): 757–60. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(68\)90148-0](https://doi.org/10.1016/0031-9384(68)90148-0).
- Dhillon, Harveen, Jeffrey M. Zigman, Chianping Ye, Charlotte E. Lee, Robert A. McGovern, Vinsee Tang, Christopher D. Kenny, et al. 2006. "Leptin Directly Activates SF1 Neurons in the VMH, and This Action by Leptin Is Required for Normal Body-Weight Homeostasis." *Neuron* 49 (2): 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.12.021>.

- Diakogiannaki, Eleftheria, Ramona Pais, Gwen Tolhurst, Helen E. Parker, James Horscroft, Beate Rauscher, Tamara Zietek, Hannelore Daniel, Fiona M. Gribble, and Frank Reimann. 2013. "Oligopeptides Stimulate Glucagon-like Peptide-1 Secretion in Mice through Proton-Coupled Uptake and the Calcium-Sensing Receptor." *Diabetologia* 56 (12): 2688–96. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-3037-3>.
- Diepvens, K., D. Häberer, and M. Westerterp-Plantenga. 2008. "Different Proteins and Biopeptides Differently Affect Satiety and Anorexigenic/Orexigenic Hormones in Healthy Humans." *International Journal of Obesity (2005)* 32 (3): 510–18. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803758>.
- Dotson, Cedrick D., Maartje C. P. Geraedts, and Steven D. Munger. 2013. "Peptide Regulators of Peripheral Taste Function." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 24 (3): 232–39. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2013.01.004>.
- Douglass, J., A. A. McKinzie, and P. Couceyro. 1995. "PCR Differential Display Identifies a Rat Brain mRNA That Is Transcriptionally Regulated by Cocaine and Amphetamine." *Journal of Neuroscience* 15 (3): 2471–81. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-03-02471.1995>.
- Doyle, Shannon M., Shankar Shastry, Andrea N. Kravats, Yu-Hsuan Shih, Marika Miot, Joel R. Hoskins, George Stan, and Sue Wickner. 2015. "Interplay between E. Coli DnaK, ClpB and GrpE during Protein Disaggregation." *Journal of Molecular Biology* 427 (2): 312–27. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.10.013>.
- Dryden, S., L. Pickavance, H. M. Frankish, and G. Williams. 1995. "Increased Neuropeptide Y Secretion in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus of Obese (Fa/Fa) Zucker Rats." *Brain Research* 690 (2): 185–88. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00628-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00628-4).
- DSM–5. 2013. 5ème édition. American Psychiatric Association. Elsevier Masson.
- Dubrasquet, M., D. Bataille, and C. Gespach. 1982. "Oxyntomodulin (Glucagon-37 or Bioactive Enteroglucagon): A Potent Inhibitor of Pentagastrin-Stimulated Acid Secretion in Rats." *Bioscience Reports* 2 (6): 391–95.
- Ducornet, B., G. Abiven, and M. -L. Raffin-Sanson. 2005. "Contrôle Hypothalamique Des Sécrétions Hormonales Antéhypophysaires." *EMC - Endocrinologie* 2 (4): 209–30. <https://doi.org/10.1016/j.emcend.2005.08.001>.
- Due, A., S. Toubro, A. R. Skov, and A. Astrup. 2004. "Effect of Normal-Fat Diets, Either Medium or High in Protein, on Body Weight in Overweight Subjects: A Randomised 1-Year Trial." *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 28 (10): 1283–90. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802767>.
- Duhault, J., M. Boulanger, S. Chamorro, J. A. Boutin, O. Della Zuana, E. Douillet, J. L. Fauchère, et al. 2000. "Food Intake Regulation in Rodents: Y5 or Y1 NPY Receptors or Both?" *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 78 (2): 173–85.

- Dumont, Y., A. Fournier, S. St-Pierre, and R. Quirion. 1995. "Characterization of Neuropeptide Y Binding Sites in Rat Brain Membrane Preparations Using [125I][Leu31,Pro34]Peptide YY and [125I]Peptide YY3-36 as Selective Y1 and Y2 Radioligands." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 272 (2): 673–80.
- Durie, Clarissa L., Elizabeth C. Duran, and Aaron L. Lucius. 2018. "Escherichia Coli DnaK Allosterically Modulates ClpB between High- and Low-Peptide Affinity States." *Biochemistry* 57 (26): 3665–75. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00045>.
- Dziedzic, B., J. Szemraj, J. Bartkowiak, and A. Walczewska. 2007. "Various Dietary Fats Differentially Change the Gene Expression of Neuropeptides Involved in Body Weight Regulation in Rats." *Journal of Neuroendocrinology* 19 (5): 364–73. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2007.01541.x>.
- Eberlein, G. A., V. E. Eysselein, M. Schaeffer, P. Layer, D. Grandt, H. Goebell, W. Niebel, M. Davis, T. D. Lee, and J. E. Shively. 1989. "A New Molecular Form of PYY: Structural Characterization of Human PYY(3-36) and PYY(1-36)." *Peptides* 10 (4): 797–803.
- Ehrenfried, J. A., J. Chen, J. Li, and B. M. Evers. 1995. "Glutamine-Mediated Regulation of Heat Shock Protein Expression in Intestinal Cells." *Surgery* 118 (2): 352–56; discussion 356-357.
- Engelstoft, Maja S., Kristoffer L. Egerod, Birgitte Holst, and Thue W. Schwartz. 2008. "A Gut Feeling for Obesity: 7TM Sensors on Enteroendocrine Cells." *Cell Metabolism* 8 (6): 447–49. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.11.004>.
- Engelstoft, Maja S., Won-mee Park, Ichiro Sakata, Line V. Kristensen, Anna Sofie Husted, Sherri Osborne-Lawrence, Paul K. Piper, et al. 2013. "Seven Transmembrane G Protein-Coupled Receptor Repertoire of Gastric Ghrelin Cells." *Molecular Metabolism* 2 (4): 376–92. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2013.08.006>.
- English, P. J., M. A. Ghatei, I. A. Malik, S. R. Bloom, and J. P. H. Wilding. 2002. "Food Fails to Suppress Ghrelin Levels in Obese Humans." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87 (6): 2984. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.6.8738>.
- Erickson, J. C., K. E. Clegg, and R. D. Palmiter. 1996. "Sensitivity to Leptin and Susceptibility to Seizures of Mice Lacking Neuropeptide Y." *Nature* 381 (6581): 415–21. <https://doi.org/10.1038/381415a0>.
- Fan, W., B. A. Boston, R. A. Kesterson, V. J. Hruby, and R. D. Cone. 1997. "Role of Melanocortinergic Neurons in Feeding and the Agouti Obesity Syndrome." *Nature* 385 (6612): 165–68. <https://doi.org/10.1038/385165a0>.
- Farooqi, I. Sadaf, Julia M. Keogh, Giles S. H. Yeo, Emma J. Lank, Tim Cheetham, and Stephen O'Rahilly. 2003. "Clinical Spectrum of Obesity and Mutations in the Melanocortin 4 Receptor Gene." *The New England Journal of Medicine* 348 (12): 1085–95. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa022050>.

- Feltrin, Kate L., Tanya J. Little, James H. Meyer, Michael Horowitz, Andre J. P. M. Smout, Judith Wishart, Amelia N. Pilichiewicz, Thomas Rades, Ian M. Chapman, and Christine Feinle-Bisset. 2004. "Effects of Intraduodenal Fatty Acids on Appetite, Antropyloroduodenal Motility, and Plasma CCK and GLP-1 in Humans Vary with Their Chain Length." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 287 (3): R524-533. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00039.2004>.
- Ferguson, Alastair V., Kevin J. Latchford, and Willis K. Samson. 2008. "The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus A Potential Target for Integrative Treatment of Autonomic Dysfunction." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 12 (6): 717–27. <https://doi.org/10.1517/14728222.12.6.717>.
- Fernandez, G., A. Cabral, M. P. Cornejo, P. N. De Francesco, G. Garcia-Romero, M. Reynaldo, and M. Perello. 2016. "Des-Acyl Ghrelin Directly Targets the Arcuate Nucleus in a Ghrelin-Receptor Independent Manner and Impairs the Orexigenic Effect of Ghrelin." *Journal of Neuroendocrinology* 28 (2): 12349. <https://doi.org/10.1111/jne.12349>.
- Fetissov, Sergueï O., Jarmila Hallman, Lars Oreland, Britt Af Klinteberg, Eva Grenbäck, Anna-Lena Hulting, and Tomas Hökfelt. 2002. "Autoantibodies against Alpha -MSH, ACTH, and LHRH in Anorexia and Bulimia Nervosa Patients." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (26): 17155–60. <https://doi.org/10.1073/pnas.222658699>.
- Fetissov, Sergueï O., Maria Hamze Sinno, Moïse Coëffier, Christine Bole-Feysot, Philippe Ducrotté, Tomas Hökfelt, and Pierre Déchelotte. 2008. "Autoantibodies against Appetite-Regulating Peptide Hormones and Neuropeptides: Putative Modulation by Gut Microflora." *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 24 (4): 348–59. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2007.12.006>.
- Fetissov, Sergueï O., Jaanus Harro, Maiken Jaanisk, Anu Järv, Iris Podar, Jüri Allik, Ida Nilsson, Priya Sakthivel, Ann Kari Lefvert, and Tomas Hökfelt. 2005. "Autoantibodies against Neuropeptides Are Associated with Psychological Traits in Eating Disorders." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (41): 14865–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507204102>.
- Fetissov, Sergueï O., and Tomas Hökfelt. 2019. "On the Origin of Eating Disorders: Altered Signaling between Gut Microbiota, Adaptive Immunity and the Brain Melanocortin System Regulating Feeding Behavior." *Current Opinion in Pharmacology* 48 (August): 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2019.07.004>.
- Fetissov, Sergueï O., Nicolas Lucas, and Romain Legrand. 2017. "Ghrelin-Reactive Immunoglobulins in Conditions of Altered Appetite and Energy Balance." *Frontiers in Endocrinology* 8: 10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00010>.

- Flynn, G. C., J. Pohl, M. T. Flocco, and J. E. Rothman. 1991. "Peptide-Binding Specificity of the Molecular Chaperone BiP." *Nature* 353 (6346): 726–30. <https://doi.org/10.1038/353726a0>.
- French, S. J., C. A. Conlon, S. T. Mutuma, M. Arnold, N. W. Read, G. Meijer, and J. Francis. 2000. "The Effects of Intestinal Infusion of Long-Chain Fatty Acids on Food Intake in Humans." *Gastroenterology* 119 (4): 943–48.
- Fujimoto, S., A. Inui, N. Kiyota, W. Seki, K. Koide, S. Takamiya, M. Uemoto, Y. Nakajima, S. Baba, and M. Kasuga. 1997. "Increased Cholecystokinin and Pancreatic Polypeptide Responses to a Fat-Rich Meal in Patients with Restrictive but Not Bulimic Anorexia Nervosa." *Biological Psychiatry* 41 (10): 1068–70. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(97\)00044-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(97)00044-9).
- Fukui, Hiroshi. 2016. "Increased Intestinal Permeability and Decreased Barrier Function: Does It Really Influence the Risk of Inflammation?" *Inflammatory Intestinal Diseases* 1 (3): 135–45. <https://doi.org/10.1159/000447252>.
- Galmiche, Marie, Pierre Déchelotte, Grégory Lambert, and Marie Pierre Tavolacci. 2019. "Prevalence of Eating Disorders over the 2000-2018 Period: A Systematic Literature Review." *The American Journal of Clinical Nutrition* 109 (5): 1402–13. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy342>.
- Gardner, M. L. 1988. "Gastrointestinal Absorption of Intact Proteins." *Annual Review of Nutrition* 8: 329–50. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.08.070188.001553>.
- Garcia, Frederico Duarte, Sébastien Grigioni, Samir Chelali, Gilles Meyrignac, Florence Thibaut, and Pierre Dechelotte. 2010. "Validation of the French Version of SCOFF Questionnaire for Screening of Eating Disorders among Adults." *The World Journal of Biological Psychiatry: The Official Journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry* 11 (7): 888–93. <https://doi.org/10.3109/15622975.2010.483251>.
- Garner, David M. 2004. "EDI 3 (Eating Disorder Inventory-3)," Psychological Assessment Resources, .
- Garner, David M., Marion P. Olmstead, and Janet Polivy. 1983. "Development and Validation of a Multidimensional Eating Disorder Inventory for Anorexia Nervosa and Bulimia." *International Journal of Eating Disorders* 2 (2): 15–34. [https://doi.org/10.1002/1098-108X\(198321\)2:2<15::AID-EAT2260020203>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1098-108X(198321)2:2<15::AID-EAT2260020203>3.0.CO;2-6).
- Gauna, Carlotta, Bedette van de Zande, Anke Kerkwijk, Axel Themmen, Aart-Jan van der Lely, and Patric Delhanty. 2007. "Unacylated Ghrelin Is Not a Functional Antagonist but a Full Agonist of the Type 1a Growth Hormone Secretagogue Receptor (GHS-R)." *Molecular and Cellular Endocrinology* 274 (1–2): 30–34. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.05.010>.
- Gedulin, B. R., T. J. Rink, and A. A. Young. 1997. "Dose-Response for Glucagonostatic Effect of Amylin in Rats." *Metabolism: Clinical and Experimental* 46 (1): 67–70. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(97\)90170-0](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(97)90170-0).

- Ghatei, M. A., L. O. Uttenthal, N. D. Christofides, M. G. Bryant, and S. R. Bloom. 1983. "Molecular Forms of Human Enteroglucagon in Tissue and Plasma: Plasma Responses to Nutrient Stimuli in Health and in Disorders of the Upper Gastrointestinal Tract." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 57 (3): 488–95. <https://doi.org/10.1210/jcem-57-3-488>.
- Gibbs, J., R. C. Young, and G. P. Smith. 1973. "Cholecystokinin Decreases Food Intake in Rats." *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 84 (3): 488–95.
- Glaser, B., G. Zoghlin, K. Pienta, and A. I. Vinik. 1988. "Pancreatic Polypeptide Response to Secretin in Obesity: Effects of Glucose Intolerance." *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme* 20 (5): 288–92. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1010817>.
- Glenny, Elaine M., Emily C. Bulik-Sullivan, Quyen Tang, Cynthia M. Bulik, and Ian M. Carroll. 2017. "Eating Disorders and the Intestinal Microbiota: Mechanisms of Energy Homeostasis and Behavioral Influence." *Current Psychiatry Reports* 19 (8): 51. <https://doi.org/10.1007/s11920-017-0797-3>.
- Goebel-Stengel, Miriam, Andreas Stengel, Lixin Wang, Gordon Ohning, Yvette Taché, and Joseph R. Reeve. 2012. "CCK-8 and CCK-58 Differ in Their Effects on Nocturnal Solid Meal Pattern in Undisturbed Rats." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 303 (8): R850-860. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00365.2011>.
- Goloubinoff, P., A. Mogk, A. P. Zvi, T. Tomoyasu, and B. Bukau. 1999. "Sequential Mechanism of Solubilization and Refolding of Stable Protein Aggregates by a Bichaperone Network." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (24): 13732–37. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13732>.
- Gomori, Akira, Akane Ishihara, Masahiko Ito, Satoshi Mashiko, Hiroko Matsushita, Mariko Yumoto, Makoto Ito, et al. 2003. "Chronic Intracerebroventricular Infusion of MCH Causes Obesity in Mice. Melanin-Concentrating Hormone." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 284 (3): E583-588. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00350.2002>.
- Guillaume, S., P. Gorwood, F. Jollant, F. Van den Eynde, P. Courtet, and S. Richard-Devantoy. 2015. "Impaired Decision-Making in Symptomatic Anorexia and Bulimia Nervosa Patients: A Meta-Analysis." *Psychological Medicine* 45 (16): 3377–91. <https://doi.org/10.1017/S003329171500152X>.
- Graham, M., J. R. Shutter, U. Sarmiento, I. Sarosi, and K. L. Stark. 1997. "Overexpression of Agprt Leads to Obesity in Transgenic Mice." *Nature Genetics* 17 (3): 273–74. <https://doi.org/10.1038/ng1197-273>.

- Grandt, D., M. Schimiczek, C. Beglinger, P. Layer, H. Goebell, V. E. Eysselein, and J. R. Reeve. 1994. "Two Molecular Forms of Peptide YY (PYY) Are Abundant in Human Blood: Characterization of a Radioimmunoassay Recognizing PYY 1-36 and PYY 3-36." *Regulatory Peptides* 51 (2): 151–59.
- Grandt, D., S. Teyssen, M. Schimiczek, J. R. Reeve, F. Feth, W. Rascher, H. Hirche, M. V. Singer, P. Layer, and H. Goebell. 1992. "Novel Generation of Hormone Receptor Specificity by Amino Terminal Processing of Peptide YY." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 186 (3): 1299–1306. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(05\)81547-5](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(05)81547-5).
- Grill, Harvey J., and Matthew R. Hayes. 2012. "Hindbrain Neurons as an Essential Hub in the Neuroanatomically Distributed Control of Energy Balance." *Cell Metabolism* 16 (3): 296–309. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.06.015>.
- Gropp, Eva, Marya Shanabrough, Erzsebet Borok, Allison W. Xu, Ruth Janoschek, Thorsten Buch, Leona Plum, et al. 2005. "Agouti-Related Peptide-Expressing Neurons Are Mandatory for Feeding." *Nature Neuroscience* 8 (10): 1289–91. <https://doi.org/10.1038/nn1548>.
- Gutierrez, Jesus A., Patricia J. Solenberg, Douglas R. Perkins, Jill A. Willency, Michael D. Knierman, Zhaoyan Jin, Derrick R. Witcher, Shuang Luo, Jude E. Onyia, and John E. Hale. 2008. "Ghrelin Octanoylation Mediated by an Orphan Lipid Transferase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (17): 6320–25. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800708105>.
- Håkansson, Marie-Louise, Hilary Brown, Nico Ghilardi, Radek C. Skoda, and Björn Meister. 1998. "Leptin Receptor Immunoreactivity in Chemically Defined Target Neurons of the Hypothalamus." *Journal of Neuroscience* 18 (1): 559–72. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-01-00559.1998>.
- Halaas, Jeffrey L., Carol Boozer, John Blair-West, Naseem Fidahusein, Derek A. Denton, and Jeffrey M. Friedman. 1997. "Physiological Response to Long-Term Peripheral and Central Leptin Infusion in Lean and Obese Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (16): 8878–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.16.8878>.
- Hall, W. L., D. J. Millward, S. J. Long, and L. M. Morgan. 2003. "Casein and Whey Exert Different Effects on Plasma Amino Acid Profiles, Gastrointestinal Hormone Secretion and Appetite." *The British Journal of Nutrition* 89 (2): 239–48. <https://doi.org/10.1079/BJN2002760>.
- Halton, Thomas L., and Frank B. Hu. 2004. "The Effects of High Protein Diets on Thermogenesis, Satiety and Weight Loss: A Critical Review." *Journal of the American College of Nutrition* 23 (5): 373–85.
- Hambly, Catherine, and John R. Speakman. 2005. "Contribution of Different Mechanisms to Compensation for Energy Restriction in the Mouse." *Obesity Research* 13 (9): 1548–57. <https://doi.org/10.1038/oby.2005.190>.

- Han, Wanjiang, and Philipp Christen. 2003. "Mechanism of the Targeting Action of DnaJ in the DnaK Molecular Chaperone System." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (21): 19038–43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300756200>.
- Harada, Toshiro, Toshihiro Nakahara, Daisuke Yasuhara, Shinya Kojima, Ken-ichiro Sagiyama, Haruka Amitani, Alessandro Laviano, Tetsuro Naruo, and Akio Inui. 2008. "Obestatin, Acyl Ghrelin, and Des-Acyl Ghrelin Responses to an Oral Glucose Tolerance Test in the Restricting Type of Anorexia Nervosa." *Biological Psychiatry* 63 (2): 245–47. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.04.005>.
- Hariri, Niloofar, and Louise Thibault. 2010. "High-Fat Diet-Induced Obesity in Animal Models." *Nutrition Research Reviews* 23 (2): 270–99. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000168>.
- Harper, A. A., and H. S. Raper. 1943. "Pancreozymin, a Stimulant of the Secretion of Pancreatic Enzymes in Extracts of the Small Intestine." *The Journal of Physiology* 102 (1): 115–25. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1943.sp004021>.
- Harrold, Joanne A., Terry M. Dovey, John E. Blundell, and Jason C. G. Halford. 2012. "CNS Regulation of Appetite." *Neuropharmacology* 63 (1): 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.01.007>.
- Hauge, Maria, Jeppe Pio Ekberg, Maja Storm Engelstoft, Pascal Timshel, Andreas N. Madsen, and Thue W. Schwartz. 2017. "Gq and Gs Signaling Acting in Synergy to Control GLP-1 Secretion." *Molecular and Cellular Endocrinology*, Pleiotropic GPCR signaling in health and disease, 449 (July): 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.11.024>.
- Hayes, Christina L., Jasmine Dong, Heather J. Galipeau, Jennifer Jury, Justin McCarville, Xianxi Huang, Xuan-Yu Wang, et al. 2018. "Commensal Microbiota Induces Colonic Barrier Structure and Functions That Contribute to Homeostasis." *Scientific Reports* 8 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32366-6>.
- Heath, R. B., R. Jones, K. N. Frayn, and M. D. Robertson. 2004. "Vagal Stimulation Exaggerates the Inhibitory Ghrelin Response to Oral Fat in Humans." *The Journal of Endocrinology* 180 (2): 273–81. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1800273>.
- Heisler, Lora K., Michael A. Cowley, Laurence H. Tecott, Wei Fan, Malcolm J. Low, James L. Smart, Marcelo Rubinstein, et al. 2002. "Activation of Central Melanocortin Pathways by Fenfluramine." *Science (New York, N.Y.)* 297 (5581): 609–11. <https://doi.org/10.1126/science.1072327>.
- Hensen, Sanne M. M., Lonke Heldens, Chrissy M. W. van Enkevort, Siebe T. van Genesen, Ger J. M. Pruijn, and Nicolette H. Lubsen. 2012. "Heat Shock Factor 1 Is Inactivated by Amino Acid Deprivation." *Cell Stress & Chaperones* 17 (6): 743–55. <https://doi.org/10.1007/s12192-012-0347-1>.

- Henstridge, Darren C., Martin Whitham, and Mark A. Febbraio. 2014. "Chaperoning to the Metabolic Party: The Emerging Therapeutic Role of Heat-Shock Proteins in Obesity and Type 2 Diabetes." *Molecular Metabolism* 3 (8): 781–93. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.08.003>.
- Hervey, G. R. 1959. "The Effects of Lesions in the Hypothalamus in Parabiotic Rats." *The Journal of Physiology* 145 (2): 336-352.3.
- Hetherington, A. W., and S. W. Ranson. 1940. "Hypothalamic Lesions and Adiposity in the Rat." *The Anatomical Record* 78 (2): 149–72. <https://doi.org/10.1002/ar.1090780203>.
- . 1942. "The Relation of Various Hypothalamic Lesions to Adiposity in the Rat." *Journal of Comparative Neurology* 76 (3): 475–99. <https://doi.org/10.1002/cne.900760308>.
- Hill, James O., Holly R. Wyatt, and John C. Peters. 2012. "Energy Balance and Obesity." *Circulation* 126 (1): 126–32. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.087213>.
- Hirasawa, Akira, Keiko Tsumaya, Takeo Awaji, Susumu Katsuma, Tetsuya Adachi, Masateru Yamada, Yukihiro Sugimoto, Shunichi Miyazaki, and Gozoh Tsujimoto. 2005. "Free Fatty Acids Regulate Gut Incretin Glucagon-like Peptide-1 Secretion through GPR120." *Nature Medicine* 11 (1): 90–94. <https://doi.org/10.1038/nm1168>.
- Hogan, Kristine, Stephan Peluso, Sandy Gould, Ian Parsons, Dominic Ryan, Lijun Wu, and Irache Visiers. 2006. "Mapping the Binding Site of Melanocortin 4 Receptor Agonists: A Hydrophobic Pocket Formed by I3.28(125), I3.32(129), and I7.42(291) Is Critical for Receptor Activation." *Journal of Medicinal Chemistry* 49 (3): 911–22. <https://doi.org/10.1021/jm050780s>.
- Holt, S. H., J. C. Miller, P. Petocz, and E. Farmakalidis. 1995. "A Satiety Index of Common Foods." *European Journal of Clinical Nutrition* 49 (9): 675–90.
- Hu, Y., B. T. Bloomquist, L. J. Cornfield, L. B. DeCarr, J. R. Flores-Riveros, L. Friedman, P. Jiang, et al. 1996. "Identification of a Novel Hypothalamic Neuropeptide Y Receptor Associated with Feeding Behavior." *The Journal of Biological Chemistry* 271 (42): 26315–19.
- Hudson, James I., Eva Hiripi, Harrison G. Pope, and Ronald C. Kessler. 2007. "The Prevalence and Correlates of Eating Disorders in the National Comorbidity Survey Replication." *Biological Psychiatry* 61 (3): 348–58. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.03.040>.
- Huszar, D., C. A. Lynch, V. Fairchild-Huntress, J. H. Dunmore, Q. Fang, L. R. Berkemeier, W. Gu, et al. 1997. "Targeted Disruption of the Melanocortin-4 Receptor Results in Obesity in Mice." *Cell* 88 (1): 131–41.
- Inhoff, Tobias, Hubert Mönnikes, Steffen Noetzel, Andreas Stengel, Miriam Goebel, Q. Thai Dinh, Andrea Riedl, et al. 2008. "Desacyl Ghrelin Inhibits the Orexigenic Effect of Peripherally Injected Ghrelin in Rats." *Peptides* 29 (12): 2159–68. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.09.014>.

- Inui, A., M. Okita, M. Nakajima, K. Momose, N. Ueno, A. Teranishi, M. Miura, et al. 1998. "Anxiety-like Behavior in Transgenic Mice with Brain Expression of Neuropeptide Y." *Proceedings of the Association of American Physicians* 110 (3): 171–82.
- Irani, Boman G., Christelle Le Foll, Ambrose Dunn-Meynell, and Barry E. Levin. 2008. "Effects of Leptin on Rat Ventromedial Hypothalamic Neurons." *Endocrinology* 149 (10): 5146–54. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0357>.
- Ivy, A. C., and Eric Oldberg. 1928. "A Hormone Mechanism for Gall-Bladder Contraction and Evacuation." *American Journal of Physiology-Legacy Content* 86 (3): 599–613. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1928.86.3.599>.
- Jang, M., and D. R. Romsos. 1998. "Neuropeptide Y and Corticotropin-Releasing Hormone Concentrations within Specific Hypothalamic Regions of Lean but Not Ob/Ob Mice Respond to Food-Deprivation and Refeeding." *The Journal of Nutrition* 128 (12): 2520–25. <https://doi.org/10.1093/jn/128.12.2520>.
- Jésus, Pierre, Wassila Ouelaa, Marie François, Lina Riachy, Charlène Guérin, Moutaz Aziz, Jean-Claude Do Rego, Pierre Déchelotte, Sergueï O. Fetissof, and Moïse Coëffier. 2014. "Alteration of Intestinal Barrier Function during Activity-Based Anorexia in Mice." *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)* 33 (6): 1046–53. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2013.11.006>.
- Kamegai, J., H. Tamura, T. Shimizu, S. Ishii, H. Sugihara, and I. Wakabayashi. 2001. "Chronic Central Infusion of Ghrelin Increases Hypothalamic Neuropeptide Y and Agouti-Related Protein mRNA Levels and Body Weight in Rats." *Diabetes* 50 (11): 2438–43. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.11.2438>.
- Kask, A., H. B. Schiöth, F. Mutulis, J. E. Wikberg, and L. Rågo. 2000. "Anorexigenic Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript Peptide Intensifies Fear Reactions in Rats." *Brain Research* 857 (1–2): 283–85. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)02383-5](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)02383-5).
- Kelly, T., W. Yang, C.-S. Chen, K. Reynolds, and J. He. 2008. "Global Burden of Obesity in 2005 and Projections to 2030." *International Journal of Obesity (2005)* 32 (9): 1431–37. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.102>.
- Kennedy Gilbert, and Parkes Alan Sterling. 1950. "The Hypothalamic Control of Food Intake in Rats." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences* 137 (889): 535–49. <https://doi.org/10.1098/rspb.1950.0065>.
- Khandekar, Neeta, Britt A. Berning, Amanda Sainsbury, and Shu Lin. 2015. "The Role of Pancreatic Polypeptide in the Regulation of Energy Homeostasis." *Molecular and Cellular Endocrinology* 418 Pt 1 (December): 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.06.028>.
- Kieffer, T. J., C. H. McIntosh, and R. A. Pederson. 1995. "Degradation of Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide and Truncated Glucagon-like Peptide 1 in Vitro and in Vivo by

- Dipeptidyl Peptidase IV." *Endocrinology* 136 (8): 3585–96.
<https://doi.org/10.1210/endo.136.8.7628397>.
- Kim, M.S., C.J. Small, S.A. Stanley, D.G.A. Morgan, L.J. Seal, W.M. Kong, C.M.B. Edwards, et al. 2000. "The Central Melanocortin System Affects the Hypothalamo-Pituitary Thyroid Axis and May Mediate the Effect of Leptin." *Journal of Clinical Investigation* 105 (7): 1005–11.
- King, Bruce M. 2006. "The Rise, Fall, and Resurrection of the Ventromedial Hypothalamus in the Regulation of Feeding Behavior and Body Weight." *Physiology & Behavior* 87 (2): 221–44.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.10.007>.
- Kishi, Toshiro, Carl J. Aschkenasi, Charlotte E. Lee, Kathleen G. Mountjoy, Clifford B. Saper, and Joel K. Elmquist. 2003. "Expression of Melanocortin 4 Receptor mRNA in the Central Nervous System of the Rat." *The Journal of Comparative Neurology* 457 (3): 213–35.
<https://doi.org/10.1002/cne.10454>.
- Klaauw, Agatha A. van der, Julia M. Keogh, Elana Henning, Victoria M. Trowse, Waljit S. Dhillon, Mohammad A. Ghatei, and I. Sadaf Farooqi. 2013. "High Protein Intake Stimulates Postprandial GLP1 and PYY Release." *Obesity (Silver Spring, Md.)* 21 (8): 1602–7.
<https://doi.org/10.1002/oby.20154>.
- Kleiman, Susan C., Ian M. Carroll, Lisa M. Tarantino, and Cynthia M. Bulik. 2015. "Gut Feelings: A Role for the Intestinal Microbiota in Anorexia Nervosa?" *The International Journal of Eating Disorders* 48 (5): 449–51. <https://doi.org/10.1002/eat.22394>.
- Kojima, M., H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo, and K. Kangawa. 1999. "Ghrelin Is a Growth-Hormone-Releasing Acylated Peptide from Stomach." *Nature* 402 (6762): 656–60.
<https://doi.org/10.1038/45230>.
- Kringelbach, Morten L. 2005. "The Human Orbitofrontal Cortex: Linking Reward to Hedonic Experience." *Nature Reviews. Neuroscience* 6 (9): 691–702. <https://doi.org/10.1038/nrn1747>.
- Kristensen, P., M. E. Judge, L. Thim, U. Ribel, K. N. Christjansen, B. S. Wulff, J. T. Clausen, et al. 1998. "Hypothalamic CART Is a New Anorectic Peptide Regulated by Leptin." *Nature* 393 (6680): 72–76. <https://doi.org/10.1038/29993>.
- Kuhre, Rune E., Charlotte R. Frost, Berit Svendsen, and Jens J. Holst. 2015. "Molecular Mechanisms of Glucose-Stimulated GLP-1 Secretion From Perfused Rat Small Intestine." *Diabetes* 64 (2): 370–82. <https://doi.org/10.2337/db14-0807>.
- La Serre, Claire Barbier de, Collin L. Ellis, Jennifer Lee, Amber L. Hartman, John C. Rutledge, and Helen E. Raybould. 2010. "Propensity to High-Fat Diet-Induced Obesity in Rats Is Associated with Changes in the Gut Microbiota and Gut Inflammation." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 299 (2): G440–48.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00098.2010>.

- Labarthe, Alexandra, Oriane Fiquet, Rim Hassouna, Philippe Zizzari, Laurence Lanfumey, Nicolas Ramoz, Dominique Grouselle, Jacques Epelbaum, and Virginie Tolle. 2014. "Ghrelin-Derived Peptides: A Link between Appetite/Reward, GH Axis, and Psychiatric Disorders?" *Frontiers in Endocrinology* 5: 163. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00163>.
- Lambert, P. D., P. R. Couceyro, K. M. McGirr, S. E. Dall Vechia, Y. Smith, and M. J. Kuhar. 1998. "CART Peptides in the Central Control of Feeding and Interactions with Neuropeptide Y." *Synapse (New York, N.Y.)* 29 (4): 293–98. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(199808\)29:4<293::AID-SYN1>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199808)29:4<293::AID-SYN1>3.0.CO;2-0).
- Larsen, P. J., M. Tang-Christensen, C. E. Stidsen, K. Madsen, M. S. Smith, and J. L. Cameron. 1999. "Activation of Central Neuropeptide Y Y1 Receptors Potently Stimulates Food Intake in Male Rhesus Monkeys." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84 (10): 3781–91. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.10.5897>.
- Larsen, P. J., N. Vrang, P. C. Petersen, and P. Kristensen. 2000. "Chronic Intracerebroventricular Administration of Recombinant CART(42-89) Peptide Inhibits and Causes Weight Loss in Lean and Obese Zucker (Fa/Fa) Rats." *Obesity Research* 8 (8): 590–96. <https://doi.org/10.1038/oby.2000.76>.
- Larsson, L. I., and J. F. Rehfeld. 1979. "Localization and Molecular Heterogeneity of Cholecystokinin in the Central and Peripheral Nervous System." *Brain Research* 165 (2): 201–18. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90554-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90554-7).
- Lartigue, Guillaume de, Rod Dimaline, Andrea Varro, and Graham J. Dockray. 2007. "Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript: Stimulation of Expression in Rat Vagal Afferent Neurons by Cholecystokinin and Suppression by Ghrelin." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (11): 2876–82. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5508-06.2007>.
- Lauffer, Lina M., Roman Iakoubov, and Patricia L. Brubaker. 2009. "GPR119 Is Essential for Oleoylethanolamide-Induced Glucagon-like Peptide-1 Secretion from the Intestinal Enteroendocrine L-Cell." *Diabetes* 58 (5): 1058–66. <https://doi.org/10.2337/db08-1237>.
- Lawton, C. L., H. J. Delargy, J. Brockman, F. C. Smith, and J. E. Blundell. 2000. "The Degree of Saturation of Fatty Acids Influences Post-Ingestive Satiety." *The British Journal of Nutrition* 83 (5): 473–82.
- Layman, Donald K., Richard A. Boileau, Donna J. Erickson, James E. Painter, Harn Shiue, Carl Sather, and Demtra D. Christou. 2003. "A Reduced Ratio of Dietary Carbohydrate to Protein Improves Body Composition and Blood Lipid Profiles during Weight Loss in Adult Women." *The Journal of Nutrition* 133 (2): 411–17. <https://doi.org/10.1093/jn/133.2.411>.

- Le Quellec, A., A. Kervran, P. Blache, A. J. Ciurana, and D. Bataille. 1992. "Oxyntomodulin-like Immunoreactivity: Diurnal Profile of a New Potential Enterogastrone." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 74 (6): 1405–9. <https://doi.org/10.1210/jcem.74.6.1592887>.
- Lechan, Ronald M., and Csaba Fekete. 2006. "The TRH Neuron: A Hypothalamic Integrator of Energy Metabolism." In *Progress in Brain Research*, edited by A. Kalsbeek, E. Fliers, M. A. Hofman, D. F. Swaab, E. J. W. van Someren, and R. M. Buijs, 153:209–35. Hypothalamic Integration of Energy Metabolism. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)53012-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)53012-2).
- Lecklin, Anne, Ingrid Lundell, Leena Paananen, Jarl E. S. Wikberg, Pekka T. Männistö, and Dan Larhammar. 2002. "Receptor Subtypes Y1 and Y5 Mediate Neuropeptide Y Induced Feeding in the Guinea-Pig." *British Journal of Pharmacology* 135 (8): 2029–37. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704667>.
- Lee, Sukyeong, Mathew E. Sowa, Yo-hei Watanabe, Paul B. Sigler, Wah Chiu, Masasuke Yoshida, and Francis T. F. Tsai. 2003. "The Structure of ClpB: A Molecular Chaperone That Rescues Proteins from an Aggregated State." *Cell* 115 (2): 229–40.
- Legrand, Romain, Nicolas Lucas, Jonathan Breton, Saïda Azhar, Jean-Claude do Rego, Pierre Déchelotte, Moïse Coëffier, and Sergueï O. Fetissov. 2016. "Ghrelin Treatment Prevents Development of Activity Based Anorexia in Mice." *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 26 (6): 948–58. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2016.03.010>.
- Leibowitz, S. F., N. J. Hammer, and K. Chang. 1981. "Hypothalamic Paraventricular Nucleus Lesions Produce Overeating and Obesity in the Rat." *Physiology & Behavior* 27 (6): 1031–40.
- Lejeune, Manuela P. G. M., Klaas R. Westerterp, Tanja C. M. Adam, Natalie D. Luscombe-Marsh, and Margriet S. Westerterp-Plantenga. 2006. "Ghrelin and Glucagon-like Peptide 1 Concentrations, 24-h Satiety, and Energy and Substrate Metabolism during a High-Protein Diet and Measured in a Respiration Chamber." *The American Journal of Clinical Nutrition* 83 (1): 89–94. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.1.89>.
- Lely, Aart J. van der, Matthias Tschöp, Mark L. Heiman, and Ezio Ghigo. 2004. "Biological, Physiological, Pathophysiological, and Pharmacological Aspects of Ghrelin." *Endocrine Reviews* 25 (3): 426–57. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0029>.
- Levine, A. S., and J. E. Morley. 1984. "Neuropeptide Y: A Potent Inducer of Consummatory Behavior in Rats." *Peptides* 5 (6): 1025–29. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(84\)90165-7](https://doi.org/10.1016/0196-9781(84)90165-7).
- Ley, Ruth E., Fredrik Bäckhed, Peter Turnbaugh, Catherine A. Lozupone, Robin D. Knight, and Jeffrey I. Gordon. 2005. "Obesity Alters Gut Microbial Ecology." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (31): 11070–75. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504978102>.

- Ley, Ruth E., Peter J. Turnbaugh, Samuel Klein, and Jeffrey I. Gordon. 2006. "Microbial Ecology: Human Gut Microbes Associated with Obesity." *Nature* 444 (7122): 1022–23. <https://doi.org/10.1038/4441022a>.
- Li, S. Z., J. H. Lee, W. Lee, C. J. Yoon, J. H. Baik, and S. K. Lim. 1999. "Type I Beta-Turn Conformation Is Important for Biological Activity of the Melanocyte-Stimulating Hormone Analogues." *European Journal of Biochemistry* 265 (1): 430–40.
- Liddle, R. A., I. D. Goldfine, M. S. Rosen, R. A. Taplitz, and J. A. Williams. 1985. "Cholecystokinin Bioactivity in Human Plasma. Molecular Forms, Responses to Feeding, and Relationship to Gallbladder Contraction." *The Journal of Clinical Investigation* 75 (4): 1144–52. <https://doi.org/10.1172/JCI111809>.
- Lin, Zong, Damian Madan, and Hays S Rye. 2008. "GroEL Stimulates Protein Folding through Forced Unfolding." *Nature Structural & Molecular Biology* 15 (3): 303–11. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1394>.
- Linke, Katrin, Tobias Wolfram, Johanna Bussemer, and Ursula Jakob. 2003. "The Roles of the Two Zinc Binding Sites in DnaJ." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (45): 44457–66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307491200>.
- Liou, Alice P., Yoshitatsu Sei, Xilin Zhao, Jianying Feng, Xinping Lu, Craig Thomas, Susanne Pechhold, Helen E. Raybould, and Stephen A. Wank. 2011. "The Extracellular Calcium-Sensing Receptor Is Required for Cholecystokinin Secretion in Response to L-Phenylalanine in Acutely Isolated Intestinal I Cells." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 300 (4): G538-546. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00342.2010>.
- Little, Tanya J., Antonietta Russo, James H. Meyer, Michael Horowitz, Douglas R. Smyth, Max Bellon, Judith M. Wishart, Karen L. Jones, and Christine Feinle-Bisset. 2007. "Free Fatty Acids Have More Potent Effects on Gastric Emptying, Gut Hormones, and Appetite than Triacylglycerides." *Gastroenterology* 133 (4): 1124–31. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.06.060>.
- Lu, Xin-Yun, Gregory S. Barsh, Huda Akil, and Stanley J. Watson. 2003. "Interaction between Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone and Corticotropin-Releasing Hormone in the Regulation of Feeding and Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Responses." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23 (21): 7863–72.
- Lucas, Nicolas, Romain Legrand, Christine Bôle-Feysot, Jonathan Breton, Moïse Coëffier, Kirsti Akkermann, Anu Järv, Jaanus Harro, Pierre Déchelotte, and Sergueï O. Fetissov. 2019. "Immunoglobulin G Modulation of the Melanocortin 4 Receptor Signaling in Obesity and Eating Disorders." *Translational Psychiatry* 9 (1): 87. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0422-9>.
- Lucas, Nicolas, Romain Legrand, Wassila Ouelaa, Jonathan Breton, Naouel Tennoune, Christine Bole-Feysot, Pierre Déchelotte, and Sergueï O. Fetissov. 2014. "Effects of Rabbit Anti- α -Melanocyte-

- Stimulating Hormone (α -MSH) Immunoglobulins on α -MSH Signaling Related to Food Intake Control." *Neuropeptides* 48 (1): 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2013.10.017>.
- Ludwig, D. S., N. A. Tritos, J. W. Mastaitis, R. Kulkarni, E. Kokkotou, J. Elmquist, B. Lowell, J. S. Flier, and E. Maratos-Flier. 2001. "Melanin-Concentrating Hormone Overexpression in Transgenic Mice Leads to Obesity and Insulin Resistance." *The Journal of Clinical Investigation* 107 (3): 379–86. <https://doi.org/10.1172/JCI10660>.
- MacNeil, Douglas J. 2013. "The Role of Melanin-Concentrating Hormone and Its Receptors in Energy Homeostasis." *Frontiers in Endocrinology* 4 (April). <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00049>.
- Maejima, Yuko, Udval Sedbazar, Shigetomo Suyama, Daisuke Kohno, Tatsushi Onaka, Eisuke Takano, Natsu Yoshida, et al. 2009. "Nesfatin-1-Regulated Oxytocinergic Signaling in the Paraventricular Nucleus Causes Anorexia through a Leptin-Independent Melanocortin Pathway." *Cell Metabolism* 10 (5): 355–65. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.09.002>.
- Maida, Adriano, Julie A. Lovshin, Laurie L. Baggio, and Daniel J. Drucker. 2008. "The Glucagon-like Peptide-1 Receptor Agonist Oxyntomodulin Enhances Beta-Cell Function but Does Not Inhibit Gastric Emptying in Mice." *Endocrinology* 149 (11): 5670–78. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0336>.
- Marmonier, C., D. Chapelot, and J. Louis-Sylvestre. 2000. "Effects of Macronutrient Content and Energy Density of Snacks Consumed in a Satiety State on the Onset of the next Meal." *Appetite* 34 (2): 161–68. <https://doi.org/10.1006/appe.1999.0302>.
- Marston, Oliver J., Paul Hurst, Mark L. Evans, Denis I. Burdakov, and Lora K. Heisler. 2011. "Neuropeptide Y Cells Represent a Distinct Glucose-Sensing Population in the Lateral Hypothalamus." *Endocrinology* 152 (11): 4046–52. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1307>.
- Mayer, J. 1953. "Glucostatic Mechanism of Regulation of Food Intake." *The New England Journal of Medicine* 249 (1): 13–16. <https://doi.org/10.1056/NEJM195307022490104>.
- . 1996. "Glucostatic Mechanism of Regulation of Food Intake. 1953." *Obesity Research* 4 (5): 493–96.
- McAuley, K. A., C. M. Hopkins, K. J. Smith, R. T. McLay, S. M. Williams, R. W. Taylor, and J. I. Mann. 2005. "Comparison of High-Fat and High-Protein Diets with a High-Carbohydrate Diet in Insulin-Resistant Obese Women." *Diabetologia* 48 (1): 8–16. <https://doi.org/10.1007/s00125-004-1603-4>.
- McAuley, K. A., K. J. Smith, R. W. Taylor, R. T. McLay, S. M. Williams, and J. I. Mann. 2006. "Long-Term Effects of Popular Dietary Approaches on Weight Loss and Features of Insulin Resistance." *International Journal of Obesity (2005)* 30 (2): 342–49. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803075>.

- McCarty, J. S., A. Buchberger, J. Reinstein, and B. Bukau. 1995. "The Role of ATP in the Functional Cycle of the DnaK Chaperone System." *Journal of Molecular Biology* 249 (1): 126–37. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0284>.
- McGowan, M. K., K. M. Andrews, and S. P. Grossman. 1992. "Chronic Intrahypothalamic Infusions of Insulin or Insulin Antibodies Alter Body Weight and Food Intake in the Rat." *Physiology & Behavior* 51 (4): 753–66. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(92\)90112-f](https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90112-f).
- Meeran, K., D. O'Shea, C. M. Edwards, M. D. Turton, M. M. Heath, I. Gunn, S. Abusnana, et al. 1999. "Repeated Intracerebroventricular Administration of Glucagon-like Peptide-1-(7-36) Amide or Exendin-(9-39) Alters Body Weight in the Rat." *Endocrinology* 140 (1): 244–50. <https://doi.org/10.1210/endo.140.1.6421>.
- Mercer, Julian G., Kim M. Moar, and Nigel Hoggard. 1998. "Localization of Leptin Receptor (Ob-R) Messenger Ribonucleic Acid in the Rodent Hindbrain." *Endocrinology* 139 (1): 29–34. <https://doi.org/10.1210/endo.139.1.5685>.
- Merchenthaler, I., S. Vigh, P. Petrusz, and A. V. Schally. 1982. "Immunocytochemical Localization of Corticotropin-Releasing Factor (CRF) in the Rat Brain." *American Journal of Anatomy* 165 (4): 385–96. <https://doi.org/10.1002/aja.1001650404>.
- "MetaHIT: Metagenomics of the Human Intestinal Tract." 2008. January 2008. <http://www.metahit.eu/index.php?id=360>.
- Michel, Martin C., Annette Beck-Sickinger, Helen Cox, Henri N. Doods, Herbert Herzog, Dan Larhammar, Remi Quirion, Thue Schwartz, and Thomas Westfall. 1998. "XVI. International Union of Pharmacology Recommendations for the Nomenclature of Neuropeptide Y, Peptide YY, and Pancreatic Polypeptide Receptors." *Pharmacological Reviews* 50 (1): 143–50.
- Mikkelsen, P. B., S. Toubro, and A. Astrup. 2000. "Effect of Fat-Reduced Diets on 24-h Energy Expenditure: Comparisons between Animal Protein, Vegetable Protein, and Carbohydrate." *The American Journal of Clinical Nutrition* 72 (5): 1135–41. <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.5.1135>.
- Million, M., E. Angelakis, M. Maraninchi, M. Henry, R. Giorgi, R. Valero, B. Vialettes, and D. Raoult. 2013. "Correlation between Body Mass Index and Gut Concentrations of Lactobacillus Reuteri, Bifidobacterium Animalis, Methanobrevibacter Smithii and Escherichia Coli." *International Journal of Obesity (2005)* 37 (11): 1460–66. <https://doi.org/10.1038/ijo.2013.20>.
- Miner, J. L., M. A. Della-Fera, J. A. Paterson, and C. A. Baile. 1989. "Lateral Cerebroventricular Injection of Neuropeptide Y Stimulates Feeding in Sheep." *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 257 (2): R383–87. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1989.257.2.R383>.

- Miot, Marika, Michael Reidy, Shannon M. Doyle, Joel R. Hoskins, Danielle M. Johnston, Olivier Genest, Maria-Carmen Vitery, Daniel C. Masison, and Sue Wickner. 2011. "Species-Specific Collaboration of Heat Shock Proteins (Hsp) 70 and 100 in Thermotolerance and Protein Disaggregation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (17): 6915–20. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102828108>.
- Miyazaki, Takuya, Tatsunari Yoshimi, Yoshinobu Furutsu, Kunihiro Hongo, Tomohiro Mizobata, Masaaki Kanemori, and Yasushi Kawata. 2002. "GroEL-Substrate-GroES Ternary Complexes Are an Important Transient Intermediate of the Chaperonin Cycle." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (52): 50621–28. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209183200>.
- Mogk, A., T. Tomoyasu, P. Goloubinoff, S. Rüdiger, D. Röder, H. Langen, and B. Bukau. 1999. "Identification of Thermolabile Escherichia Coli Proteins: Prevention and Reversion of Aggregation by DnaK and ClpB." *The EMBO Journal* 18 (24): 6934–49. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.24.6934>.
- Mogk, Axel, Christian Schlieker, Christine Strub, Wolfgang Rist, Jimena Weibezahn, and Bernd Bukau. 2003. "Roles of Individual Domains and Conserved Motifs of the AAA+ Chaperone ClpB in Oligomerization, ATP Hydrolysis, and Chaperone Activity." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (20): 17615–24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209686200>.
- Møller, Vagn. 1954. "Distribution of Amino Acid Decarboxylases in Enterobacteriaceae¹." *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica* 35 (3): 259–77. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1954.tb00869.x>.
- Mondal, M. S., M. Nakazato, and S. Matsukura. 2002. "Characterization of Orexins (Hypocretins) and Melanin-Concentrating Hormone in Genetically Obese Mice." *Regulatory Peptides* 104 (1–3): 21–25. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(01\)00345-7](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(01)00345-7).
- Monteleone, P., R. Carratù, M. Cartenì, M. Generoso, M. Lamberti, L. De Magistris, F. Brambilla, B. Colurcio, M. Secondulfo, and M. Maj. 2004. "Intestinal Permeability Is Decreased in Anorexia Nervosa." *Molecular Psychiatry* 9 (1): 76–80. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001374>.
- Moore, S. A., A. Lopez, A. Richardson, and M. A. Pahlavani. 1998. "Effect of Age and Dietary Restriction on Expression of Heat Shock Protein 70 in Rat Alveolar Macrophages." *Mechanisms of Ageing and Development* 104 (1): 59–73.
- Morgan, J. F., F. Reid, and J. H. Lacey. 1999. "The SCOFF Questionnaire: Assessment of a New Screening Tool for Eating Disorders." *BMJ (Clinical Research Ed.)* 319 (7223): 1467–68. <https://doi.org/10.1136/bmj.319.7223.1467>.
- Morley, J. E., A. S. Levine, M. Grace, and J. Kneip. 1985. "Peptide YY (PYY), a Potent Orexigenic Agent." *Brain Research* 341 (1): 200–203.

- Morton, G. J., and M. W. Schwartz. 2001. "The NPY/AgRP Neuron and Energy Homeostasis." *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 25 Suppl 5 (December): S56-62. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801915>.
- Mountjoy, K. G., M. T. Mortrud, M. J. Low, R. B. Simerly, and R. D. Cone. 1994. "Localization of the Melanocortin-4 Receptor (MC4-R) in Neuroendocrine and Autonomic Control Circuits in the Brain." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 8 (10): 1298–1308. <https://doi.org/10.1210/mend.8.10.7854347>.
- Moura, Carolina Soares, Pablo Christiano Barboza Lollo, Priscila Neder Morato, Eder Muller Risso, and Jaime Amaya-Farfan. 2017. "Modulatory Effects of Arginine, Glutamine and Branched-Chain Amino Acids on Heat Shock Proteins, Immunity and Antioxidant Response in Exercised Rats." *Food & Function* 8 (9): 3228–38. <https://doi.org/10.1039/c7fo00465f>.
- Muccioli, Giampiero, Matthias Tschöp, Mauro Papotti, Romano Deghenghi, Mark Heiman, and Ezio Ghigo. 2002. "Neuroendocrine and Peripheral Activities of Ghrelin: Implications in Metabolism and Obesity." *European Journal of Pharmacology* 440 (2–3): 235–54. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(02\)01432-2](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(02)01432-2).
- Münzberg, Heike, Jeffrey S. Flier, and Christian Bjørbaek. 2004. "Region-Specific Leptin Resistance within the Hypothalamus of Diet-Induced Obese Mice." *Endocrinology* 145 (11): 4880–89. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0726>.
- Nakamura, Eiji, Mai Hasumura, Hisayuki Uneyama, and Kunio Torii. 2011. "Luminal Amino Acid-Sensing Cells in Gastric Mucosa." *Digestion* 83 Suppl 1: 13–18. <https://doi.org/10.1159/000323399>.
- Nakazato, M., N. Murakami, Y. Date, M. Kojima, H. Matsuo, K. Kangawa, and S. Matsukura. 2001. "A Role for Ghrelin in the Central Regulation of Feeding." *Nature* 409 (6817): 194–98. <https://doi.org/10.1038/35051587>.
- Natividad, Jane M. M., and Elena F. Verdu. 2013. "Modulation of Intestinal Barrier by Intestinal Microbiota: Pathological and Therapeutic Implications." *Pharmacological Research, SI:Human microbiome and health*, 69 (1): 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.007>.
- Nedvídková, Jara, Ivana Krykorková, Vladimír Barták, Hana Papezová, Philip W. Gold, Salvatore Alesci, and Karel Pacak. 2003. "Loss of Meal-Induced Decrease in Plasma Ghrelin Levels in Patients with Anorexia Nervosa." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88 (4): 1678–82. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021669>.
- Nicholson, J. R., J.-C. Peter, A.-C. Lecourt, Y.-A. Barde, and K. G. Hofbauer. 2007. "Melanocortin-4 Receptor Activation Stimulates Hypothalamic Brain-Derived Neurotrophic Factor Release to Regulate Food Intake, Body Temperature and Cardiovascular Function." *Journal of Neuroendocrinology* 19 (12): 974–82. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2007.01610.x>.

- Nijenhuis, W. A., J. Oosterom, and R. A. Adan. 2001. "AgRP(83-132) Acts as an Inverse Agonist on the Human-Melanocortin-4 Receptor." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 15 (1): 164–71. <https://doi.org/10.1210/mend.15.1.0578>.
- Nojima, Tatsuya, Shigeto Murayama, Masasuke Yoshida, and Fumihito Motojima. 2008. "Determination of the Number of Active GroES Subunits in the Fused Heptamer GroES Required for Interactions with GroEL." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (26): 18385–92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709825200>.
- Norton, Mariana, and Kevin G Murphy. 2017. "Targeting Gastrointestinal Nutrient Sensing Mechanisms to Treat Obesity." *Current Opinion in Pharmacology, • Gastrointestinal • Endocrine and metabolic diseases*, 37 (December): 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2017.07.005>.
- Ohata, H., K. Suzuki, Y. Oki, and T. Shibasaki. 2000. "Urocortin in the Ventromedial Hypothalamic Nucleus Acts as an Inhibitor of Feeding Behavior in Rats." *Brain Research* 861 (1): 1–7. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)02378-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)02378-1).
- Ollmann, Michael M., Brent D. Wilson, Ying-Kui Yang, Julie A. Kerns, Yanru Chen, Ira Gantz, and Gregory S. Barsh. 1997. "Antagonism of Central Melanocortin Receptors in Vitro and in Vivo by Agouti-Related Protein." *Science* 278 (5335): 135–38. <https://doi.org/10.1126/science.278.5335.135>.
- Olney, John W. 1969. "Brain Lesions, Obesity, and Other Disturbances in Mice Treated with Monosodium Glutamate." *Science* 164 (3880): 719–21. <https://doi.org/10.1126/science.164.3880.719>.
- OMS, Organisation mondiale de la Santé. 2018a. "Surpoids et obésité : définitions." 2018. https://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood_what/fr/.
- . 2018b. "Obésité et surpoids." February 15, 2018. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
- Opitz, Bertram. 2014. "Memory Function and the Hippocampus." *Frontiers of Neurology and Neuroscience* 34: 51–59. <https://doi.org/10.1159/000356422>.
- Orr, Jeb, and Brenda Davy. 2005. "Dietary Influences on Peripheral Hormones Regulating Energy Intake: Potential Applications for Weight Management." *Journal of the American Dietetic Association* 105 (7): 1115–24. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2005.04.005>.
- Orskov, C., L. Rabenhøj, A. Wettergren, H. Kofod, and J. J. Holst. 1994. "Tissue and Plasma Concentrations of Amidated and Glycine-Extended Glucagon-like Peptide I in Humans." *Diabetes* 43 (4): 535–39. <https://doi.org/10.2337/diab.43.4.535>.
- Oya, Manami, Tetsuya Kitaguchi, Ramona Pais, Frank Reimann, Fiona Gribble, and Takashi Tsuboi. 2013. "The G Protein-Coupled Receptor Family C Group 6 Subtype A (GPC6A) Receptor Is Involved in Amino Acid-Induced Glucagon-like Peptide-1 Secretion from GLUTag Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 288 (7): 4513–21. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.402677>.

- Packschies, L., H. Theyssen, A. Buchberger, B. Bukau, R. S. Goody, and J. Reinstein. 1997. "GrpE Accelerates Nucleotide Exchange of the Molecular Chaperone DnaK with an Associative Displacement Mechanism." *Biochemistry* 36 (12): 3417–22. <https://doi.org/10.1021/bi962835l>.
- Pal, S., S. Radavelli-Bagatini, M. Hagger, and V. Ellis. 2014. "Comparative Effects of Whey and Casein Proteins on Satiety in Overweight and Obese Individuals: A Randomized Controlled Trial." *European Journal of Clinical Nutrition* 68 (9): 980–86. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2014.84>.
- Panksepp, J. 1972. "Hypothalamic Radioactivity after Intra-gastric Glucose- 14 C in Rats." *American Journal of Physiology-Legacy Content* 223 (2): 396–401. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1972.223.2.396>.
- Panksepp, Jaak. 1973. "The Ventromedial Hypothalamus and Metabolic Adjustments of Feeding Behavior." *Behavioral Biology* 9 (1): 65–75. [https://doi.org/10.1016/S0091-6773\(73\)80169-5](https://doi.org/10.1016/S0091-6773(73)80169-5).
- Parker, R. M., and H. Herzog. 1999. "Regional Distribution of Y-Receptor Subtype MRNAs in Rat Brain." *The European Journal of Neuroscience* 11 (4): 1431–48.
- Pau, Mei-Yoong Choong, K. -Y. Francis Pau, and Harold G. Spies. 1988. "Characterization of Central Actions of Neuropeptide Y on Food and Water Intake in Rabbits." *Physiology & Behavior* 44 (6): 797–802. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(88\)90065-0](https://doi.org/10.1016/0031-9384(88)90065-0).
- Peciña, Susana, Kyle S. Smith, and Kent C. Berridge. 2006. "Hedonic Hot Spots in the Brain." *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* 12 (6): 500–511. <https://doi.org/10.1177/1073858406293154>.
- Perna, Simone, Tariq A. Alalwan, Zahraa Alaali, Tahera Alnashaba, Clara Gasparri, Vittoria Infantino, Layla Hammad, et al. 2019. "The Role of Glutamine in the Complex Interaction between Gut Microbiota and Health: A Narrative Review." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (20). <https://doi.org/10.3390/ijms20205232>.
- Peruzzo, Bruno, Francisco E. Pastor, Juan L. Blázquez, Karin Schöbitz, Belén Peláez, Pedro Amat, and Esteban M. Rodríguez. 2000. "A Second Look at the Barriers of the Medial Basal Hypothalamus." *Experimental Brain Research* 132 (1): 10–26. <https://doi.org/10.1007/s002219900289>.
- Pesta, Dominik H., and Varman T. Samuel. 2014. "A High-Protein Diet for Reducing Body Fat: Mechanisms and Possible Caveats." *Nutrition & Metabolism* 11 (1): 53. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-11-53>.
- Pinos, H., M. A. Pérez-Izquierdo, B. Carrillo, and P. Collado. 2011. "Effects of Undernourishment on the Hypothalamic Orexinergic System." *Physiology & Behavior* 102 (1): 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.09.023>.

- Polak, J. M., S. R. Bloom, P. L. Rayford, A. G. E. Pearce, A. M. J. Buchan, and J. C. Thompson. 1975. "IDENTIFICATION OF CHOLECYSTOKININ-SECRETING CELLS." *The Lancet*, Originally published as Volume 2, Issue 7943, 306 (7943): 1016–18. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(75\)90297-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(75)90297-4).
- Pop, Miana Gabriela, Carmen Crivii, and Iulian Opincariu. 2018. "Anatomy and Function of the Hypothalamus." *Hypothalamus in Health and Diseases*, November. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80728>.
- Poppitt, S. D., D. McCormack, and R. Buffenstein. 1998. "Short-Term Effects of Macronutrient Preloads on Appetite and Energy Intake in Lean Women." *Physiology & Behavior* 64 (3): 279–85.
- Prada, P. O., S. M. Hirabara, C. T. de Souza, A. A. Schenka, H. G. Zecchin, J. Vassallo, L. A. Velloso, et al. 2007. "L-Glutamine Supplementation Induces Insulin Resistance in Adipose Tissue and Improves Insulin Signalling in Liver and Muscle of Rats with Diet-Induced Obesity." *Diabetologia* 50 (9): 1949–59. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0723-z>.
- Pritchard, L. E., A. V. Turnbull, and A. White. 2002. "Pro-Opiomelanocortin Processing in the Hypothalamus: Impact on Melanocortin Signalling and Obesity." *The Journal of Endocrinology* 172 (3): 411–21. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1720411>.
- Psichas, A., M. L. Sleeth, K. G. Murphy, L. Brooks, G. A. Bewick, A. C. Hanyaloglu, M. A. Ghatei, S. R. Bloom, and G. Frost. 2015. "The Short Chain Fatty Acid Propionate Stimulates GLP-1 and PYY Secretion via Free Fatty Acid Receptor 2 in Rodents." *International Journal of Obesity (2005)* 39 (3): 424–29. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.153>.
- Qian, Su, Howard Chen, Drew Weingarh, Myrna E. Trumbauer, Dawn E. Novi, Xiaoming Guan, Hong Yu, et al. 2002. "Neither Agouti-Related Protein nor Neuropeptide Y Is Critically Required for the Regulation of Energy Homeostasis in Mice." *Molecular and Cellular Biology* 22 (14): 5027–35. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.14.5027-5035.2002>.
- Raben, Anne, Lisa Agerholm-Larsen, Anne Flint, Jens J. Holst, and Arne Astrup. 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." *The American Journal of Clinical Nutrition* 77 (1): 91–100. <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.1.91>.
- Raffin-Sanson, M. L., Y. de Keyser, and X. Bertagna. 2003. "Proopiomelanocortin, a Polypeptide Precursor with Multiple Functions: From Physiology to Pathological Conditions." *European Journal of Endocrinology* 149 (2): 79–90.
- Raynes, Rachel, Bruce D. Leckey, Kevin Nguyen, and Sandy D. Westerheide. 2012. "Heat Shock and Caloric Restriction Have a Synergistic Effect on the Heat Shock Response in a Sir2.1-Dependent

- Manner in *Caenorhabditis Elegans*." *The Journal of Biological Chemistry* 287 (34): 29045–53. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.353714>.
- Rebello, Candida J., Corby K. Martin, William D. Johnson, Carol E. O'Neil, and Frank L. Greenway. 2012. "Efficacy of Olibra: A 12-Week Randomized Controlled Trial and a Review of Earlier Studies." *Journal of Diabetes Science and Technology* 6 (3): 695–708. <https://doi.org/10.1177/193229681200600326>.
- Reimann, F., L. Williams, G. da Silva Xavier, G. A. Rutter, and F. M. Gribble. 2004. "Glutamine Potently Stimulates Glucagon-like Peptide-1 Secretion from GLUTag Cells." *Diabetologia* 47 (9): 1592–1601. <https://doi.org/10.1007/s00125-004-1498-0>.
- Reimann, Frank, Gwen Tolhurst, and Fiona M. Gribble. 2012. "G-Protein-Coupled Receptors in Intestinal Chemosensation." *Cell Metabolism* 15 (4): 421–31. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.019>.
- Rezai-Zadeh, Kavon, Sanghou Yu, Yanyan Jiang, Amanda Laque, Candice Schwartzenburg, Christopher D. Morrison, Andrei V. Derbenev, Andrea Zsombok, and Heike Münzberg. 2014. "Leptin Receptor Neurons in the Dorsomedial Hypothalamus Are Key Regulators of Energy Expenditure and Body Weight, but Not Food Intake." *Molecular Metabolism* 3 (7): 681–93. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.07.008>.
- Ridaura, Vanessa K., Jeremiah J. Faith, Federico E. Rey, Jiye Cheng, Alexis E. Duncan, Andrew L. Kau, Nicholas W. Griffin, et al. 2013. "Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice." *Science (New York, N.Y.)* 341 (6150): 1241214. <https://doi.org/10.1126/science.1241214>.
- Risérus, U., L. Berglund, and B. Vessby. 2001. "Conjugated Linoleic Acid (CLA) Reduced Abdominal Adipose Tissue in Obese Middle-Aged Men with Signs of the Metabolic Syndrome: A Randomised Controlled Trial." *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 25 (8): 1129–35. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801659>.
- Roberge, J. N., and P. L. Brubaker. 1991. "Secretion of Proglucagon-Derived Peptides in Response to Intestinal Luminal Nutrients." *Endocrinology* 128 (6): 3169–74. <https://doi.org/10.1210/endo-128-6-3169>.
- Roepke, T. A., A. W. Smith, O. K. Rønnekleiv, and M. J. Kelly. 2012. "Serotonin 5-HT_{2C} Receptor-Mediated Inhibition of the M-Current in Hypothalamic POMC Neurons." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 302 (11): E1399-1406. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00565.2011>.
- Rohner-Jeanraud, F. 1995. "A Neuroendocrine Reappraisal of the Dual-Centre Hypothesis: Its Implications for Obesity and Insulin Resistance." *International Journal of Obesity and Related*

- Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 19 (8): 517–34.
- Rohner-Jeanrenaud, F., L. S. Craft, J. Bridwell, T. M. Suter, F. C. Tinsley, D. L. Smiley, D. R. Burkhart, et al. 2002. “Chronic Central Infusion of Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript (CART 55-102): Effects on Body Weight Homeostasis in Lean and High-Fat-Fed Obese Rats.” *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 26 (2): 143–49. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801863>.
- Rosenzweig, Rina, Shoeib Moradi, Arash Zarrine-Afsar, John R. Glover, and Lewis E. Kay. 2013. “Unraveling the Mechanism of Protein Disaggregation through a ClpB-DnaK Interaction.” *Science (New York, N.Y.)* 339 (6123): 1080–83. <https://doi.org/10.1126/science.1233066>.
- Rosenzweig, Rina, Patrick Farber, Algirdas Velyvis, Enrico Rennella, Michael P. Latham, and Lewis E. Kay. 2015. “ClpB N-Terminal Domain Plays a Regulatory Role in Protein Disaggregation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (50): E6872–6881. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512783112>.
- Ross, Christopher A., and Michelle A. Poirier. 2004. “Protein Aggregation and Neurodegenerative Disease.” *Nature Medicine* 10 Suppl (July): S10–17. <https://doi.org/10.1038/nm1066>.
- Roux, C. W. le, M. Patterson, R. P. Vincent, C. Hunt, M. A. Ghatei, and S. R. Bloom. 2005. “Postprandial Plasma Ghrelin Is Suppressed Proportional to Meal Calorie Content in Normal-Weight but Not Obese Subjects.” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90 (2): 1068–71. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1216>.
- Rushing, P. A., M. M. Hagan, R. J. Seeley, T. A. Lutz, D. A. D’Alessio, E. L. Air, and S. C. Woods. 2001. “Inhibition of Central Amylin Signaling Increases Food Intake and Body Adiposity in Rats.” *Endocrinology* 142 (11): 5035. <https://doi.org/10.1210/endo.142.11.8593>.
- Russo, Scott J., and Eric J. Nestler. 2013. “The Brain Reward Circuitry in Mood Disorders.” *Nature Reviews Neuroscience* 14 (9): 609–25. <https://doi.org/10.1038/nrn3381>.
- Rye, H. S., S. G. Burston, W. A. Fenton, J. M. Beechem, Z. Xu, P. B. Sigler, and A. L. Horwich. 1997. “Distinct Actions of Cis and Trans ATP within the Double Ring of the Chaperonin GroEL.” *Nature* 388 (6644): 792–98. <https://doi.org/10.1038/42047>.
- Sahu, Abhiram. 2003. “Leptin Signaling in the Hypothalamus: Emphasis on Energy Homeostasis and Leptin Resistance.” *Frontiers in Neuroendocrinology* 24 (4): 225–53.
- Sainsbury, Amanda, Gregory J. Cooney, and Herbert Herzog. 2002. “Hypothalamic Regulation of Energy Homeostasis.” *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism* 16 (4): 623–37.
- Sakata, Ichiro, Kazuaki Nakamura, Mami Yamazaki, Maki Matsubara, Yuijiro Hayashi, Kenji Kangawa, and Takafumi Sakai. 2002. “Ghrelin-Producing Cells Exist as Two Types of Cells, Closed- and Opened-Type Cells, in the Rat Gastrointestinal Tract.” *Peptides* 23 (3): 531–36.

- Sakurai, T., A. Amemiya, M. Ishii, I. Matsuzaki, R. M. Chemelli, H. Tanaka, S. C. Williams, et al. 1998. "Orexins and Orexin Receptors: A Family of Hypothalamic Neuropeptides and G Protein-Coupled Receptors That Regulate Feeding Behavior." *Cell* 92 (4): 573–85. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80949-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80949-6).
- Salamone, J. D., M. Correa, A. Farrar, and S. M. Mingote. 2007. "Effort-Related Functions of Nucleus Accumbens Dopamine and Associated Forebrain Circuits." *Psychopharmacology* 191 (3): 461–82. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0668-9>.
- Sankoda, Akiko, Norio Harada, Kanako Iwasaki, Shunsuke Yamane, Yuki Murata, Kimitaka Shibue, Yotsapon Thewjitcharoen, et al. 2017. "Long-Chain Free Fatty Acid Receptor GPR120 Mediates Oil-Induced GIP Secretion Through CCK in Male Mice." *Endocrinology* 158 (5): 1172–80. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00090>.
- Sauer, Robert T., Daniel N. Bolon, Briana M. Burton, Randall E. Burton, Julia M. Flynn, Robert A. Grant, Greg L. Hersch, et al. 2004. "Sculpting the Proteome with AAA(+) Proteases and Disassembly Machines." *Cell* 119 (1): 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.020>.
- Sayegh, Ayman I. 2013. "The Role of Cholecystokinin Receptors in the Short-Term Control of Food Intake." *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 114: 277–316. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386933-3.00008-X>.
- Schirmer, E. C., J. R. Glover, M. A. Singer, and S. Lindquist. 1996. "HSP100/Clp Proteins: A Common Mechanism Explains Diverse Functions." *Trends in Biochemical Sciences* 21 (8): 289–96.
- Schlieker, Christian, Jimena Weibezahn, Holger Patzelt, Peter Tessarz, Christine Strub, Kornelius Zeth, Annette Erbse, et al. 2004. "Substrate Recognition by the AAA+ Chaperone ClpB." *Nature Structural & Molecular Biology* 11 (7): 607–15. <https://doi.org/10.1038/nsmb787>.
- Schwartz, T. W., J. J. Holst, J. Fahrenkrug, S. Lindkær Jensen, O. V. Nielsen, J. F. Rehfeld, O. B. Schaffalitzky de Muckadell, and F. Stadil. 1978. "Vagal, Cholinergic Regulation of Pancreatic Polypeptide Secretion." *Journal of Clinical Investigation* 61 (3): 781–89.
- Schwartz, G. J. 2000. "The Role of Gastrointestinal Vagal Afferents in the Control of Food Intake: Current Prospects." *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 16 (10): 866–73.
- Scott, R., J. Minnion, T. Tan, and S. R. Bloom. 2018. "Oxyntomodulin Analogue Increases Energy Expenditure via the Glucagon Receptor." *Peptides* 104 (June): 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.04.008>.
- Sender, Ron, Shai Fuchs, and Ron Milo. 2016. "Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans." *Cell* 164 (3): 337–40. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.013>.

- Shanahan, Fergus, Douwe van Sinderen, Paul W. O'Toole, and Catherine Stanton. 2017. "Feeding the Microbiota: Transducer of Nutrient Signals for the Host." *Gut* 66 (9): 1709–17. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-313872>.
- Sheikh, Abu Baker, Adeel Nasrullah, Shujaul Haq, Aisha Akhtar, Haider Ghazanfar, Amara Nasir, Rao M Afzal, Marvi M Bukhari, Ahtsham Yousaf Chaudhary, and Syed W Naqvi. 2017. "The Interplay of Genetics and Environmental Factors in the Development of Obesity." *Cureus* 9 (7). <https://doi.org/10.7759/cureus.1435>.
- Shiia, Tomomi, Masamitsu Nakazato, Masanari Mizuta, Yukari Date, Muhtashan S. Mondal, Muneki Tanaka, Shin-Ichi Nozoe, Hiroshi Hosoda, Kenji Kangawa, and Shigeru Matsukura. 2002. "Plasma Ghrelin Levels in Lean and Obese Humans and the Effect of Glucose on Ghrelin Secretion." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87 (1): 240–44. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.1.8129>.
- Shimizu, N., Y. Oomura, C. R. Plata-Salamán, and M. Morimoto. 1987. "Hyperphagia and Obesity in Rats with Bilateral Ibotenic Acid-Induced Lesions of the Ventromedial Hypothalamic Nucleus." *Brain Research* 416 (1): 153–56.
- Shin, Andrea, Geoffrey A. Preidis, Robert Shulman, and Purna C. Kashyap. 2019. "The Gut Microbiome in Adult and Pediatric Functional Gastrointestinal Disorders." *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 17 (2): 256–74. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.08.054>.
- Shutter, J. R., M. Graham, A. C. Kinsey, S. Scully, R. Lüthy, and K. L. Stark. 1997. "Hypothalamic Expression of ART, a Novel Gene Related to Agouti, Is up-Regulated in Obese and Diabetic Mutant Mice." *Genes & Development* 11 (5): 593–602.
- Sims, J. S., and J. F. Lorden. 1986. "Effect of Paraventricular Nucleus Lesions on Body Weight, Food Intake and Insulin Levels." *Behavioural Brain Research* 22 (3): 265–81.
- Singleton, Kristen D., and Paul E. Wischmeyer. 2007. "Glutamine's Protection against Sepsis and Lung Injury Is Dependent on Heat Shock Protein 70 Expression." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 292 (5): R1839-1845. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00755.2006>.
- Singru, Praful S., Edith Sánchez, Csaba Fekete, and Ronald M. Lechan. 2007. "Importance of Melanocortin Signaling in Refeeding-Induced Neuronal Activation and Satiety." *Endocrinology* 148 (2): 638–46. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1233>.
- Sinno, Maria Hamze, Jean Claude Do Rego, Moïse Coëffier, Christine Bole-Feysot, Philippe Ducrotté, Danièle Gilbert, François Tron, et al. 2009. "Regulation of Feeding and Anxiety by Alpha-MSH Reactive Autoantibodies." *Psychoneuroendocrinology* 34 (1): 140–49. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.08.021>.

- Skov, A. R., S. Toubro, B. Rønne, L. Holm, and A. Astrup. 1999. "Randomized Trial on Protein vs Carbohydrate in Ad Libitum Fat Reduced Diet for the Treatment of Obesity." *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 23 (5): 528–36.
- Smith, G. P., C. Jerome, B. J. Cushin, R. Eterno, and K. J. Simansky. 1981. "Abdominal Vagotomy Blocks the Satiety Effect of Cholecystokinin in the Rat." *Science (New York, N.Y.)* 213 (4511): 1036–37. <https://doi.org/10.1126/science.7268408>.
- Smith, Kyle S., and Kent C. Berridge. 2007. "Opioid Limbic Circuit for Reward: Interaction between Hedonic Hotspots of Nucleus Accumbens and Ventral Pallidum." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (7): 1594–1605. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4205-06.2007>.
- Sohn, Jong-Woo, Yong Xu, Juli E. Jones, Kevin Wickman, Kevin W. Williams, and Joel K. Elmquist. 2011. "Serotonin 2C Receptor Activates a Distinct Population of Arcuate Pro-Opiomelanocortin Neurons via TRPC Channels." *Neuron* 71 (3): 488–97. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.06.012>.
- Song, Z., B. E. Levin, J. J. McArdle, N. Bakhos, and V. H. Routh. 2001. "Convergence of Pre- and Postsynaptic Influences on Glucosensing Neurons in the Ventromedial Hypothalamic Nucleus." *Diabetes* 50 (12): 2673–81. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.12.2673>.
- Sonksen, P., and J. Sonksen. 2000. "Insulin: Understanding Its Action in Health and Disease." *British Journal of Anaesthesia* 85 (1): 69–79. <https://doi.org/10.1093/bja/85.1.69>.
- Speakman, John R. 2019. "Use of High-Fat Diets to Study Rodent Obesity as a Model of Human Obesity." *International Journal of Obesity* 43 (8): 1491–92. <https://doi.org/10.1038/s41366-019-0363-7>.
- Spillebout, A., P. Dechelotte, J. Ladner, and M. P. Tavalacci. 2019. "Mental Health among University Students with Eating Disorders and Irritable Bowel Syndrome in France." *Revue D'épidemiologie Et De Sante Publique* 67 (5): 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.respe.2019.04.056>.
- Stanley, B. G., S. E. Kyrkouli, S. Lampert, and S. F. Leibowitz. 1986. "Neuropeptide Y Chronically Injected into the Hypothalamus: A Powerful Neurochemical Inducer of Hyperphagia and Obesity." *Peptides* 7 (6): 1189–92.
- Stanley, B. G., A. S. Chin, and S. F. Leibowitz. 1985. "Feeding and Drinking Elicited by Central Injection of Neuropeptide Y: Evidence for a Hypothalamic Site(s) of Action." *Brain Research Bulletin* 14 (6): 521–24. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(85\)90100-5](https://doi.org/10.1016/0361-9230(85)90100-5).
- Steinert, R. E., A. C. Gerspach, H. Gutmann, L. Asarian, J. Drewe, and C. Beglinger. 2011. "The Functional Involvement of Gut-Expressed Sweet Taste Receptors in Glucose-Stimulated Secretion of

- Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) and Peptide YY (PYY).” *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)* 30 (4): 524–32. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2011.01.007>.
- Stellar, E. 1954. “The Physiology of Motivation.” *Psychological Review* 61 (1): 5–22.
- Suzuki, Keisuke, Channa N. Jayasena, and Stephen R. Bloom. 2011. “The Gut Hormones in Appetite Regulation.” *Journal of Obesity* 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/528401>.
- Takagi, Kuniko, Romain Legrand, Akihiro Asakawa, Haruka Amitani, Marie François, Naouel Tennoune, Moïse Coëffier, et al. 2013. “Anti-Ghrelin Immunoglobulins Modulate Ghrelin Stability and Its Orexigenic Effect in Obese Mice and Humans.” *Nature Communications* 4 (October): 2685. <https://doi.org/10.1038/ncomms3685>.
- Takai, Shingo, Keiko Yasumatsu, Mayuko Inoue, Shusuke Iwata, Ryusuke Yoshida, Noriatsu Shigemura, Yuchio Yanagawa, Daniel J. Drucker, Robert F. Margolskee, and Yuzo Ninomiya. 2015. “Glucagon-like Peptide-1 Is Specifically Involved in Sweet Taste Transmission.” *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 29 (6): 2268–80. <https://doi.org/10.1096/fj.14-265355>.
- Tang, Jason E., Daniel R. Moore, Gregory W. Kujbida, Mark A. Tarnopolsky, and Stuart M. Phillips. 2009. “Ingestion of Whey Hydrolysate, Casein, or Soy Protein Isolate: Effects on Mixed Muscle Protein Synthesis at Rest and Following Resistance Exercise in Young Men.” *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 107 (3): 987–92. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00076.2009>.
- Tannous dit El Khoury, Dalia, Omar Obeid, Sami T. Azar, and Nahla Hwalla. 2006. “Variations in Postprandial Ghrelin Status Following Ingestion of High-Carbohydrate, High-Fat, and High-Protein Meals in Males.” *Annals of Nutrition & Metabolism* 50 (3): 260–69. <https://doi.org/10.1159/000091684>.
- Tappy, L. 1996. “Thermic Effect of Food and Sympathetic Nervous System Activity in Humans.” *Reproduction, Nutrition, Development* 36 (4): 391–97.
- Tatemoto, K. 1982a. “Isolation and Characterization of Peptide YY (PYY), a Candidate Gut Hormone That Inhibits Pancreatic Exocrine Secretion.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (8): 2514–18.
- Tatemoto, K. 1982b. “Neuropeptide Y: Complete Amino Acid Sequence of the Brain Peptide.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79 (18): 5485–89. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.18.5485>.
- Teixeira, Tatiana F. S., Maria Carmen Collado, Célia L. L. F. Ferreira, Josefina Bressan, and Maria do Carmo G. Peluzio. 2012. “Potential Mechanisms for the Emerging Link between Obesity and Increased Intestinal Permeability.” *Nutrition Research* 32 (9): 637–47. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.07.003>.

- Tennoune, N., P. Chan, J. Breton, R. Legrand, Y. N. Chabane, K. Akkermann, A. Järv, et al. 2014. "Bacterial ClpB Heat-Shock Protein, an Antigen-Mimetic of the Anorexigenic Peptide α -MSH, at the Origin of Eating Disorders." *Translational Psychiatry* 4 (October): e458. <https://doi.org/10.1038/tp.2014.98>.
- Ter Horst, G. J., P. de Boer, P. G. Luiten, and J. D. van Willigen. 1989. "Ascending Projections from the Solitary Tract Nucleus to the Hypothalamus. A Phaseolus Vulgaris Lectin Tracing Study in the Rat." *Neuroscience* 31 (3): 785–97. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90441-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90441-7).
- Terashi, Mutsumi, Akihiro Asakawa, Toshiro Harada, Miharu Ushikai, Quentin Coquerel, Maria Hamze Sinno, Pierre Déchelotte, Akio Inui, and Sergueï O. Fetissof. 2011. "Ghrelin Reactive Autoantibodies in Restrictive Anorexia Nervosa." *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 27 (4): 407–13. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.01.002>.
- Tremaroli, Valentina, Fredrik Karlsson, Malin Werling, Marcus Ståhlman, Petia Kovatcheva-Datchary, Torsten Olbers, Lars Fändriks, Carel W. le Roux, Jens Nielsen, and Fredrik Bäckhed. 2015. "Roux-En-Y Gastric Bypass and Vertical Banded Gastroplasty Induce Long-Term Changes on the Human Gut Microbiome Contributing to Fat Mass Regulation." *Cell Metabolism* 22 (2): 228–38. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.07.009>.
- Tschöp, M., D. L. Smiley, and M. L. Heiman. 2000. "Ghrelin Induces Adiposity in Rodents." *Nature* 407 (6806): 908–13. <https://doi.org/10.1038/35038090>.
- Tschöp, M., C. Weyer, P. A. Tataranni, V. Devanarayan, E. Ravussin, and M. L. Heiman. 2001. "Circulating Ghrelin Levels Are Decreased in Human Obesity." *Diabetes* 50 (4): 707–9. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.4.707>.
- Turton, M. D., D. O'Shea, I. Gunn, S. A. Beak, C. M. Edwards, K. Meeran, S. J. Choi, et al. 1996. "A Role for Glucagon-like Peptide-1 in the Central Regulation of Feeding." *Nature* 379 (6560): 69–72. <https://doi.org/10.1038/379069a0>.
- Uhe, A. M., G. I. Szmukler, G. R. Collier, J. Hansky, K. O'Dea, and G. P. Young. 1992. "Potential Regulators of Feeding Behavior in Anorexia Nervosa." *The American Journal of Clinical Nutrition* 55 (1): 28–32. <https://doi.org/10.1093/ajcn/55.1.28>.
- Unger, Thaddeus J., German A. Calderon, Leila C. Bradley, Miguel Sena-Esteves, and Maribel Rios. 2007. "Selective Deletion of Bdnf in the Ventromedial and Dorsomedial Hypothalamus of Adult Mice Results in Hyperphagic Behavior and Obesity." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (52): 14265–74. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3308-07.2007>.
- Valassi, Elena, Massimo Scacchi, and Francesco Cavagnini. 2008. "Neuroendocrine Control of Food Intake." *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD* 18 (2): 158–68. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2007.06.004>.

- Van Heek, M., D. S. Compton, C. F. France, R. P. Tedesco, A. B. Fawzi, M. P. Graziano, E. J. Sybertz, C. D. Strader, and H. R. Davis. 1997. "Diet-Induced Obese Mice Develop Peripheral, but Not Central, Resistance to Leptin." *The Journal of Clinical Investigation* 99 (3): 385–90. <https://doi.org/10.1172/JCI119171>.
- Varela, Luis, and Tamas L Horvath. 2012. "Leptin and Insulin Pathways in POMC and AgRP Neurons That Modulate Energy Balance and Glucose Homeostasis." *EMBO Reports* 13 (12): 1079–86. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.174>.
- Verdich, C., A. Flint, J. P. Gutzwiller, E. Näslund, C. Beglinger, P. M. Hellström, S. J. Long, L. M. Morgan, J. J. Holst, and A. Astrup. 2001. "A Meta-Analysis of the Effect of Glucagon-like Peptide-1 (7-36) Amide on Ad Libitum Energy Intake in Humans." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86 (9): 4382–89. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.9.7877>.
- Vettor, R., R. Fabris, C. Pagano, and G. Federspil. 2002. "Neuroendocrine Regulation of Eating Behavior." *Journal of Endocrinological Investigation* 25 (10): 836–54. <https://doi.org/10.1007/BF03344047>.
- Vrang, Niels, Philip J. Larsen, Jes T. Clausen, and Peter Kristensen. 1999. "Neurochemical Characterization of Hypothalamic Cocaine—Amphetamine-Regulated Transcript Neurons." *Journal of Neuroscience* 19 (10): RC5–RC5. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-10-j0006.1999>.
- Wang, Chuanfeng, Eric Bomberg, Charles J. Billington, Allen S. Levine, and Catherine M. Kotz. 2010. "Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in the Hypothalamic Ventromedial Nucleus Increases Energy Expenditure." *Brain Research* 1336 (June): 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.04.013>.
- Wang, ChuanFeng, Eric Bomberg, Charles Billington, Allen Levine, and Catherine M. Kotz. 2007. "Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus Increases Energy Expenditure by Elevating Metabolic Rate." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 293 (3): R992-1002. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00516.2006>.
- Wang, Youfa, May A. Beydoun, Lan Liang, Benjamin Caballero, and Shiriki K. Kumanyika. 2008. "Will All Americans Become Overweight or Obese? Estimating the Progression and Cost of the US Obesity Epidemic." *Obesity (Silver Spring, Md.)* 16 (10): 2323–30. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.351>.
- Wang, Yu, Rashmi Chandra, Leigh Ann Samsa, Barry Gooch, Brian E. Fee, J. Michael Cook, Steven R. Vigna, Augustus O. Grant, and Rodger A. Liddle. 2011. "Amino Acids Stimulate Cholecystokinin Release through the Ca²⁺-Sensing Receptor." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 300 (4): G528-537. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00387.2010>.

- Wank, S. A. 1995. "Cholecystokinin Receptors." *The American Journal of Physiology* 269 (5 Pt 1): G628-646. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1995.269.5.G628>.
- Weibezahn, Jimena, Peter Tessarz, Christian Schlieker, Regina Zahn, Zeljka Maglica, Sukyeong Lee, Hanswalter Zentgraf, et al. 2004. "Thermotolerance Requires Refolding of Aggregated Proteins by Substrate Translocation through the Central Pore of ClpB." *Cell* 119 (5): 653–65. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.027>.
- Westermarck, P., C. Wernstedt, E. Wilander, and K. Sletten. 1986. "A Novel Peptide in the Calcitonin Gene Related Peptide Family as an Amyloid Fibril Protein in the Endocrine Pancreas." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 140 (3): 827–31. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(86\)90708-4](https://doi.org/10.1016/0006-291x(86)90708-4).
- Westerterp-Plantenga, M. S., M. P. G. M. Lejeune, I. Nijs, M. van Ooijen, and E. M. R. Kovacs. 2004. "High Protein Intake Sustains Weight Maintenance after Body Weight Loss in Humans." *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 28 (1): 57–64. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802461>.
- Weymar, Mathias, and Lars Schwabe. 2016. "Amygdala and Emotion: The Bright Side of It." *Frontiers in Neuroscience* 10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00224>.
- Williams, Kevin W., Lisandra O. Margatho, Charlotte E. Lee, Michelle Choi, Syann Lee, Michael M. Scott, Carol F. Elias, and Joel K. Elmquist. 2010. "Segregation of Acute Leptin and Insulin Effects in Distinct Populations of Arcuate Proopiomelanocortin Neurons." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (7): 2472–79. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3118-09.2010>.
- Wischmeyer, Paul E. 2002. "Glutamine and Heat Shock Protein Expression." *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 18 (3): 225–28.
- Wise, Roy A. 2006. "Role of Brain Dopamine in Food Reward and Reinforcement." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 361 (1471): 1149–58. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1854>.
- Woodend, D. M., and G. H. Anderson. 2001. "Effect of Sucrose and Safflower Oil Preloads on Short Term Appetite and Food Intake of Young Men." *Appetite* 37 (3): 185–95. <https://doi.org/10.1006/appe.2001.0425>.
- Wortmann, Saskia B., Ron A. Wevers, and Arjan PM de Brouwer. 1993. "CLPB Deficiency." In *GeneReviews*[®], edited by Margaret P. Adam, Holly H. Ardinger, Roberta A. Pagon, Stephanie E. Wallace, Lora JH Bean, Karen Stephens, and Anne Amemiya. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK396257/>.
- Wren, A. M., L. J. Seal, M. A. Cohen, A. E. Brynes, G. S. Frost, K. G. Murphy, W. S. Dhillo, M. A. Ghatei, and S. R. Bloom. 2001. "Ghrelin Enhances Appetite and Increases Food Intake in Humans." *The*

- Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86 (12): 5992.
<https://doi.org/10.1210/jcem.86.12.8111>.
- Wren, A. M., C. J. Small, C. R. Abbott, W. S. Dhillon, L. J. Seal, M. A. Cohen, R. L. Batterham, et al. 2001. "Ghrelin Causes Hyperphagia and Obesity in Rats." *Diabetes* 50 (11): 2540–47.
<https://doi.org/10.2337/diabetes.50.11.2540>.
- Wu, Gary D., Jun Chen, Christian Hoffmann, Kyle Bittinger, Ying-Yu Chen, Sue A. Keilbaugh, Meenakshi Bewtra, et al. 2011. "Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes." *Science (New York, N.Y.)* 334 (6052): 105–8. <https://doi.org/10.1126/science.1208344>.
- Wynne, K., A. J. Park, C. J. Small, K. Meeran, M. A. Ghatei, G. S. Frost, and S. R. Bloom. 2006. "Oxyntomodulin Increases Energy Expenditure in Addition to Decreasing Energy Intake in Overweight and Obese Humans: A Randomised Controlled Trial." *International Journal of Obesity (2005)* 30 (12): 1729–36. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803344>.
- Wytenbach, Andreas, and André Patrick Arrigo. 2013. *The Role of Heat Shock Proteins during Neurodegeneration in Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's Disease*. Landes Bioscience.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6495/>.
- Xu, Z., A. L. Horwich, and P. B. Sigler. 1997. "The Crystal Structure of the Asymmetric GroEL-GroES-(ADP)7 Chaperonin Complex." *Nature* 388 (6644): 741–50. <https://doi.org/10.1038/41944>.
- Yang, Jing, Michael S. Brown, Guosheng Liang, Nick V. Grishin, and Joseph L. Goldstein. 2008. "Identification of the Acyltransferase That Octanoylates Ghrelin, an Appetite-Stimulating Peptide Hormone." *Cell* 132 (3): 387–96. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.017>.
- Yang, Y. K., D. A. Thompson, C. J. Dickinson, J. Wilken, G. S. Barsh, S. B. Kent, and I. Gantz. 1999. "Characterization of Agouti-Related Protein Binding to Melanocortin Receptors." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 13 (1): 148–55. <https://doi.org/10.1210/mend.13.1.0223>.
- Yaswen, L., N. Diehl, M. B. Brennan, and U. Hochgeschwender. 1999. "Obesity in the Mouse Model of Pro-Opiomelanocortin Deficiency Responds to Peripheral Melanocortin." *Nature Medicine* 5 (9): 1066–70. <https://doi.org/10.1038/12506>.
- Yeo, G. S., I. S. Farooqi, S. Aminian, D. J. Halsall, R. G. Stanhope, and S. O'Rahilly. 1998. "A Frameshift Mutation in MC4R Associated with Dominantly Inherited Human Obesity." *Nature Genetics* 20 (2): 111–12. <https://doi.org/10.1038/2404>.
- Yoshimichi, G., H. Yoshimatsu, T. Masaki, and T. Sakata. 2001. "Orexin-A Regulates Body Temperature in Coordination with Arousal Status." *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 226 (5): 468–76. <https://doi.org/10.1177/153537020122600513>.
- Young, A. A., B. Gjedlin, W. Vine, A. Percy, and T. J. Rink. 1995. "Gastric Emptying Is Accelerated in Diabetic BB Rats and Is Slowed by Subcutaneous Injections of Amylin." *Diabetologia* 38 (6): 642–48. <https://doi.org/10.1007/BF00401833>.

- Yu, Ji Hee, and Min-Seon Kim. 2012. "Molecular Mechanisms of Appetite Regulation." *Diabetes & Metabolism Journal* 36 (6): 391–98. <https://doi.org/10.4093/dmj.2012.36.6.391>.
- Zhan, Cheng, Jingfeng Zhou, Qiru Feng, Ju-En Zhang, Shuailiang Lin, Junhong Bao, Ping Wu, and Minmin Luo. 2013. "Acute and Long-Term Suppression of Feeding Behavior by POMC Neurons in the Brainstem and Hypothalamus, Respectively." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33 (8): 3624–32. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2742-12.2013>.
- Zhang, Xiaoqing, Guo Zhang, Hai Zhang, Michael Karin, Hua Bai, and Dongsheng Cai. 2008. "Hypothalamic IKKbeta/NF-KappaB and ER Stress Link Overnutrition to Energy Imbalance and Obesity." *Cell* 135 (1): 61–73. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.043>.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, and J. M. Friedman. 1994. "Positional Cloning of the Mouse Obese Gene and Its Human Homologue." *Nature* 372 (6505): 425–32. <https://doi.org/10.1038/372425a0>.
- Zheng, Ye, Jeffrey S. Scow, Judith A. Duenes, and Michael G. Sarr. 2012. "Mechanisms of Glucose Uptake in Intestinal Cell Lines: Role of GLUT2." *Surgery* 151 (1): 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2011.07.010>.
- Zhu, Guangjing, Jianqun Yan, Wanli W. Smith, Timothy H. Moran, and Sheng Bi. 2012. "Roles of Dorsomedial Hypothalamic Cholecystokinin Signaling in the Controls of Meal Patterns and Glucose Homeostasis." *Physiology & Behavior* 105 (2): 234–41. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.08.007>.
- Zietkiewicz, Szymon, Agnieszka Lewandowska, Pawel Stocki, and Krzysztof Liberek. 2006. "Hsp70 Chaperone Machine Remodels Protein Aggregates at the Initial Step of Hsp70-Hsp100-Dependent Disaggregation." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (11): 7022–29. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507893200>.
- Zipf, W. B., T. M. O'Dorisio, S. Cataland, and J. Sotos. 1981. "Blunted Pancreatic Polypeptide Responses in Children with Obesity of Prader-Willi Syndrome." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 52 (6): 1264–66. <https://doi.org/10.1210/jcem-52-6-1264>.
- Ziv, E., and M. Bendayan. 2000. "Intestinal Absorption of Peptides through the Enterocytes." *Microscopy Research and Technique* 49 (4): 346–52. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(20000515\)49:4<346::AID-JEMT3>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(20000515)49:4<346::AID-JEMT3>3.0.CO;2-B).
- Zolkiewski, M. 1999. "ClpB Cooperates with DnaK, DnaJ, and GrpE in Suppressing Protein Aggregation. A Novel Multi-Chaperone System from Escherichia Coli." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (40): 28083–86. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.40.28083>.

Zolkiewski, Michal. 2006. "A Camel Passes through the Eye of a Needle: Protein Unfolding Activity of Clp ATPases." *Molecular Microbiology* 61 (5): 1094–1100. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05309.x>.

ANNEXES

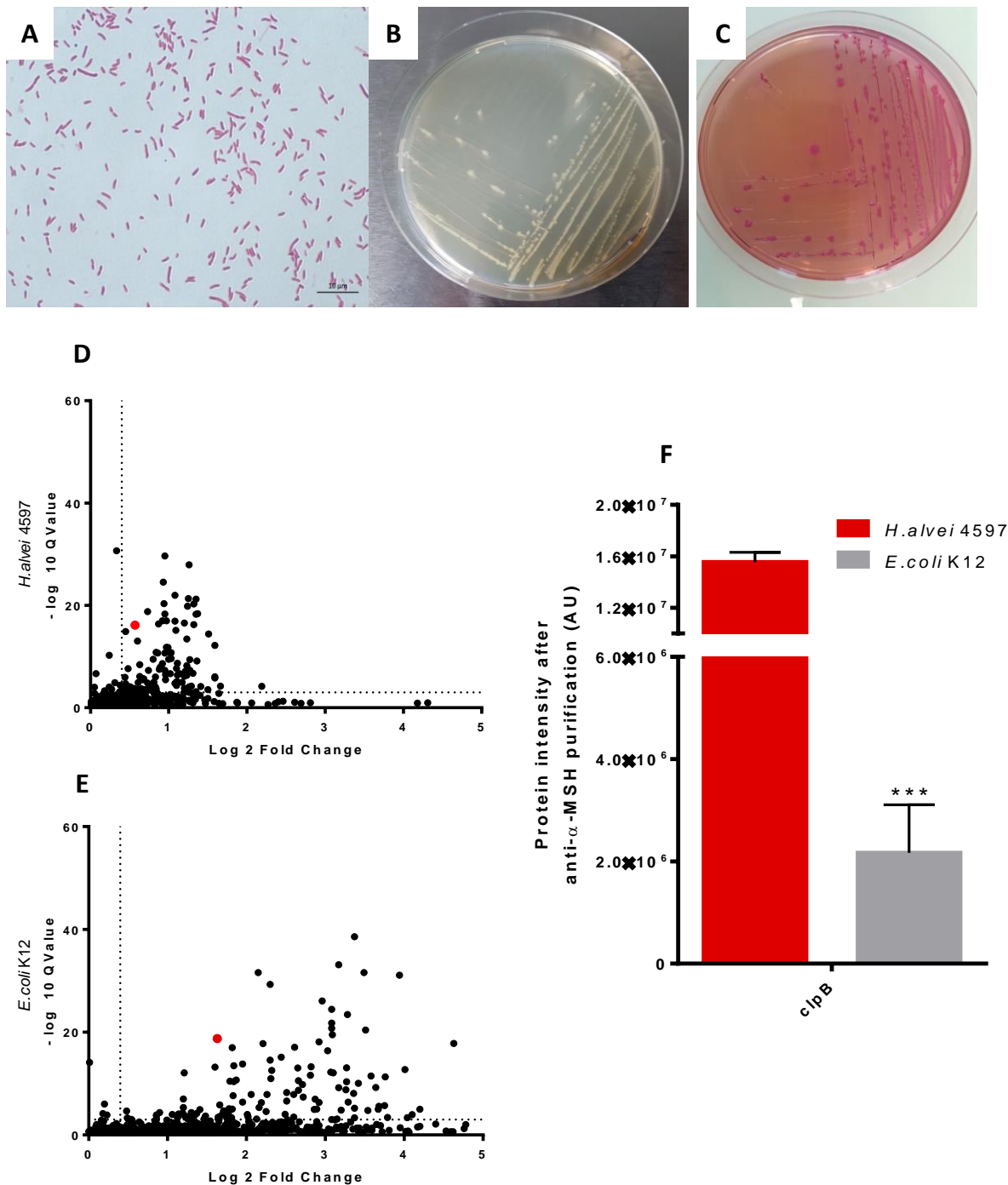


Figure 32. Caractérisation de la souche *H. alvei* et identification de la protéine ClpB par spectrométrie de masse.

(A) Coloration de Gram de la souche *H. alvei*. (B, C) Photo de la souche *H. alvei* cultivée sur (B) du milieu LB ou (C) VGRB (spécifique des Entérobactéries). (D,E) Identification des protéines présentes chez *E. coli* et *H. alvei* par spectrométrie de masse. La protéine ClpB est indiquée par un point de couleur rouge. (F) Comparaison de l'intensité de la protéine ClpB après purification avec l'anticorps anti- α -MSH

Issu de résultats non publiés générés par la société Biognosys (Suisse)

ClpB : Caseinolytic peptidase B; α -MSH : α -melanocyte stimulating hormone; *E. coli* : *Escherichia coli*; *H. alvei* : *Hafnia alvei*

Découverte, par le biologiste Danois Vagn Møller en 1954, la bactérie *Hafnia alvei* (*H. alvei*), est une bactérie Gram négative (Figure 32A), appartenant comme *E. coli* à la famille des *Enterobacteriaceae* (Figure 32B,C). Cette bactérie est une bactérie commensale du tractus gastro-intestinal humain et elle est connue pour son rôle de ferment lactique dans l'industrie laitière (Møller 1954).

Des études externalisées réalisées par la société Biognosys situées en Suisse ont permis de confirmer que cette bactérie était capable comme *E. coli* de produire la protéine ClpB mais à une concentration supérieure à celle d'*E. coli* : $2,166 \cdot 10^8$ AU contre $1,55 \cdot 10^7$ AU (Figure 32F).

De ce fait, la société TargEDys s'est donc intéressée à cette bactérie comme un probiotique potentiel pour le contrôle de l'appétit et du poids corporel chez les personnes en surpoids ou obèses. Pour cela, des études d'optimisation ont été réalisées afin de produire une souche dont la concentration est stable et contrôlée. Cette souche a été nommée « *H. alvei* 4597 ».

Les deux études ci-dessous se sont intéressées à confirmer le potentiel anorexigène de bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* qui produisent la protéine ClpB, et par conséquent de tester la souche *H. alvei* comme potentiel probiotique « anti-obésité ».

ANNEXE 1. MANUSCRIT ARTICLE

La bactérie commensale *Hafnia alvei* réduit la prise alimentaire et la masse grasse chez des souris obèses – un nouveau probiotique potentiel pour la régulation de l'appétit et du poids corporel

Commensal Hafnia alvei reduces food intake and fat mass in obese mice – a new potential for appetite and body weight

Romain Legrand^{1†}, Nicolas Lucas^{1†}, Manon Dominique^{1,2,3}, Saida Azhar¹, Camille Deroissart^{1,2,3}, Marie-Anne Le Solliec^{1,2,3}, Julie Rondeaux^{1,2,3}, Séverine Nobis^{2,3}, Charlène Guérin^{2,3}, Fatima Léon^{3,4}, Jean-Claude do Rego^{3,4}, Nicolas Pons⁷, Emmanuelle Le Chatelier⁷, S. Dusko Ehrlich⁷, Gregory Lambert¹, Pierre Déchelotte^{1,2,3,5*}, Sergueï O. Fetissov^{1,2,3,6*}

¹TargEDys SA, University of Rouen, 76183 Rouen, France;

²Inserm UMR1073, Nutrition, Gut and Brain Laboratory, 76183 Rouen, France;

³Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), University of Rouen Normandy, 76183 Rouen, France;

⁴Animal Behavioral Platform SCAC, University of Rouen Normandy, 76183 Rouen, France;

⁵Rouen University Hospital, CHU Charles-Nicolle, 76183 Rouen, France;

⁶Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication, Inserm UMR1239, Mont-Saint-Aignan, France;

⁷MGP MetaGénoPolis, INRA, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy en Josas, France.

Soumis dans *International Journal of Obesity* en Mai 2019

RESUME

Contexte : Compte tenu de l'identification récente de la *Caseinolytic peptidase B* (ClpB), une protéine de choc thermique d'*E. coli*, comme mimétique de l' α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH), l'objectif de cette étude a été de valider la souche *Hafnia alvei*, comme une souche productrice de la protéine ClpB. Cette bactérie est une bactérie commensale du tractus gastro intestinal et appartient à l'ordre des Enterobacteriales comme *E. coli*. De part ces éléments, cette souche pourrait être utilisée en tant probiotique pour agir sur le contrôle de l'appétit et du poids corporel dans les cas de surpoids et d'obésité.

Matériels et Méthodes : Les effets anorexigènes de la protéine ClpB ont été étudiée avec la souche *E. coli* déficiente en protéine ClpB (*E. coli* Δ ClpB). Une souche alimentaire *H. alvei* 4597 synthétisant la protéine ClpB et contenant le mimétisme moléculaire avec l' α -MSH a été sélectionnée pour tester son effet de probiotique chez des souris génétiquement obèses (*ob/ob*) ou nourries avec un régime riche en lipides (*High Fat Diet*, HFD)). La pertinence du gène ClpB spécifique de la famille des

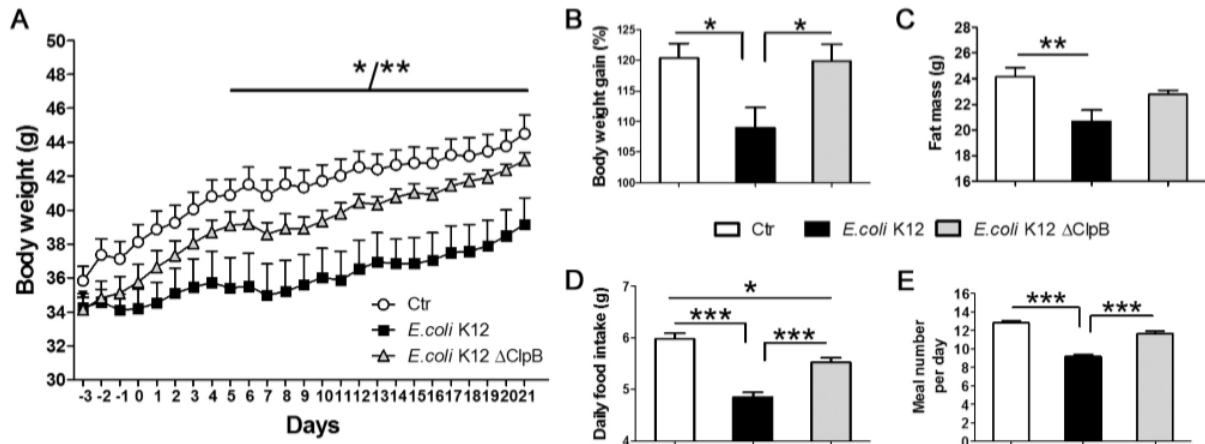


Figure 1. Effects of *E. coli* K12 native and ClpB-deficient strains in *ob/ob* mice.

A. Body weight dynamics. B. Body weight gain (%). C. Total fat mass. D. Daily food intake. E. Daily meal number. A. 2-Way RM ANOVA $p < 0.01$, Bonferroni post-tests $**p < 0.01$ for days 6,8,11 and 12, other days $*p < 0.05$. B. ANOVA $p < 0.05$, Tukey's post-tests $*p < 0.05$. C. ANOVA $p < 0.01$, Tukey's post-tests $**p < 0.01$. D. ANOVA $p < 0.0001$, Tukey's post-tests $***p < 0.001$, $*p < 0.05$. E. Kruskal-Wallis $p < 0.0001$, Dunn's post-tests $***p < 0.001$.

```

α-MSH          1 - S Y S M E H F - R W - G K P V          - 13
ClpB H. alvei 534 - V E I A E V L A R W T G I P V S R - 550
ClpB E. coli  534 - A E I A E V L A R W T G I P V S R - 550

```

Figure 2. Proteomic analysis of *H. alvei* 4597 for α -MSH-mimetic proteins.

Amino acid sequence alignment between the α -MSH peptide and the ClpB proteins from *H. alvei* and *E. coli*. Stars indicate identical amino acids, periods indicate weak similarity < 0.5 of Gonnet PAM250 Matrix used in the EMBOS Stretcher program (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>).

Enterobacterales pour l'obésité humaine a été étudiée par une analyse *in silico* des métagénomés fécaux de 569 individus sains issus de la base de données « MetaHIT ».

Résultats : L'administration *per os* chronique de la souche *E. coli* WT, donc productrice de la ClpB, a réduit le gain de poids corporel ($p < 0,05$) et la fréquence des repas quotidiens ($p < 0,001$) chez les souris *ob/ob*. Le gavage par voie orale d'*H. alvei* pendant 18 et 46 jours a réduit le gain de poids corporel et la masse grasse chez des souris obèses *ob/ob* ou nourris avec le régime HFD ($p < 0,05$) avec une diminution significative de la prise alimentaire chez les souris hyperphages *ob/ob* ($p < 0,001$). Des taux élevés de l'hormone-sensitive lipase (HSL) dans les tissus adipeux ($p < 0,01$) et de l'ADN de ClpB fécal ($p < 0,05$) ou de ClpB plasmatique ($p < 0,001$) ont été détectés chez les souris *ob/ob* traitées avec *H. alvei*. La présence du gène de ClpB spécifique des Enterobacterales était plus faible chez les humains obèses que chez les humains non obèses ($p < 0,0001$) et été corrélée négativement avec l'IMC des genres d'Enterobacter, Klebsiella et Hafnia.

Conclusion : La souche *H. alvei* 4597 réduit l'apport alimentaire, le poids corporel et la prise de masse grasse chez les souris hyperphagiques et obèses. Ces données, combinées à une faible abondance du gène ClpB spécifique des Enterobacterales au sein du microbiote d'humains atteint d'obésité, justifient l'utilisation d'*H. alvei* en tant que probiotique pour la régulation de l'appétit et du poids corporel dans les cas de surpoids et d'obésité.

ABSTRACT

Background/Objectives: Based on the recent identification of *E. coli* heat shock protein ClpB as a mimetic of the anorexigenic α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), the objective of this study was to preclinically validate *Hafnia alvei*, a ClpB-producing commensal bacterium from the same with *E. coli* order of Enterobacterales as a potential probiotic for appetite and body weight management in overweight and obesity.

Methods: The involvement of enterobacterial ClpB in the putative anti-obesity effects was studied using ClpB-deficient *E. coli* (Figure 1). A food-grade *H. alvei* 4597 strain synthesizing the ClpB protein with an α -MSH-like motif (Figure 2) was selected as a candidate probiotic to be tested in *ob/ob* and high-fat diet (HFD)-fed obese mice. The relevance of the enterobacterial ClpB gene to human obesity was studied by *in silico* analysis of fecal metagenomes of 569 healthy individuals from the "MetaHIT" database.

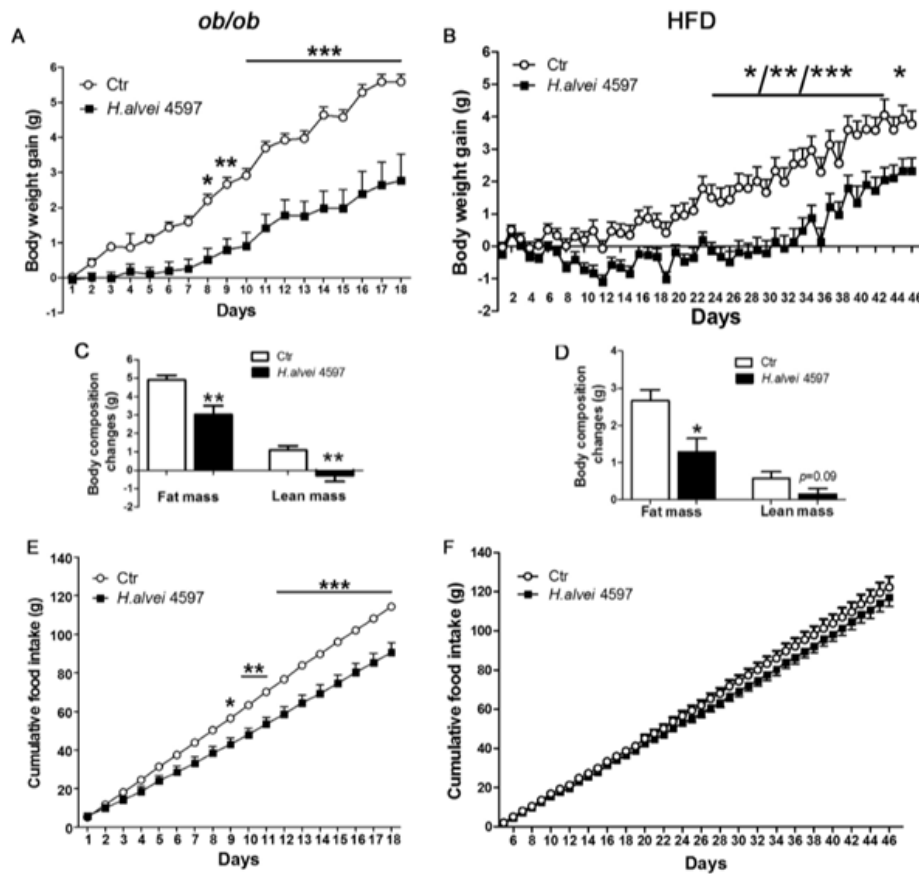


Figure 3. Effects of *H. alvei* 4597 in *ob/ob* and HFD-fed obese mice on body weight, body composition and food intake.

Body weight dynamics in *ob/ob* (A) and in HFD-fed obese mice (B). Total fat and lean tissue mass in *ob/ob* (C) and in HFD-fed obese mice (D). Cumulative food intake in *ob/ob* (E) and in HFD-fed obese mice (F). 2-way RM ANOVA, A,B, $p < 0.001$, E, $p < 0.05$, Bonferroni post-tests, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, in B, *for days 23-25, 38,41 and 47, **for days 26, 27, 30, 37, 39, 42 and 43, ***for days 28, 29, 31-36 and 40. C,D, Mann-Whitney tests, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

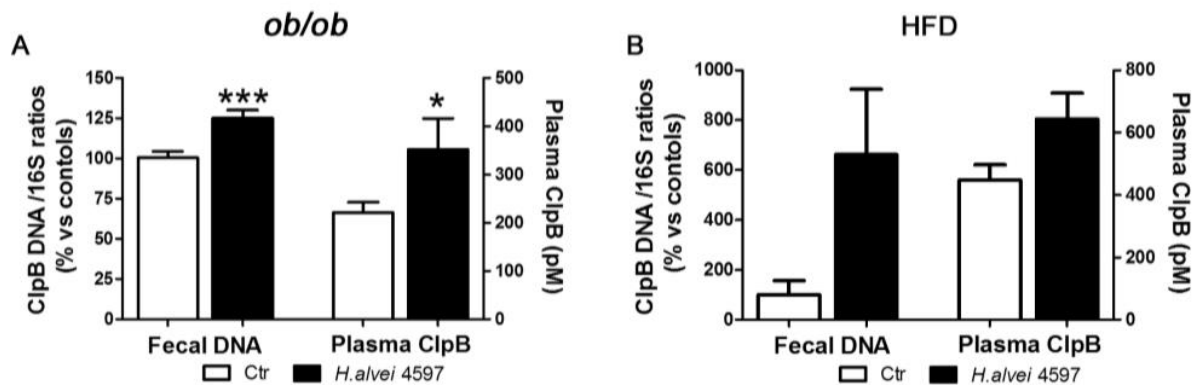


Figure 4. Effects of *H. alvei* 4597 in *ob/ob* and HFD-fed obese mice on ClpB production

Levels of ClpB DNA in colonic feces and of ClpB protein in plasma of *ob/ob* (A) and of HFD-fed obese mice (B). A. Fecal DNA, Student's t-test *** $p < 0.001$.

Results: Chronic *per os* administration of native but not ClpB-deficient *E. coli* strain reduced body weight gain ($p < 0.05$) (Figure 3A,B) and daily meal frequency ($p < 0.001$) in *ob/ob* mice. Oral gavage of *H. alvei* for 18 and 46 days in *ob/ob* and HFD-fed obese mice, respectively, was well tolerated, reduced body weight gain and fat mass in both obesity models ($p < 0.05$) (Figure 3C,D) and decreased food intake in hyperphagic *ob/ob* mice ($p < 0.001$) (Figure 3E,F). Elevated fat tissue levels of phosphorylated hormone-sensitive lipase ($p < 0.01$) and ClpB DNA in faeces ($p < 0.001$) (Figure 4A) or plasma ClpB ($p < 0.05$) (Figure 4B). were detected in *H. alvei*-treated *ob/ob* mice. Enterobacterial ClpB gene richness was lower in obese vs. non-obese humans ($p < 0.0001$) and correlated negatively with BMI in genera of *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Hafnia*.

Conclusions: *H. alvei* 4597 strain reduces food intake, body weight and fat mass gain in hyperphagic and obese mice. These data combined with low enterobacterial ClpB gene abundance in the microbiota of obese humans provide the rationale for using *H. alvei* as a probiotic for appetite and body weight management in overweight and obesity.

Keywords: *H. alvei* 4597, gut microbiota, obesity, overweight, appetite, ClpB, α -MSH

ANNEXE 2. MANUSCRIT ARTICLE

La souche *Hafnia alvei* 4597 réduit la prise de poids et améliore la composition corporelle, le métabolisme du glucose et des lipides dans un modèle murin d'obésité hyperphage*Hafnia alvei* 4597 strain reduces body weight gain and improves body composition, glucose and lipid metabolism in a mouse model of hyperphagic obesityNicolas Lucas¹, Romain Legrand¹, Camille Deroissart^{1,2,3}, Manon Dominique^{1,2,3}, Saïda Azhar¹, Marie-Anne Le Solliec^{1,2,3}, Fatima Léon^{3,4}, Jean-Claude do Rego^{3,4}, Pierre Déchelotte^{1,2,3,5}, Sergueï Fetissof^{1,3,6}, Grégory Lambert¹¹ TargEDys SA, University of Rouen Normandy, 22, Boulevard Gambetta, Rouen, 76183, Cedex 1, France;² Inserm UMR1073, Nutrition, Gut and Brain Laboratory, 76183 Rouen, France;³ Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), University of Rouen Normandy, Rouen, 76183, France;⁴ Animal Behavioral Platform, SCAC, University of Rouen Normandy, 76183 Rouen, France;⁵ Rouen University Hospital, CHU Charles Nicolle, 76183 Rouen, France ;⁶ Inserm UMR1239, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication, University of Rouen Normandy, Mont-Saint-Aignan, 76130, France.En cours de soumission dans *Microorganisms* en Septembre 2019**RESUME**

Contexte et but de l'étude : L'utilisation de probiotique de nouvelles générations peut devenir une nouvelle stratégie de prévention et de traitement de l'obésité. L'objectif de cette étude était de tester l'efficacité d'une nouvelle souche de probiotique, la bactérie *H. alvei* 4597 dans un modèle murin d'obésité caractérisée à la fois par une hyperphagie et une obésité induite par le régime alimentaire (*diet induced-obesity*, DIO).

Matériels et Méthodes : Pour cela, les souris hyperphages *ob/ob* ont été soumises à un régime riche en graisses, puis une partie de ces souris ont reçu un traitement quotidien avec $1,4 \times 10^{10}$ UFC d'*H. alvei* 4597 pendant 38 jours (groupe DIO). L'autre partie de ces souris a reçu un véhicule. Un groupe de souris *ob/ob* non traitées a reçu un régime alimentaire standard tout au long de l'expérience.

Résultats : Le groupe DIO présentait une consommation alimentaire accrue et une aggravation de l'adiposité et de la glycémie. Le traitement par *H. alvei* a été associé à une diminution du poids corporel et de la prise de masse grasse, ainsi qu'à une réduction de la prise alimentaire chez les souris habituellement nourries au régime. À la fin de l'expérience, le groupe traité avec *H. alvei* présentait une diminution de la glycémie, du cholestérol total plasmatique et de l'alanine aminotransférase.

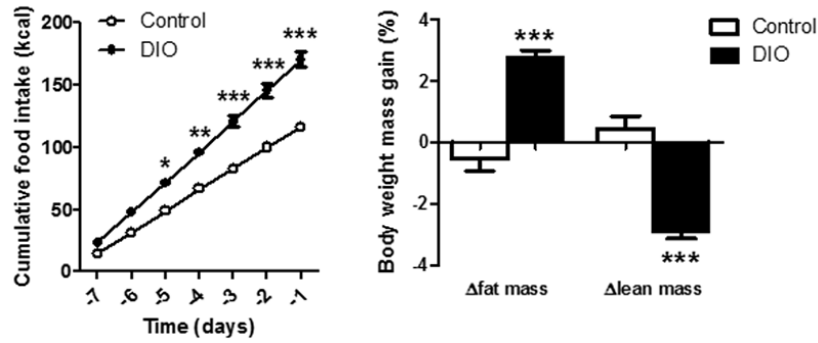


Figure 1. Induction of DIO in *ob/ob* mice.

A. Cumulative food intake during the sham-feeding period. C. Fat and lean mass gain from D-12 to D0. B, 2-way ANOVA, both $p < 0.0001$, Bonferroni's posttests $***p < 0.001$, $**p < 0.01$, $*p < 0.05$; C, Mann-Whitney tests, $***p < 0.001$.

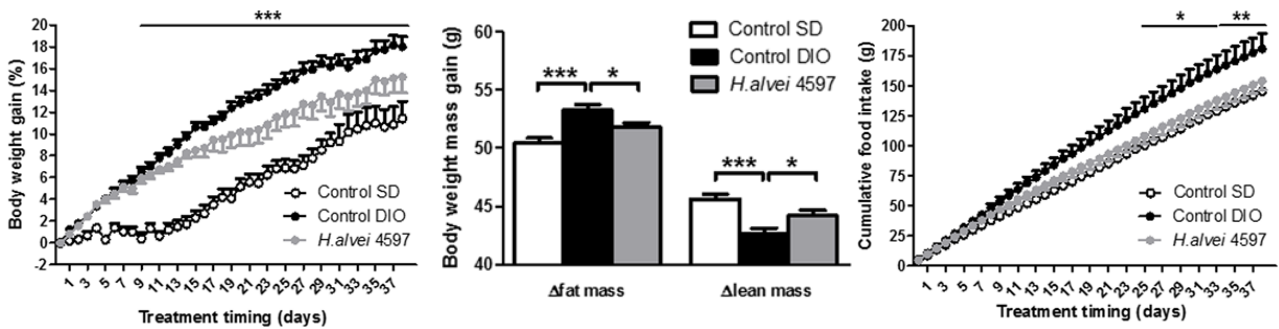


Figure 2. Effects of *H. alvei* 4597 on body weight, food intake and body composition in DIO *ob/ob* mice as compared to DIO-untreated (Ctrl DIO) and standard diet (SD)-fed *ob/ob* mice.

A. Body weight. B. Cumulative food intake. C. Fat and lean mass gain from D0 to D38. A. 2-way ANOVA, $p < 0.0001$, Bonferroni's posttests, Ctrl DIO vs. Ctrl SD, $***p < 0.001$; B. 2-way ANOVA, $p < 0.0001$, Bonferroni's posttests, Ctrl DIO vs. Ctrl SD, $**p < 0.01$, $*p < 0.05$; C. Student t-tests, $***p < 0.001$, $*p < 0.05$.

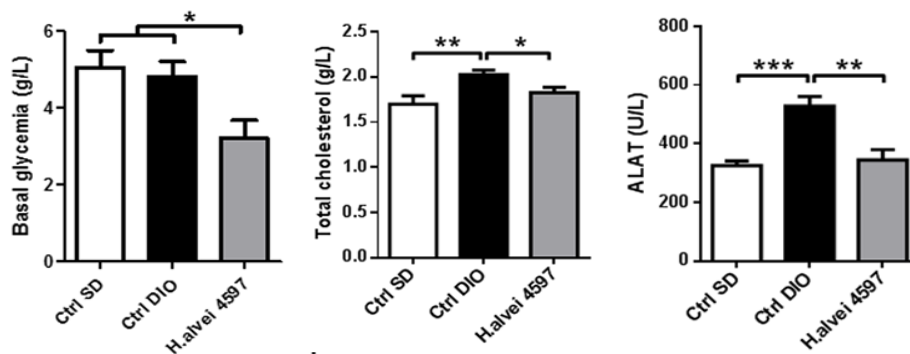


Figure 3. Effects of *H. alvei* 4597 on glycemia and obesity-related metabolic parameters in DIO *ob/ob* mice as compared to DIO-untreated (Ctrl DIO) and standard diet (SD)-fed *ob/ob* mice at the end of the treatment period D38.

A. Plasma glucose levels after overnight fasting and (B) ad libitum-fed conditions. Plasma levels of (C) triglycerides, (D) total cholesterol, (E) pancreatic lipase and (F) alanine aminotransferase (ALAT). Mann-Whitney test or (check original stats) Student's t-test, $***p < 0.001$, $**p < 0.01$, $*p < 0.05$.

Conclusion : Ces résultats confirment l'efficacité « anti-obésité » de la souche *H. alvei* 4597 chez des souris obèses caractérisées par une hyperphagie et des aggravations de l'adiposité ainsi que sur les paramètres métaboliques liés à l'obésité.

ABSTRACT

Use of new generation probiotics may become an integral part of the prevention and treatment strategies of obesity. The aim of the present study was to test the efficacy of a potential new probiotic strain of lactic bacteria *Hafnia alvei* (*H. alvei*) 4597, in a mouse model of obesity characterized by both hyperphagia and diet induced - obesity (DIO). For this purpose, the DIO was developed by high-fat diet in hyperphagic *ob/ob* mice and then a part of the DIO group received a daily treatment with 1.4×10^{10} CFU of *H. alvei* 4597 for 38 days, while the other part received a vehicle. A control untreated group of *ob/ob* mice received the standard diet throughout the experiment. The DIO group displayed increased food intake (**Figure 1A**), aggravation of adiposity (**Figure 1B**) and glycemia. The treatment with *H. alvei* was associated with decreased body weight (**Figure 2A**) and fat mass gain (**Figure 2B**) as well as with reduced food intake (**Figure 2C**) to the level of the standard diet-fed mice. At the end of experiment, the *H. alvei*-treated group showed decrease of glycemia (**Figure 3A**), plasma total cholesterol (**Figure 3B**) and alanine aminotransferase (**Figure 3C**). These results demonstrate the anti-obesity efficacy of *H. alvei* 4597 in obese mice characterized by hyperphagia and diet-induced exacerbations of adiposity and obesity-related metabolic parameters.

Keywords: obesity; food intake; microbiota; probiotics; *Hafnia alvei*; animal models.

ANNEXE 3. LISTES DES COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES

Les travaux présentés dans ce mémoire ont donné lieu aux communications orales et affichées suivantes :

COMMUNICATIONS AFFICHEES :

- ♣ Congrès **JNRB « Journées Normandes de Recherche Biomédicale »** - 20 Septembre 2018 - Rouen
 - ♣ Congrès **JFN « Journées francophones de Nutrition »** - Décembre 2018 – Nice
- « Rôle de la protéine bactérienne ClpB et d'un de ses fragments peptidiques dans la régulation de la prise alimentaire »**
-

COMMUNICATIONS ORALES :

- ♣ Congrès **JFN « Journées francophones de Nutrition »** - Décembre 2018 - Nice
- « Rôle de la protéine bactérienne ClpB et d'un de ses fragments peptidiques dans la régulation de la prise alimentaire »**
-
- ♣ Congrès **JFN « Journées francophones de Nutrition »** - Novembre 2019 - Rennes
- « Modifications des entérobactéries et de la protéine ClpB dans un modèle de restriction alimentaire chez la Souris : implications possibles pour l'étiologie et la perpétuation de l'anorexie mentale »**

POSTER 1.



Rôle de la protéine bactérienne ClpB et d'un de ses fragments peptidique dans la régulation de la prise alimentaire

Manon Dominique^{1, 2, 3}, Ilona Boulete¹, Christine Bole-Feysot^{2, 3}, Fatima Leon^{3, 4}, Jean-Claude Do Rego^{3, 4}, Sergueï O Fetissov^{1, 2, 3}, Pierre Déchelotte^{2, 3, 5}, Grégory Lambert¹, Romain Legrand¹, Nicolas Lucas¹

¹TargEDys SA, University of Rouen, 76183 Rouen, France; ²Inserm UMR1073, Nutrition, Gut and Brain Laboratory, 76183 Rouen, France; ³Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRiB), University of Rouen Normandy, Rouen, 76183, France; ⁴Animal Behavior Platform, Service Commun d'Analyse Comportementale (SCAC), University of Rouen Normandy, 76183 Rouen, France; ⁵Rouen University Hospital, CHU Charles Nicolle, Rouen, 76183, France

INTRODUCTION

L'obésité et les Troubles du Comportement Alimentaire (TCA) sont des problèmes majeurs de santé publique, dont la physiopathologie est multifactorielle. La régulation du comportement alimentaire implique des boucles neurohormonales liées à l'axe microbiote-intestin-cerveau ; une dysbiose intestinale peut donc contribuer aux modifications des signaux de faim ou de satiété. Au cours de l'anorexie mentale, une augmentation des *Enterobacteriaceae* est observée. Parmi elles, la bactérie commensale *Escherichia coli* (*E. coli*) produit une protéine présentant une séquence mimétique avec le neuropeptide anorexigène α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) : la *caseolytic protease B* (ClpB). Des études récentes ont montré que la ClpB possède un effet inhibiteur sur la prise alimentaire, pouvant être lié à l'activation de récepteurs aux mélanocortines au niveau des cellules entéroendocrines intestinales entraînant la libération de peptides satiétogènes (peptide YY, PYY et glucagon-like peptide 1, GLP-1). A l'état physiologique, elle peut être clivée en plusieurs fragments dont les effets biologiques sont méconnus.

Hypothèse : L'objectif de cette étude a été de rechercher l'impact de la protéine ClpB et de ses fragments sur le mécanisme de la signalisation de la satiété par l'intermédiaire de la libération d'hormones satiétogènes synthétisées au niveau intestinal par les cellules entéroendocrines.

MATERIALS & METHODS

1/ Culture in vitro de cellules intestinales de rats

Afin d'évaluer les effets de la protéine ClpB sur la production de PYY, une culture primaire de cellules intestinales à partir de colons et d'iléons récupérés sur des rats Sprague-Dawley a été établie. Les protéines extraites d'*E. coli* WT (produisant la ClpB) et d'*E. coli*ΔClpB (ne produisant pas la ClpB) ont été cultivées dans du milieu MH et fragmentée ou non avec 0,25% de trypsin pendant 20min à 37°C. Toutes ces conditions ainsi que plusieurs concentrations de ClpB sous sa forme totale à 1,25pM, 2,5pM, 1,25nM, 12,5nM, 25nM, 125nM ont été incubées pendant 20min à 37°C sur cette culture. Comme condition contrôlée, les cellules ont été incubées avec du PBS.

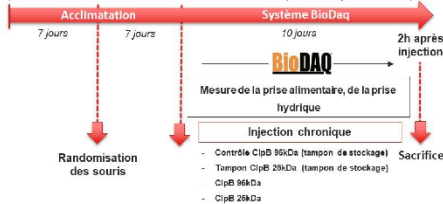
Les cellules ont été traitées avec du tampon de lyse et centrifugées (12 000g, 20min, 4°C). La sécrétion de PYY a été mesurée à l'aide du Kit Fluorescent ELISA PYY.

2/ Identification des différents fragments de la protéine ClpB au niveau intestinal

La présence des différents fragments ClpB a été révélée avec un anticorps polyclonal anti- α -MSH (1:3000) ou anti-ClpB (1:5000) dans les différents tissus intestinaux (colon, iléon, jéjunum, duodénum) chez le rat et la souris par la technique du Western-Blot.

3/ Effets in vivo de la protéine ClpB sur la prise alimentaire

L'impact de la protéine totale et de l'un de ces fragments a été mesuré sur la prise alimentaire par une étude in vivo chez des souris mâles C57Bl/6 après des injections intrapéritonéales.



RESULTS

1/ Effets de la ClpB sur la libération de PYY via une culture primaire de cellules intestinales de rats

Fig. 1 - Effets des protéines totales d'*E. coli* WT et d'*E. coli*ΔClpB avant (A) et après fragmentation (B) et de différentes concentrations croissantes de la protéine ClpB (C) sur la sécrétion de PYY par les cellules entéroendocrines

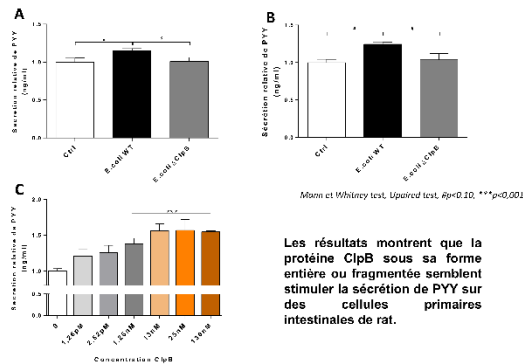
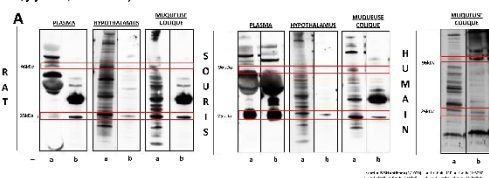


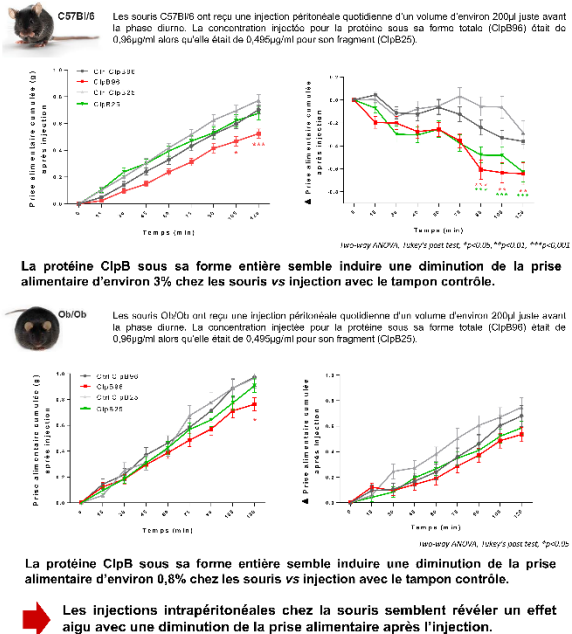
Fig. 2 - Identification des différents fragments révélés dans les différents tissus intestinaux (colon, iléon, jéjunum, duodénum) chez le rat et la souris



Un fragment à 25kDa est retrouvé au niveau plasmatique, hypothalamique et intestinale à des niveaux coliques chez les rongeurs et l'homme.

2/ Effets des injections péritonéales de la protéine ClpB sous sa forme entière ou de son fragment d'intérêt chez la souris

Fig. 3 - Effets des injections péritonéales de ClpB 96kDa et ClpB 25kDa sur la prise alimentaire chez des souris C57Bl/6



CONCLUSION

En conclusion, ce travail conforte le rôle de la protéine ClpB dans la régulation de la satiété au sein de l'axe microbiote-intestin-cerveau.

La protéine ClpB stimule positivement la production de PYY et son fragment 25kDa a des effets inhibiteurs comparables sur la prise alimentaire. Ces résultats ouvrent des perspectives d'applications thérapeutiques.

POSTER 2.



Modifications des entérobactéries et de la protéine ClpB dans un modèle de restriction chez la souris : implications possibles pour l'étiologie et la perpétuation de l'anorexie mentale

Manon Dominique^{1,2,3}, Romain Legrand¹, Marie Galmiche^{1,2,3}, Saïda Azhar¹, Camille Deroissart¹, Charlène Guérin^{2,3}, Jean-Luc do Rego^{3,5}, Fatima Leon^{3,5}, Séverine Nobis^{3,5}, Grégory Lambert¹, Nicolas Lucas¹, Pierre Déchelotte^{1,2,3,4*}

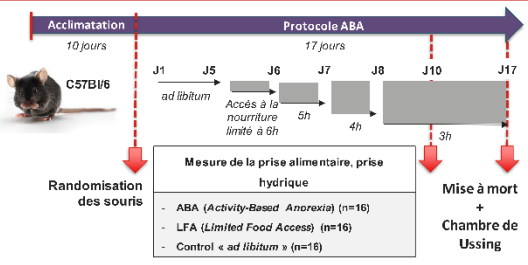
¹TargEdys SA, Université de Rouen, 76183 Rouen, France; ²Inserm UMR1073, Nutrition, Inflammation et Dysfonction de l'Axe Intestin Cerveau, 76183 Rouen, France; ³Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRiB), Université de Rouen Normandie, Rouen, 76183, France; ⁴Centre hospitalier universitaire, CHU Charles Nicolle, Rouen, 76183, France; ⁵Plateforme de comportement alimentaire, Service Commun d'Analyse Comportementale (SCAC), Université de Rouen Normandie, 76183 Rouen, France;

INTRODUCTION

Les Troubles du Comportement Alimentaire (TCA) sont des problèmes majeurs de santé publique dont la physiologie est multifactorielle. Parmi les facteurs impliqués dans cette pathologie, le microbiote semble avoir un rôle important dans la physiopathologie de l'Anorexie mentale (AN). En effet, chez les AN, des dysbioses sont observées avec une augmentation d'*E. coli*, dont les métabolites peuvent modifier les signaux de faim et/ou de satiété grâce à une communication entre le microbiote, l'intestin et le cerveau. C'est le cas de la protéine ClpB (*Caseinolytic peptidase B*) produite principalement par la famille des *Enterobacteriaceae*. Elle a été identifiée comme étant un mimétique conformationnel de l' α -MSH, ce qui pourrait lui conférer des effets anorexigènes similaires.

L'objectif de cette étude a été de mettre en évidence le rôle du microbiote et de la protéine ClpB dans la dérégulation et l'auto-entretien de la pathologie de l'anorexie mentale

MATERIELS & METHODES

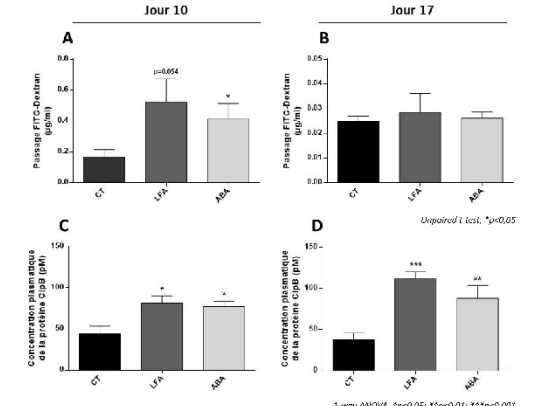


Protocole du modèle ABA
Des souris mâles C57Bl/6 ont été soumises au protocole ABA (Activity-Based Anorexia) : après 5 jours d'acclimation, les souris ABA et LFA (Limited Food Access) ont eu un accès à la nourriture progressivement limité, et ce jusqu'au 17^{ème} jour.
À la fin du protocole, la perméabilité colique a été mesurée par le passage du FITC-Dextran à travers la muqueuse colique par Chambre de Ussing. Les concentrations plasmatiques de ClpB ont été analysées par technique ELISA. La proportion d'*Enterobacteriaceae* présentes dans le contenu colique a, quant à elle, été déterminée par qPCR. Enfin, l'expression de POMC a été quantifiée par RT-qPCR.

RESULTATS

1/ Effets de la restriction alimentaire sur la perméabilité colique et la concentration plasmatique de la protéine ClpB

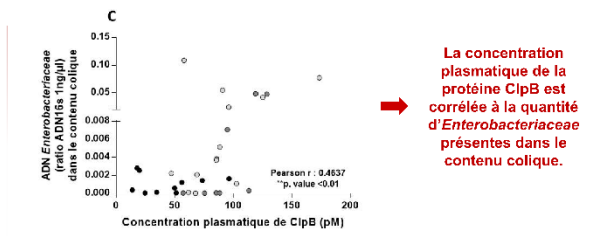
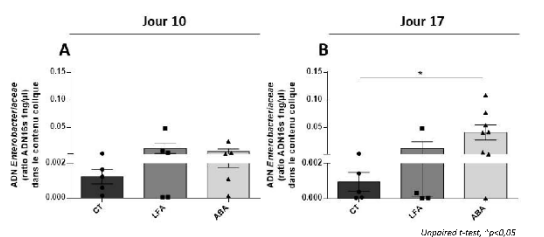
Fig. 1 – Mesure du passage du FITC-Dextran à travers la muqueuse colique à (A) J10 et (B) J17. Concentration plasmatique de la protéine ClpB à (C) J10 et (D) J17



➔ Les résultats montrent que la perméabilité intestinale et la concentration plasmatique de la protéine ClpB sont augmentées après la restriction alimentaire dans les groupes LFA et ABA.

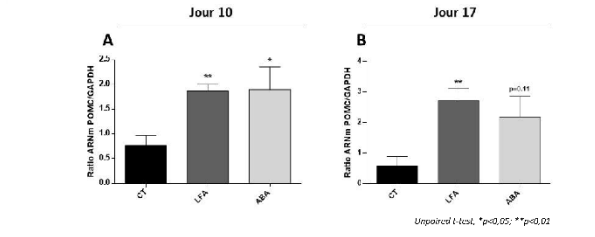
2/ Effets de la restriction alimentaire sur la proportion d'Enterobacteriaceae

Fig. 2 – Mesure de l'expression de l'ADN des *Enterobacteriaceae* dans le contenu colique des souris à (A) J10 et (B) J17. (C) Corrélation avec la concentration plasmatique de ClpB correspondantes



3/ Mesure de l'expression du gène POMC

Fig. 3 – Analyse de ARNm de POMC chez les souris à (A) J10 et à (B) J17



➔ La concentration plasmatique de la protéine ClpB est corrélée à la quantité d'Enterobacteriaceae présentes dans le contenu colique.

CONCLUSION

