UNIVERSITE DE BOURGOGNE

INSERM U866 Lipides-Nutrition-Cancer

UNIVERSITE DE PARAKOU

Laboratoire de Biochimie, CHD, Parakou

THESE EN COTUTELLE

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Bourgogne et de l'Université de Parakou.

Discipline : Sciences de la Vie
Spécialité : Physiologie cellulaire

Par

Gado DRAMANE

Le 08 Octobre 2012, à Parakou

ETUDE DE LA SIGNALISATION CALCIQUE DANS LES CELLULES GUSTATIVES LIPIDIQUES CHEZ LA SOURIS

Directeur de Thèse :
Pr. Naim A. KHAN, Université de Bourgogne

Co-directeur de Thèse :
Pr. Simon A. AKPONA, Université de Parakou

Jury*:*

Falou CISSE, Professeur Titulaire, Université Cheick Anta Diop de Dakar, *Président, Rapporteur*

Cristophe Magnan, Professeur, Université Diderot de Paris, *Rapporteur*

Jean-Marc ATEGBO, Professeur, Université d'Abomey-Calavi, Bénin, *Examinateur*

Nestor SOKPON, Professeur Titulaire, Université de Parakou, Bénin, *Examinateur*

Remerciements

REMERCIEMENTS:

Je voudrais tout d'abord exprimer mes plus sincères remerciements au Professeur Cristophe MAGNAN et au Professeur Fallou CISSE pour l'honneur qu'ils me font en acceptant d'être les rapporteurs de ce travail.

Je suis très reconnaissant au Professeur Falou CISSE (Président) ainsi qu'aux professeurs Nestor SOKPON et Jean-Marc ATEGBO (Examinateurs) pour avoir accepté de faire partie du jury.

Je rends un grand hommage à l'énorme travail d'orientation, de suivi et d'appréciation accompli par mes directeurs de Thèse. Au Professeur Naim KHAN, je témoigne mon admiration et ma reconnaissance au père scientifique qu'il a été et qu'il demeure pour moi. Auprès du professeur Simon AKPONA, j'ai eu à apprécier la grandeur d'âme et l'immense sagesse d'un homme de Sciences. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma très profonde réconnaissance.

Un grand merci à Monsieur Aziz HICHAMI, pour m'avoir initié aux techniques expérimentales et pour son soutien qui ne m'a jamais fait défaut.

Je tiens aussi à saluer l'aide que m'ont apportée les membres de l'ancienne équipe d'accueil «lipides et signalisation cellulaires» en particulier, celles de Souleymane ABDOUL-AZIZE, de Selva KUMAR et d'Anne-Marie SIMONIN. A tous je dis merci.

Un grand Merci à l'ensemble de la nouvelle équipe UMR 866. J'ai une pensée particulière et respecteuse pour les professeurs Philippe Besnard, Isabelle NIOT et Hélène POIRIER.

A mes parents, je témoigne ma reconnaissance infinie pour m'avoir transmis de si belles valeurs. Ce travail n'est que le début d'une longue aventure.

A mes frères et sœurs je dis merci pour leur soutien indéfectible, en particulier à Oumar.

Enfin, j'ai une pensée pleine de reconnaissance pour tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail et tout particulièrement à Djaoudath à qui je dis, nous y voila!

RESUME :

Les personnes en surcharge pondérale semblent préférer une alimentation riche en graisse. Face à l'épidémie d'obésité qui touche nos Sociétés tant urbaines que rurales, élucider les mécanismes de la détection des lipides devient un enjeu majeur. Il avait précédemment été admis que la glycoprotéine CD36, exprimée dans les papilles caliciformes de souris, est impliquée dans la perception oro-gustative des lipides alimentaires. Dans ce travail, nous démontrons que l'acide linoléique (LA) en activant les phospholipases A_2, $sPLA_2$, $cPLA_2$ et $iPLA_2$ *via* CD36, produit de l'acide arachidonique (AA) et la lyso-phosphatidylcholine (lyso-PC). L'acide linoléique (LA) déclenche un influx calcique dans les cellules CD36-positives, et induit la production du facteur CIF (*Calcium Influx Factor*). CIF, AA et lyso-PC exercent différentes actions sur l'ouverture des canaux SOC (*Stored Operated Calcium Channel*), constitués de protéines Orai et contrôlés par STIM1. STIM1 est un senseur calcique situé sur la membrane du réticulum endoplasmique activé par la déplétion du calcium intracellulaire. Nous avons utilisé la technologie *si*RNA et des modèles de souris transgéniques, pour montrer que CIF et lyso-PC activent des canaux calciques homodimériques composés de protéines Orai1, tandis qu'AA active des canaux hétéro-pentamériques composés d'Orai1 et Orai3. Nous avons aussi observé que STIM1 régule la production de CIF dans les cellules stimulées par la thapsigargine et l'acide linoléique ; mais aussi l'ouverture de deux types de canaux calciques.

Par ailleurs, les souris au phénotype $Stim1^{-/-}$ perdent la préférence spontanée pour les lipides, observée chez les animaux sauvages. Les cellules CD36-positive de souris $Stim1^{-/-}$ ont aussi échoué à libérer la sérotonine dans l'environnement extracellulaire.

Nos résultats suggèrent que des acides gras à longue chaine induisent la signalisation calcique régie par STIM1 *via* CD36. La perception oro-gustative des lipides alimentaires détermine la préférence spontanée pour les lipides observée chez les mammifères.

Mots clés: Acide linoléique-CD36-PLA2-Stim1-Orai1/3-Préférence gustative lipidique

ABSTRACT:

The lipid-binding glycoprotein CD36, expressed by circumvallate papillae (CVP) of the mouse tongue, has been shown to be implicated in oro-gustatory perception of dietary lipids. We shown that linoleic acid (LA) by activating sPLA2, cPLA2 and iPLA2 *via* CD36, produced arachidonic acid (AA) and lyso-phosphatidylcholine (Lyso-PC) which triggered Ca2+ influx in CD36-positive taste bud cells (TBC), purified from mouse CVP. LA induced the production of Ca2+ influx factor (CIF). CIF, AA and Lyso-PC exerted different actions on the opening of store-operated Ca2+ (SOC) channels, constituted of Orai proteins and regulated by STIM1, a sensor of Ca2+ depletion in the endoplasmic reticulum. We used siRNA technology and transgenic mice models and observed that CIF and Lyso-PC opened Orai1 channels whereas AA-opened Ca2+ channels were composed of Orai1/Orai3. STIM1 was found to regulate LA-induced CIF production and opening of both kinds of Ca2+ channels. Furthermore, Stim1–/– mice lost the spontaneous preference for fat, observed in wild-type animals. The CD36-positive TBC from Stim1–/– mice also failed to release serotonin into extracellular environment. Our results suggest that fatty acid-induced Ca2+ signaling, regulated by STIM1 *via* CD36, might be implicated in oro-gustatory perception of dietary lipids and the spontaneous preference for fat.

Key words: Linoleic acid-CD36-PLA2-SOC-Stim1-Orai1/3-Oro-gustatory lipid preference.

LISTE DES ABREVIATIONS

- **5-HT** : 5-hydroxytryptamine (Sérotonine)
- **AA** : acide arachidonique
- **AACOCF3**: *activated ketone arachidonoyl trifluoromethyl ketone*
- **ABT** : aminobenzotriazole
- **AC** : adénylate cyclase
- **Ad-PLA$_2$** : adipose- phospholipase A_2
- **AET** : Apport Energétique Total
- **AGLC** : acide gras à longue chaîne
- **AGPI** : acide gras polyinsaturé
- **AgRP** : Agouti-Related Protein
- **AMPc** : adénosine monophosphate cyclique
- **ANC** : Appports Nutritionnels Conseillés
- **Apo B100** : Apo-lipoprotéine B100
- **ARC** : noyau arqué
- **ARF** : Facteur d'ADP-ribosylation
- **ARNm** : Acide ribonucléique ribosomique
- **ASIC**: *acid-sensing ion channels*
- **ATK** : inhibiteurs Arachidonyle cétone trifluorométhyle
- **ATP** : adénosine-triphosphate
- **BAPTA** : *1,2-bis (o-aminophenoxy)-ethane-N, N, N', N'-tetraacetic acid*
- **BCA** : acide bicinchoninique
- **BEL** : Bromoenol lactone
- **BPB** : 4-bromo bromure de phénacyle
- **BPB** : bromophenol blue
- **CA** : acide caprylique
- **CART** : *Cocain and Amphetamine Related Transcript*
- **CCK**: cholécystokinine
- **CD36** : Cluster of Differentiation 36
- **CFCR** : Calcium free/calcium reintroduction
- **CIF** : *calcium influx factor*
- **COX** : cyclooxygénase
- **cPLA$_2$** : phospholipase A_2 cytosolique

- **CRAC**: *Ca^{2+} Release Activated Ca^{2+}*
- **CRF** : *Corticotropin-Releasing Factor*
- **CRH** : *corticotropin releasing hormone*
- **DAG** : diacylglycérol
- **DHA** : acide docosahexanoique
- **DMSO** : Dimethyl sulfoxide
- **DRASIC**: *dorsal root ganglion ASIC*
- **DTNB**: *5,5'-dithio bis-2-nitro benzoic acid*
- **EDTA** : Ethylène diamine tétraacétique
- **EGFR** : *epidermal growth factor family*
- **ENaC**: *epithelmial sodium channel*
- **EPA** : acide éicosapentaénoique
- **FABP**: Fatty Acid Binding Protein,
- **FAT/CD36**: *Fatty Acid Transporter/CD36*
- **FATP** : Fatty Acid Transport Protein
- **GABA**: *γ-amino butyric acid*
- **GLP-l** : glucagon-like peptide- 1
- **GPR**: G protein-coupled receptor
- **GS2** : gene-sequence-2
- **GTP** : guanosine triphosphate
- **HDL** : *High Density Lipoprotein*
- **HEPES** : *hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid*
- **HIV** : Human immunodeficiency virus
- **I_{CRAC}**: *Calcium Release-Activated Calcium current*
- **IL-6** : Interleukine-6
- **IP_3** : inositol-1, 4, 5-triphosphate
- **IP_3R** : Récepteur à l'IP_3
- **$iPLA_2$** : phospholipase A_2 calcium indépendante
- **K^+** : ion potassium
- **KO** : *Knock Out*
- **LA** : acide linoléique
- **La^{3+}** : lanthanum
- **LCFA**: long chain fatty acids
- **LDL** : *Low Density Lipoprotein*

- **LH** : Hypothalamus Latéral
- **LOX** : lipooxygénase
- **$LPLA_2$** : Lysosomale phospholipase A_2
- **LPLA2** : PLA2 lysosomale
- **Lp-PLA_2**: *lipoprotein-associated phospholipase A_2*
- **LXR** : *Liver X Receptor*
- **LysoPC** : Lyso Phosphatidyl Choline
- **MAFP** : Methyl arachidonyl fluorophosphonate
- **MAP kinase** : mitogen-activated protein kinase
- **MC4R** : récepteur aux mélanocortines 4
- **MCH** : hormone mélanocortine
- **MDEG**: *mammalian degenerin*
- **MNK1**: *mitogène kinase interacting protein kinase*
- **NADPH** : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
- **NBIA** : Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation
- **NCAM** : *neuronal cell adhesion molecule*
- **NF*k*B** : nuclear factor kappa B
- **NGDA** : nordihydroguaiaretic acid
- **NPY** : Neuropeptide Y
- **NTE** : *neuropathy target esterase*
- **NTS** : Noyau du Tractus Solitaire
- **OEA** : oléoyl-éthanolamide
- **OLA** : Acide oléique
- **ORAI**: *Calcium release-activated calcium channel protein* 1
- **ORX** : orexines
- **PAF** : *Platelet Activating factor*
- **PAF-AH** : acetyl-hydroxylase
- **PC** : phosphatidyl Choline
- **PE** : Phosphatidyl Ethanolamine
- **PG** : phosphatidyl-glycerol
- **PGE_2** : Prostaglandine E2
- **PI** : phosphatidyl Inositol
- **PI3K** : Phosphoinositol-3 kinase
- **PIP** : phosphatidyl Inositol-4-phosphates

- **PIP2** : phosphatidylinositol-4,5-biphosphates
- **PKA** : protéine Kinase A
- **PKC** : Protéine Kinase C
- **PLA_2** : phospholipase A_2
- **PLC** : phospholipase C
- **PLD** : phospholipase D
- **PLP** *: patatin-like-protein*
- **PMSF** : phénylméthylsulfonyle
- **POMC** : pro-opiomélanocortine
- **PPAR**: *Peroxisome Proliferator Activated Receptor*
- **protéines G**: *Guanine nucleotide binding proteins*
- **PS** : phosphatidyl-serine
- **PTK** : Protéine Tyrosine Kinase
- **PVN**: Noyau Para Ventriculaire
- **PYY** : peptide YY
- **RCPG** : Récepteur Couplé à la Protéine G
- **RE** : Réticulum Endoplasmique
- **RISC**: *RNA induced silencing complex*
- **RT-qPCR** : *Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction*
- **SAM** : *stérile alpha motif*
- **siRNA** : *small interfering-RNA*
- **SNAP25** : *synaptic associated protein*, 25 kDa
- **SNMP** : Sensory neuron membrane protein
- **SOC** : *Stored Operated Calcium Channels*
- **$sPLA_2$** : phospholipase A_2 secrétée
- **SSO** : sulfo-N-succinimidyle oléate
- **STIM**: *Stromal interaction molecule*
- **T1R** : Taste Receptor 1
- **T2R** : Taste Receptor 2
- **TG**: thapsigargine
- **TLR2** : *Toll-like receptor 2*
- **TNF** : *Tumor necrosis factor*
- **TNF-α** : *Tumor necrosis factor α*
- **TR** : Taste Receptor

- **TRH** : *thyrotropine releasing hormon*
- **TRP** : Transient Receptor Potential
- **TRPM5** : Transient receptor potential cation channel subfamily M member 5
- **VLDL**: *very low density lipoprotein*
- **VMN** : Noyau Ventro-Médian
- **α-MSH** : *α-melanocyte-stimulating-hormon.*

Liste des figures :

Figure 1: Schéma explicatif du système de la perception du goût, exemple du goût amer. 3

Figure 2: Les deux grandes familles d'acides gras polyinsaturés alimentaires. 11

Figure 3: Localisation des glandes salivaires 20

Figure 4: Les différentes phases d'un épisode de prise alimentaire. 22

Figure 5: Le système mélanocortine central hypothalamique. 24

Figure 6: Représentation schématique du contrôle de la prise alimentaire par les nutriments. 25

Figure 7: Modulation du système mélanocortine central hypothalamique par des facteurs circulants : leptine, insuline et ghréline. 26

Figure 8: Schéma récapitulatif des facteurs influençant la préférence lipidique.. 28

Figure 9: Les différents sites d'action des phospholipases sur les phospholipides membranaires. 32

Figure 10: Représentation schématique des PLA2s secrétés 36

Figure 11: Représentation schématique du Groupe IV des cPLA$_2$. 38

Figure 12: Représentation schématique du groupe VI d'iPLA$_2$ 42

Figure 13: (A) Structure de sPLA$_2$ GIA.. 47

Figure 14: Modèle du site de fixation lipidique sur sPLA$_2$ GIA.. 48

Figure 15: Structure en crystal du groupe IVA 49

Figure 16: Modèle de la surface de fixation lipidique de cPLA$_2$ GIVA. 49

Figure 17: Homologie du groupe VIA de PLA$_2$. 50

Figure 18: Fixation du phospholipide du Groupe VIA d'iPLA$_2$. 51

Figure 19: Structure du Groupe PLA$_2$VIIA et modèle hypothétique de l'association de Lp-PLA2 avec la surface membranaire 51

Figure 20: Structure du Groupe VIII des PLA$_2$ (PAF-AH IB) 52

Figure 21: Illustration schématique d'un bourgeon du goût. 67

Figure 22: Structure des papilles gustatives 68

Figure 23 : Les caractéristiques des types I, II et III de cellules gustatives chez les rongeurs 69

Figure 24: Les communications cellules-cellules dans les bourgeons du goût de papille caliciforme de souris. 71

Figure 25: Topologie membranaire des récepteurs des TRC. 72

Figure 26: Différents mécanismes de perception gustative 73

Figure 27: Structure de FAT/CD36. 77

Figure 28: Structure des esters de sulfo-N-succinimidyl d'acide gras. 78

Figure 29: Les trois théories de l'influx SOC. 82

Figure 30: Activation d'Orai1 par STIM1 lors de la déplétion calcique 84

Figure 31: Structure chimique des différentes catécholamines 86

Figure 32: Innervation de la langue par les nerfs X, IX et VII. 88

Figure 33: Mécanismes de signalisation de la cellule gustative lipidique 101

Figure 34: Système de sélection des cellules CD36-positives. 123

Figure 35:Différentes configurations de Patch-clamp. 131

Figure 36: Structure d'une protéine Argonaute. 133

Figure 37: Méthode d'invalidation d'un gène. 136

Figure 38: Représentation du test à double choix 137

Figure 39: Signalisation calcique et expression des différents isotypes de PLA_2 des cellules CD36-positives. 147

Figure 40: Activité enzymatique des différents types de PLA_2 et mesure de la libération d'acide arachidonique tritié. 149

Figure 41: Action des inhibiteurs de PLA_2 sur le calcium intracellulaire. 150

Figure 42: Action de Lyso-PC, PLAP et AA sur la signalisation calcique des cellules CD36-positives 151

Figure 43: Action de CIF, AA et Lyso-PC sur le calcium intracellulaire des cellules CD36-positives 152

Figure 44: Expression et implication de STIM1 dans la signalisation calcique des cellules CD36-positives 153

Figure 45: Effet de CIF, CMZ et BAPTA sur l'activité enzymatique des PLA2 dans les cellules gustatives CD36 positives. 154

Figure 46: Effet de la déficience de STIM1 sur la signalisation calcique 155

Figure 47: Effet de l'invalidation du gène STIM1 et une splénomégalie sur la préférence gustative pour les lipides. 156

Figure 48: DHA augmente le calcium intracellulaire dans les cellules gustatives. 148

Figure 49: L'action de SSO sur l'augmentation [Ca^{2+}]i par DHA. 149

Figure 50: L'action de 2-APB et d'U73122 sur l'augmentation de calcium intracellulaire induite par DHA.. 150

Figure 51: La libération de [3H]-DHA par les cellules gustatives et l'action des siRNA PLA2 sur le calcium induit. L. 151

Figure 52: Le rôle de STIM1 dans la signalization calcique induite par DHA. 152

Figure 53: Représentation schématique de la signalisation calcique induite par LA dans les cellules CD36-positives. 166

Liste des Tableaux:

Tableau 1 : Teneurs (mg/100g) en acide linoléique et α-linolénique des principales huiles végétales et des graisses animales. 13

Tableau 2: Proportion (g/100 g) en EPA (20:5 n-3) et DHA (22:6 n-3) de certains aliments d'origine marine. 13

Tableau 3: Synthèse des apports nutritionnels conseillés en acides gras selon les sujets 15

Tableau 4: La grande famille des Phospholipases A_2 35

Tableau 5: les phospholipases A_2 secrétés 37

Tableau 6: le groupe IV des cPLA$_2$ 39
Tableau 7: Phospholipases A2 calcium indépendantes 41
Tableau 8: Groupes VII et VIII des phospholipases A$_2$ 45
Tableau 9: les PLA2 du groupe XV 46
Tableau 10: Liste des protéines humaines non classées et ayant une activité PLA$_2$ 64
Tableau 11:Liste des amorces utilisées. 125
Tableau 12: séquences des complexes *si*RNA utilisés 134

Table des matières :

INTRODUCTION GENERALE 1

PREMIERE PARTIE : CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET ETAT DES CONNAISSANCES . 7

CHAPITRE 1 : LES ACIDES GRAS ALIMENTAIRES 8

1. INTRODUCTION 9
2. LES LIPIDES ALIMENTAIRES 10
3. BIOSYNTHESE DES ACIDES GRAS POLYINSATURES (AGPI) 10
4. ALIMENTS ET AGPI 12
   4.1. Sources alimentaires des AGPI 12
   4.2. Notion d'acides gras essentiels 14
   4.3. Fonctions des acides gras alimentaires 15
      4.3.1. Rôle de lipides de constitution 15
      4.3.2. Rôle énergétique 16
      4.3.3. Rôle régulateur de l'activité cellulaire 16
      4.3.4. Effets de la consommation des AGPI sur la santé 16
         4.3.4.1. Effets bénéfiques des AGPI de la famille n-3 17
            4.3.4.1.1 Cardio-protecteur 17
            4.3.4.1.2. Anticancéreux 17
            4.3.4.1.3. Effets sur le système nerveux central 18
            4.3.4.1.4. AGPI n-3 et apoptose 18
            4.3.4.1.5. AGPI n-3 et acuité visuelle 18
            4.3.4.1.6. Action des AGPI n-3 sur le système immunitaire 18
         4.3.4.2. Effets controversés des AGPI de la famille n-6 19
5. HYDROLYSE DES LIPIDES ALIMENTAIRES 19
6. DIGESTION DES AGLC 20
7. AGLC ET COMPORTEMENT ALIMENTAIRE 21
   7.3. Généralités sur le comportement alimentaire 21
      7.3.4. Principes de la prise alimentaire 21
      7.3.5. Régulation de la prise alimentaire 22
   7.4. Physiologie du comportement alimentaire 22
      7.4.4. Les centres régulateurs de la prise alimentaire 23
         7.4.4.1. L'hypothalamus 23

7.4.4.2. Les autres centres 24
7.4.5. Le rôle des réserves énergétiques dans la régulation de prise alimentaire 25
7.5. Régulation du comportement alimentaire par les lipides 26
7.5.4. Action satiétogène 26
7.5.5. Consommation lipidique et sentiment de récompense 27
8. CONCLUSION 28

CHAPITRE 2 : LES PHOSPHOLIPASES A_2 30

1. INTRODUCTION 31
2. GENERALITES SUR LES PHOSPHOLIPASES 32
2.1. La phospholipase C 32
2.2. La phospholipase D 32
3. LES PHOSPHOLIPASES A_2 33
3.1. Groupes et sous-groupes 35
3.1.1. Phospholipase A_2 Sécrétées 35
3.1.2. Phospholipase A_2 Cytosolique 37
3.1.2.1. Groupe IVA Phospholipase A_2 ($cPLA_2\alpha$) 38
3.1.2.2. Groupe IVB Phospholipase A_2 ($cPLA_2\beta$) 38
3.1.2.3. Groupe IVC PLA_2 ($cPLA_2\gamma$) 40
3.1.2.4. Groupe IVD ($cPLA_2\delta$), GIVE ($cPLA_2\varepsilon$), and GIVF ($cPLA_2\zeta$) 40
3.1.3. Phospholipase A_2 Calcium-Indépendante 40
3.1.3.1. Groupe VIA PLA_2 ($iPLA_2\beta$; PNPLA9) 42
3.1.3.2. Groupe VIB PLA_2 ($iPLA_2\gamma$; PNPLA8) 42
3.1.3.3. Groupe VIC PLA_2 ($iPLA_2\delta$; PNPLA6) 43
3.1.3.4. Groupe VID PLA_2 (iPLA2ε; PNPLA3) 43
3.1.3.5. Groupe VIE PLA_2 (iPLA2ζ; PNPLA2) 43
3.1.3.6. Groupe VIF PLA_2 (iPLA2η; PNPLA4) 44
3.1.4. PAF Acetylhydrolases 44
3.1.5. Adipose-Specific Phospholipase A_2 45
3.1.6. Lysosomal Phospholipase A_2 45
3.2. Structure des Phospholipases A_2 et interactions membranaires 46
3.2.1. Phospholipase A_2 Sécrétées 46
3.2.2. Phospholipase A_2 Cytosolique 48
3.2.3. Phospholipase A_2 Calcium-Indépendante 50

3.2.4. PAF Acétylhydrolases 51
3.2.4.1. PLA_2 Groupe VIIA (Lp-PLA_2) 51
3.2.4.2. PLA_2 Groupe VIII (PAF-AH Ib) 52
3.3. Mécanismes d'activation 52
3.3.1. Phospholipase A_2 Sécrétées 52
3.3.2. Phospholipase A_2 Cytosolique 52
3.3.2.1. Activation calcique 52
3.3.2.2. Activation par PIP_2 et C1P 53
3.3.2.3. Phosphorylation 53
3.3.3. Phospholipases A_2 Calcium-indépendantes 53
3.3.3.1. Activation de l'ATP 53
3.3.3.2. Clivage de la caspase 54
3.3.3.3. Inhibition de la calmoduline 54
3.3.3.4. Oligomérisation 54
4. FONCTIONS BIOLOGIQUES DES PHOSPHOLIPASES A_2 55
4.1. Fonctions antivirale et anti bactérienne des $sPLA_2$ (Groupes $sPLA_2$ I, II, III, V, and X) 55
4.2. Hydrolyse des phospholipides 55
4.3. Fonction de régulation de l'appareil de Golgi 56
4.4. Régulation de la NADPH Oxidase 56
4.5. Autres fonctions 56
5. IMPLICATIONS PATHOLOGIQUES ET INTERVENTIONS THERAPEUTIQUES 57
5.1. $sPLA_2$ et Inflammation ($sPLA_2$ Groupes II, V, and X) 57
5.2. $sPLA_2$ et athérosclérose ($sPLA_2$ Groups II, III, V, and X) 57
5.3. Cancer 58
5.4. Diabète 59
5.5. Syndrome de Barth 59
5.6. Troubles neuronaux 59
5.7. Lp-PLA_2 et Atherosclerose 59
5.8. Lp-PLA_2 et Entérocolite nécrosante néonatale 60
5.9. Autres pathologies 60
6. INHIBITEURS CHIMIQUES 60
6.1. Premiers développements d'analogues phospholipidiques 60
6.2. Acides dicarboxyliques 61

6.3. Amides, Sulfonamides et Oxoamides 61
6.4. Indoles 61
6.5. Oxadiazolones 61
6.6. Aptamères et Peptides 62
6.7. Trifluoromethyl Kétones, Polyfluoroketones et Tricarbonyles 62
6.8. Pyrroles et Pyrrolidines 62
6.9. Methyl Fluorophosphonates 63
6.10. Bromoenol Lactone 63
6.11. Pyrimidones et Azetidinones 63
6.12. Produits naturels 63
6.13. Autres inhibiteurs 63
7. AUTRES LIPASES POSSEDANT UNE ACTIVITE DES PHOSPHOLIPASES A_2 64
7.1. Otoconin-90 (Homologue $sPLA_2$) 64
7.2. Phospholipase B (Homologue $cPLA_2$) 64
7.3. PNPLA (Homologue $iPLA_2$) 65
7.4. $aiPLA_2$ (Peroxiredoxin-6) 65
8. CONCLUSION 65

CHAPITRE 3 : LES MODALITES GUSTATIVES ET LA SIGNALISATION CELLULAIRE 66

1. INTRODUCTION 67
2. LES CELLULES GUSTATIVES 68
2.1. La différenciation des cellules gustatives 68
2.2. Les différents types de cellules gustatives 69
2.2.1. Les cellules gustatives de type I 69
2.2.2. Les cellules gustatives de type II 69
2.2.3. Les cellules gustatives de type III 70
2.3. La communication intercellulaire 70
3. LA TRANSDUCTION DU GOUT 71
3.1. Les récepteurs du goût 71
3.2. La gustducine 72
3.3. Les modalités gustatives 73
3.3.1. Le sucré 73
3.3.2. L'amer 74

3.3.3. L'acide 74
3.3.4. Le salé 74
3.3.5. L'Umami 74
3.4. Les comportements alimentaires liés à la perception gustative 74
4. LA SIGNALISATION DES CELLULES GUSTATIVES LIPIDIQUES: « LE GOUT DU GRAS » 75
4.1. Les récepteurs impliqués dans la signalisation des cellules gustatives 75
4.1.1. Le FAT/CD36 75
4.1.2. Les GPR 78
4.2. L'activation des Protéines Tyrosines Kinases (PTK) 79
4.3. La signalisation calcique 79
4.3.1. Le déclenchement de la signalisation 80
4.3.2. Le modèle capacitatif 80
4.3.3. L'influx SOC 80
4.3.3.1. Hypothèses 81
4.3.3.2. Les canaux impliqués dans l'influx SOC 82
4.3.4. Le rôle des MAPK dans la signalisation des cellules gustatives 84
4.3.5. La transmission de l'information gustative au cerveau 85
4.3.5.1. La libération de neuromédiateurs 85
4.3.5.1.1.Les cathécolamines 85
4.6.5.1.2.La sérotonine 86
4.3.5.2. Transformation de l'information gustative 87
5. CONCLUSION 88
DEUXIEME PARTIE : LES CONTRIBUTIONS PERSONNELLES 90
1. INTRODUCTION: 91
2. TRAVAUX PUBLIES: 91
2.1. Mécanismes de signalisation cellulaire de la perception gustative des lipides: Les cellules gustatives peuvent-elles être la cible d'agents anti-obésité? 91
2.1.1. Le rôle de CD36 dans la perception gustative lipidique 99
2.1.2. La signalisation *via* CD36 99
2.1.3. Rôle de GPCR dans la perception lipidique 101
2.1.4. La signalisation *via* GPCR 102
2.1.5. Y-t-il un lien entre CD36 et GPCR ? 103

2.1.6. Les antagonistes de GPR120 et de CD36 peuvent-ils avoir une action anti-obésitaire ? 103
2.2. STIM1 régule la signalisation calcique et la préférence gustative lipidique *via* les phospholipases A2 et les canaux calciques Orai1 et Orai3 104
2.2.1. Objectifs 121
2.2.2. Matériels et Méthodes 121
2.2.2.1. Matériels 121
2.2.2.2. Isolation des cellules CD36-positives à partir des papilles caliciformes de souris 122
2.2.2.3. Détermination de l'expression des ARNm par RTqPCR 124
2.2.2.4. Détermination des isoformes de PLA2 par microscopie confocale 125
2.2.2.5. Mesure de l'activité enzymatique des PLA_2 126
2.2.2.6. Mesure de la libération d'acide arachidonique tritié 127
2.2.2.7. Mesure de la signalisation calcique 128
2.2.2.8. Imagerie calcique 129
2.2.2.9. Extraction et purification de CIF 130
2.2.2.10. Electrophysiologie 130
2.2.2.11. Inhibition par siRNA 132
2.2.2.12. Détection par Western Blot 135
2.2.2.13. Déficience génétique des souris 135
2.2.2.14. Mesure de la libération de la sérotonine 136
2.2.2.15. Induction de la splénomégalie 137
2.2.2.16. Test de préférence lipidique 137
2.2.3. Résultats 147
2.2.3.1. L'acide linoléique induit une augmentation de [Ca]i et active les PLA_2 .. 147
2.2.3.2. L'acide arachidonique (AA) libéré par les PLA_2 induit l'influx SOC (Stored Operated Calcium Channel) 149
2.2.3.3. L'acide arachidonique et la Lyso Phosphatidyl-choline ont un effet additif sur l'influx calcique 150
2.2.3.4. L'acide linoléique induit la production de CIF (Calcium Influx factor) .. 151
2.2.3.5. Les canaux Orai1 et orai3 sont impliqués dans la signalisation calcique des cellules gustatives lipidiques 152
2.2.3.6. CIF régule l'activité des $iPLA_2$ 154
2.2.3.7. STIM1 est indispensable pour la signalisation calcique 154

2.2.3.8. Diminution de la préférence spontanée des lipides chez les souris Stim1$^{-/-}$ 156

3. TRAVAUX NON PUBLIES : L'ACIDE DOCOSAHEXAENOIQUE (DHA) INDUIT-IL LA SIGNALISATION CALCIQUE DANS LES CELLULES GUSTATIVES INDEPENDAMMENT DE CD36 ?.... 147

3.1. DHA induit une augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules gustatives: 147

3.2. DHA n'induit pas l'augmentation du calcium intracellulaire via CD36 148

3.3. DHA recrute le calcium intracellulaire via l'activation de la voie des PLC et via l'influx SOC. 149

3.4. PLA_2 GIVc est impliquée dans le calcium induit par le DHA : 150

3.5. STIM1 joue un rôle dans l'influx calcique induit par le DHA 151

3.6. La signalisation calcique des cellules gustatives induite par le DHA 152

4. LISTE DES COMMUNICATIONS : 153

4.1. Acides gras et Obésité ; Congrès « Santé et Société » ; Septembre 2010 ; Dar Es Salaam, Tanzanie. 153

4.2. Identification of isoforms of pla2 in mouse cd36 positive lipid gustatory cells: implication in calcium signaling; 9th Congress of the International Society for the Study of Fatty Acids and lipids ; Juin 2010; Maastricht, the Netherlands. 153

4.3. Three isoforms of PLA2 modulate calcium signaling in mouse CD36-positive lipid gustatory cells; VI^{ième} congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique ; Mars 2011, Grenoble, France. 154

4.4.Role of CIF, STIM1 and Orai1 in calcium signaling in mouse CD36+ lipid gustatory cells. XVII^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs-BIOTechno ; Juin 2011, Dijon, France... 155

4.5.Role of CIF, STIM1 and Orai1 in calcium signaling in mouse CD36 taste bud cells. 21th LBP-workshop Dijon, 26-27 January 2012. 156

4.6.Stim1 is essential for the regulation of orai1/3 calcium channels, and fat preference in mice; VII^{ième} congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique ; Avril 2012, Dijon, France. 156

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 158

1. DISCUSSION GENERALE : 159

1.1 Activation des récepteurs du goût par les AGLC 159

1.2. PLA_2 et perception des AGLC 159

1.3. LA active les PLA_2 et la signalisation calcique via CD36 161
1.4. Les produits des PLA_2 activent la signalisation calcique 162
1.5. CIF est un activateur du calcium intracellulaire 163
1.6. Quelle est la nature des canaux calciques impliqués ?..... 164
1.7. STIM1 est un activateur mécanique des canaux calciques 164
1.8. Les PLA_2 agissent-elles en amont ou en aval de la production CIF ? 165
1.9. Stim1 est impliquée dans la préférence gustative lipidique..... 167
1.10. La protéine GPR120 a-t-elle un rôle dans la perception gustative lipidique ? 168
1.11. GPR120 et CD36 sont elle des protéines associées ? 168
2. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES : 169

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 172

INTRODUCTION GENERALE

Vous est-il arrivé de vous demander pourquoi les enfants préfèrent manger des pommes de terre frites plutôt que des pommes de terre bouillies ? Ou pourquoi les adultes attendent impatiemment la coupure du gâteau lors d'un mariage ? La réponse n'est pas aussi simple qu'elle en a l'air. Mais une chose est certaine, la majorité des personnes aime manger des aliments plus ou moins gras.

De la même manière, nous apprécions favorablement les aliments sucrés, et nous mangeons rarement des aliments sans sel. Par contre nous apprécions très peu les aliments acides et les aliments amers. En effet, les systèmes sensoriels nous fournissent une représentation du monde extérieur avec des produits chimiques (le goût et l'olfaction) et des matières physiques (le toucher, l'audition, la vision et la température). Le sens du goût lui, informe l'organisme sur la nature et les propriétés des aliments et de toutes substances introduites dans la bouche. La langue en est l'organe récepteur principal. Le goût sucré permet l'identification de nutriments riches en énergie, le goût salé assure un bon équilibre électrolytique alimentaire, et les goûts acide et amer préviennent de la consommation de produits chimiques potentiellement toxiques. A ces modalités gustatives s'ajoutent *l'Umami*, qui signifie délicieux en japonais. C'est le goût du glutamate, découvert par le Japonais Kikunae Ikeda au début des années 1900 grâce au *Kombu*, une algue marine largement utilisée dans la cuisine japonaise.

Il existe cinq modalités, ou saveurs gustatives. Lorsque nous mangeons des aliments riches en gras, tel qu'un gâteau crémeux, ils ont un goût délicieux, et nous pouvons être certains de reconnaitre ce goût. Cependant, ce goût délicieux n'est ni sucré, ni salé, ni *umami*, et certainement pas acide ou amer. Il est donc particulier.

Durant des siècles, les hommes se sont alimentés pour avoir de l'énergie et pour la survie de leur espèce. Nous vivons dans une époque d'abondance alimentaire, particulièrement dans les pays développés. Cette abondance est associée à un enrichissement énergétique des aliments et conduit malheureusement à l'apparition de maladies métaboliques appelées maladies de pléthore, telles que l'obésité, le diabète de type II et les pathologies cardiovasculaires.

L'obésité augmente de manière considérable, pour atteindre des proportions épidémiques. D'après le rapport *Global strategy on diet, physical activity and health* de l'Organisation

Mondiale de la Santé (OMS) en 2003, plus d'un milliard d'individus sur la planète souffrent de surpoids, dont 300 millions sont cliniquement obèses.

Malheureusement, l'augmentation de la consommation d'aliments riches en acides gras et en sucres combinée à la baisse d'activités physiques, associée à une société de plus en plus sédentaire, ont conduit à une multiplication par trois de l'incidence de l'obésité, depuis le début des années 1980. Les facteurs qui favorisent l'obésité sont des facteurs socioculturels, génétiques ou physiologiques. Le développement de l'obésité est sans doute dû à la recherche du goût délicieux des aliments gras.

Pour qu'une modalité du goût soit perçue, il faut qu'une molécule sapide soit reconnue par un récepteur du goût. Les récepteurs du goût sont situés à l'orifice d'un regroupement de cellules gustatives qui forment un bourgeon du goût (Figure1). Ces bourgeons du goût sont localisés dans les papilles gustatives, qui sont formées par des replis l'épithélium lingual. Il existe quatre types de papilles gustatives, les caliciformes, les foliées, les fongiformes et les filiformes.

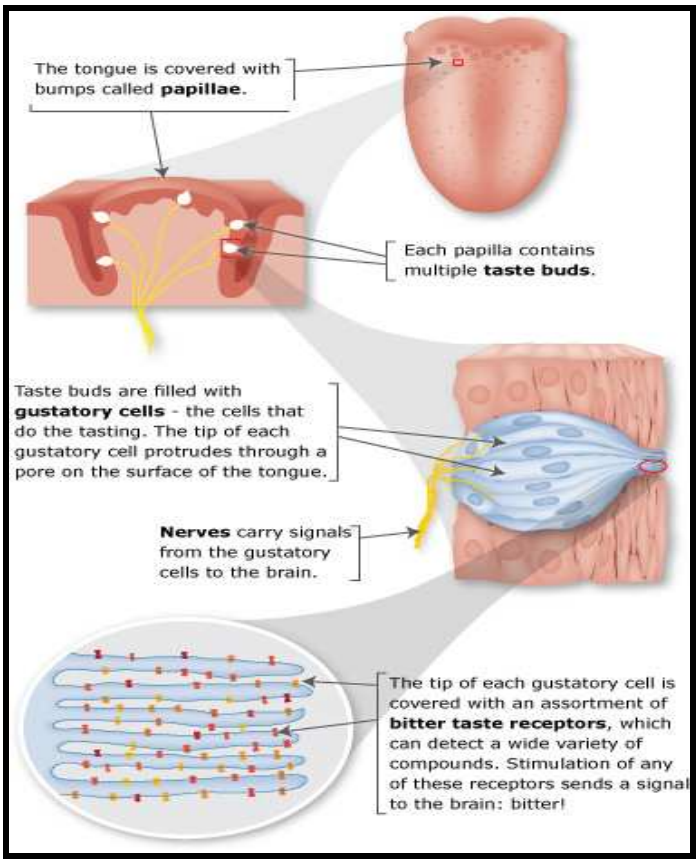

Figure 1: Schéma explicatif du système de la perception du goût.
D'après Chandrashekar *et al.* (2006)

Les récepteurs du goût sont activés par leurs substrats, et transmettent des informations au cerveau *via* le noyau du tractus solitaire (NST). Ceci déclenche un comportement alimentaire (Khan et Besnard, 2009).

En ce qui concerne le comportement alimentaire, les rongeurs préfèrent spontanément les aliments enrichis en lipides dans une situation de double choix (Hamilton, 1964). Les souris peuvent reconnaître des solutions gustatives dans la cavité buccale, sans que ne soient associés des signaux olfactifs ou une texture (Saitou *et al.,* 2009). La section du nerf gustatif altère la détection des acides gras et / ou la préférence chez les rats et les souris (Stratford *et al*., 2006 ; Gaillard *et al*., 2008). Un tel comportement doit aussi exister chez l'homme (Mattes, 2009).

Pour que nous appréciions les aliments gras, il faut bien qu'il y ait une raison. Il s'agirait d'une attraction spontanée. Les humains peuvent percevoir une information orosensorielle sur les acides gras alimentaires, même lorsque l'olfaction est minimisée en utilisant un pince-nez ou en masquant la texture spécifique des acides gras (Chale-Rush *et al*., 2007). De plus, les patients obèses ont une plus grande préférence pour les aliments gras que les sujets maigres (Steward *et al*., 2010 ; Drewnowski *et al*., 1985 ; Mela *et al*., 1988). Des travaux ont récemment montré que tant au niveau oral qu'au niveau gastro-intestinal, la sensibilité à l'acide linoléique est compromise chez les personnes obèses (Steward *et al* , 2011).

Pour s'aligner sur le schéma de la perception des autres modalités du goût, une protéine candidate s'est imposée dans la détection des acides gras alimentaires. En effet, Fukuwatari *et al.,* (1997) et Laugerette *et al.,* (2005) ont rapporté que le CD36, une protéine de fixation des lipides ayant un rôle de récepteur, serait exprimé préférentiellement dans les papilles caliciformes de rat et de souris caliciformes papilles. Laugerette *et al.,* (2005) ont fourni la première preuve que les cellules CD36-positives des papilles caliciformes joueraient un rôle important dans la perception des lipides alimentaires chez la souris. Ainsi, l'inactivation du gène CD36 abolit totalement la préférence spontanée pour les acides gras à longue chaîne observée chez les souris. Cet effet est spécifique aux lipides, puisque la préférence pour le sucré et l'aversion pour l'amertume dans les contrôles n'ont pas été modifiées chez les souris CD36-KO. Ces observations sur l'implication de CD36 dans la perception du goût des lipides sont semblables à celles de Sclafani *et al.* (2007). La preuve expérimentale du rôle de la protéine CD36 dans la perception des acides gras alimentaires a été apportée récemment (Pepino *et al.*, 2012).

Nous avons effectué nos expériences sur des cellules gustatives CD36-positives, purifiés à partir de papilles caliciformes de souris, et démontré que l'acide linoléique (LA), un acide gras à longue chaîne (AGLC), induit une augmentation de calcium intracellulaire en se liant à CD36 (Gaillard *et al.*, 2008). La signalisation induite par l'activation de CD36 par l'acide linoléique, un acide gras à longue chaine a été étudiée (El-Yassimi *et al.*, 2008). Cependant, les mécanismes d'action de cet acide gras sur l'ouverture de canaux calciques restent peu étudiés.

Il est possible que l'activation de cellules gustatives CD36-positives soit associée à la libération de messagers lipidiques comme l'acide arachidonique (AA), qui participent à des mécanismes de signalisation en aval. Il a été démontré que l'acide arachidonique module l'activation des canaux K^+ dans les cellules isolées de bourgeons du goût (Gilbertson *et al.*, 1997) et affecte les réponses nerveuses gustatives aux stimuli du goût (Schiffman *et al.*, 1995). L'acide arachidonique est connu pour être principalement libéré suite à l'hydrolyse des phospholipides membranaires sous l'action de la phospholipase A_2 (PLA_2). Sur la base des propriétés structurales et fonctionnelles, ces enzymes PLA_2 peuvent jouer un rôle clé dans le processus moléculaire de signalisation du goût déclenché dans les cellules CD36-positives de souris, par l'acide linoléique.

En ce qui concerne la signalisation calcique, nous savons d'ores et déjà que l'augmentation du calcium intracellulaire se fait *via* les canaux calciques SOC (*stored operated calcium channels*) en réponse à une déplétion des réserves de calcium.

Compte tenu de toutes ces données scientifiques, nous avons jugé utile d'entreprendre la présente étude afin de caractériser les différentes isoformes de PLA_2 et de montrer leur implication, ainsi que celle de leurs produits comme l'acide arachidonique libre et les lyso-phospholipides dans la signalisation calcique dans les cellules CD36-positives. Cette signalisation calcique a fait l'objet d'études approfondies, surtout en ce qui concerne les canaux et autres éléments impliqués.

Ce travail est divisé en trois parties. La première partie est consacrée au contexte scientifique et à l'état des connaissances. Un chapitre 2 portera sur l'étude des phospholipases A_2, après avoir caractérisé les acides gras et montré la place qu'ils ont prise dans le comportement alimentaire dans un premier chapitre. Le dernier chapitre présentera, les modalités du goût en général et de facon plus particulière la perception gustative des aliments gras.

Dans la deuxième partie, nous exposons nos travaux, sous la forme d'apports personnels. Ces contributions personnelles permettront d'une part, de montrer le rôle prépondérant des PLA_2

dans la signalisation des cellules gustatives CD36-positives et d'autre part, d'approffondir la connaissance des mécanismes calciques qui ont lieu au cours de cette signalisation.
Enfin, dans la troisième partie, nous proposons une discussion générale des travaux effectués, qui vise non seulement à prouver l'existence d'un goût du gras, mais surtout à renforcer les connaissances actuelles sur cette nouvelle modalité du goût.

PREMIERE PARTIE : CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET ETAT DES CONNAISSANCES

Chapitre 1 : Les acides gras alimentaires

1. Introduction

Pour son bon fonctionnement, l'organisme a un besoin en nutriments tels que les lipides alimentaires. Près de la moitié du cerveau humain est constitué de lipides. Généralement, les aliments riches en lipides sont délicieux, donc très appréciés. L'augmentation de la consommation d'aliments riches en acides gras et en sucres combinée à la baisse d'activités physiques, a conduit à une multiplication par trois l'incidence de l'obésité, depuis le début des années 1980. Les lipides sont riches en calories, 9 kilocalories par gramme. Ils ont donc un rôle de carburant pour répondre aux besoins énergétiques de notre organisme. Lors d'une consommation excessive d'aliments riches en lipides, qui n'est pas suivie de la dépense énergétique concomitante, les lipides sont accumulés dans notre organisme. Cette accumulation, qui peut être sous-cutanée ou abdominale est responsable dans de nombreux cas de dysfonctionnements métaboliques. Ces dysfonctionnements, qui sont d'ordre obésitaire, diabétique ou cardiovasculaire ont été regroupés en tant que maladies de pléthore.

En dehors du rôle énergétique des lipides, ils peuvent transporter les vitamines liposolubles (A, D, E et K), constituants de la membrane cellulaire, ou participer à la synthèse de certaines substances telles que les hormones.

L'apparition des incidences liées à la prise importante d'aliments riches en lipides, nécessite la réduction des apports et le rééquilibrage de la balance énergétique. Pour qu'une alimentation soit équilibrée, l'apport calorique quotidien, sous forme de lipides, doit représenter 30 % de l'apport total.

Dans le cadre d'une réduction calorique des aliments riches en lipides, il est indispensable de veiller à consommer une certaine catégorie de lipides, les acides gras essentiels. Ces acides gras sont indispensables au bon fonctionnement de l'organisme qui ne peut les fabriquer, d'où la nécessité qu'ils soient apportés par l'alimentation.

La trop grande consommation d'aliments gras est devenue un phénomène déterminant du comportement alimentaire. De nombreux facteurs socioculturels et même génétiques peuvent expliquer la préférence que les mammifères en général, ont pour les aliments riches en acides gras.

Dans ce chapitre, nous passerons en revue les caractéristiques des acides gras alimentaires. Nous évoquerons leurs fonctions, leur rôle dans l'organisme et nous finirons, par les déterminants de la préférence alimentaire lipidique.

2. Les lipides alimentaires

Selon la classification de Hennen (1995), les lipides sont classés en six groupes, les triglycérides, les glycéro-phospholipides, les sphingo-lipides, les terpénoides, les stérols et stéroïdes et enfin, les acides gras. Les acides gras sont des acides carboxyliques à chaine aliphatique hydrophobe, saturés ou non. Les acides gras sont constitués d'une chaîne hydrocarbonée de longueur variable et d'un groupement carboxylique à une des extrémités. La formation des phospholipides et des triglycérides est rendue possible grâce à la fonction carboxyle qui permet une liaison ester entre l'acide gras et les groupements hydroxyles du glycérol, squelette de base des triglycérides et des phospholipides. La chaîne hydrocarbonée des acides gras peut contenir une ou plusieurs doubles liaisons, les insaturations.

La nomenclature des acides gras est définie par la longueur de la chaîne carbonée, le nombre d'atomes de carbone et le nombre de doubles liaisons (insaturations). La famille est identifiée par le sigle *n*- ou ω- suivi d'un chiffre indiquant la position de la première double liaison par rapport à l'extrémité méthyle (-CH3) de la chaîne de carbone. Il existe quatre familles d'acides gras insaturés : la famille *n*-9, *n*-7, *n*-6, *n*-3. Ces acides gras peuvent être synthétisés par la cellule à partir de leurs précurseurs, ou apportés par l'alimentation sous forme estérifiée.

Les acides gras alimentaires sont issus de tous les règnes du monde vivant et permettent aux cellules animales d'obtenir l'énergie nécessaire pour leur survie.

3. Biosynthèse des acides gras polyinsaturés (AGPI)

La régulation de la biosynthèse des acides gras se fait par un double système enzymatique qui fabrique continuellement les AGPI *n*-3, *n*-6 et *n*-9. Ces deux enzymes sont les élongases et les désaturases.

Il existe deux grandes familles d'acides gras alimentaires, la famille des acides gras *n*-6 et celle des *n*-3 (Figure1). Les acides gras polyinsaturés (AGPI) de la famille des *n*-6 présents dans la viande et dans les huiles végétales et sont synthétisés à partir de leur précurseur, l'acide linoléique (18:2n-6). L'acide arachidonique (C20:4n-6) est le membre le plus actif de cette famille ; il permet la biosynthèse et l'activation des eicosanoides (prostaglandines, thromboxanes, leucotriènes et lipoxines). Les AGPI de la famille *n*-3 quant à eux, sont contenus dans le poisson et les algues marines. Leurs membres les plus importants sont l'acide docosahexaenoique (DHA; C22:6n-3) et l'acide eicosa-penta-énoique (EPA; C20:5n-3). Le DHA est un composant de la membrane phospholipidique de la plupart des cellules,

particulièrement dans la rétine, le cerveau et les spermatozoïdes. L'EPA intervient dans l'action de différents métabolites dans la voie de la cyclo-oxygénase et celle de la lipoxygenase. Les AGPI des deux familles sont synthétisés en plusieurs étapes, qui impliquent des désaturases et des élongases (Figure1).

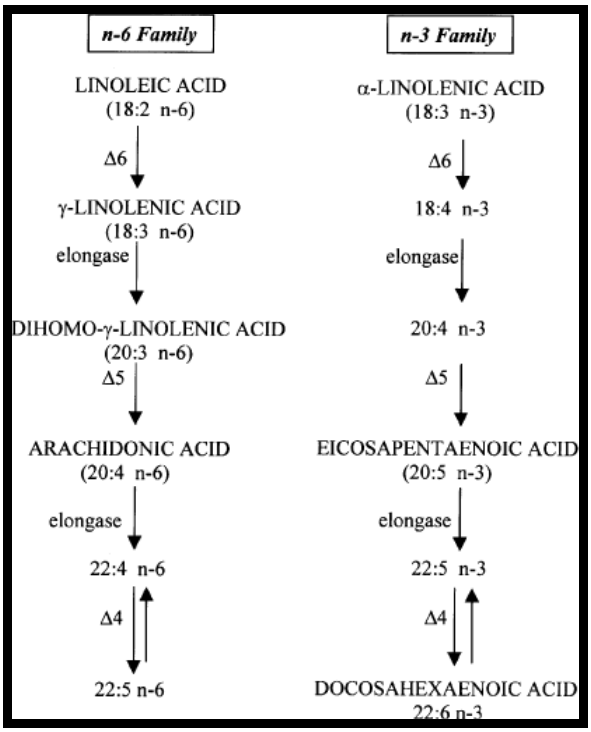

Figure 2: Les deux grandes familles d'acides gras polyinsaturés alimentaires. Les *n*-6 et *n*-3 ont pour précurseurs respectifs l'acide linoléique et l'acide α- linoléique. Deux types d'enzymes interviennent dans les synthèses, les élongases et les désaturases (Δ4, Δet Δ6). Adapté de *www.clinsci.org*.

Les élongases augmentent la longueur de la chaîne, les désaturases augmentent le nombre d'insaturations. Les désaturases agissent dans des régions spécifiques des acides gras de manière aléatoire d'un acide gras à l'autre. Il existe donc une compétition de substrat vis-à-vis de ces enzymes. Il existe cinq désaturases, les Δ9, Δ6, Δ5, communes aux animaux et végétaux et les Δ12, Δ15 spécifiques aux végétaux. Les Δ12, Δ15 sont impliquées dans la synthèse de l'acide linoléique, précurseur des AGPI de la famille *n*-6 et de l'acide α-linolénique, précurseur des AGPI de la famille *n*-3. La compétition de substrat dans les voies de désaturation et d'élongation impose un équilibre d'apport de précurseurs. L'âge de l'organisme et la qualité alimentaire déterminent le potentiel enzymatique. Pour un acide gras plus insaturé, une configuration spatiale complexe est imposée à la molécule. Les phospholipides membranaires s'empilent et augmentent la fluidité membranaire.

4. Aliments et AGPI

4.1. Sources alimentaires des AGPI

Les lipides alimentaires sont présents dans divers produits d'origine animale, les produits laitiers entiers ou partiellement écrémés (beurre, crème, fromage…), dans les viandes (bœuf, agneau, porc…), la charcuterie, et certains poissons (saumon, thon, anguille, anchois…). Les produits d'origine végétale contenant des lipides sont les oléagineux (amandes, noix, arachides…) mais aussi certains fruits ou légumes comme l'avocat sont riches en lipides. L'huile, qu'elle soit végétale ou animale, est constituée entièrement de lipides. De nombreux produits industrialisés, biscuits, gâteaux, confiseries, viennoiseries, fritures, hamburgers, pizzas et plats préparés en général, sont très riches en lipides.

En ce qui concerne les deux principales familles d'acides gras alimentaires, *n*-6 et *n*-3, les AGPI de la famille *n*-6 proviennent essentiellement des huiles végétales et animales (Tableau1). Les huiles de maïs, noix, tournesol contiennent 50 à 70 % d'acide linoléique (C18:2n-6). Quant à l'acide α-linolénique (C18:3n-3) il est contenu essentiellement dans les huiles de soja, de colza et de noix. L'acide α-linolénique peut être formé dans les chloroplastes de phytoplancton. Lorsqu'il est consommé par les poissons, il transforme par une série de réactions de désaturation et d'élongation l'acide α-linolénique en EPA puis en DHA. Les AGPI de la famille *n*-3 sont alors extraits principalement des huiles de poisson (Tableau 2).

Sources alimentaires	Acides gras essentiels (mg/100 g)	
	Acide linoléique (*n*-6)	**Acide α-linolénique** (*n*-3)
Huiles végétales		
- arachide	20 à 29	traces
- colza		90
- maïs	55	
- noix	69 à 78	3 à 13
- olive	7	traces
- pépin de raisin	70	traces
- soja	50 à 60	6 à 10
- tournesol	55 à 65	traces
Graisses animales		
- bœuf	2	0,5
- oie	6,5	
- poisson		contient des dérivés
- porc (saindoux)	8	contient des traces
- beurre	3 à 5	
- lait	4 à 8	
- jaune d'œuf		

Tableau 1 : Teneurs (mg/100g) en acide linoléique et α-linolénique des principales huiles végétales et des graisses animales.

Sources alimentaires	EPA (20:5 *n*-3)	DHA (22:6 *n*-3)
Morue	0,1	**0,2**
Hareng	0,7	**0,9**
Maquereau	0,9	**1,6**
Saumon	0,3	**0,9**
Crabe	0,2	**0,1**
Crevette	0,3	**0,2**
Huître	0,3	**0,2**
Huile de foie de morue	**9,0**	**9,5**

Tableau 2: Proportion (g/100 g) en EPA (20:5 n-3) et DHA (22:6 n-3) de certains aliments d'origine marine. Adapté de Martin (2001**).**

4.2. Notion d'acides gras essentiels

Chez l'homme, les acides gras poly-insaturés à longue chaîne peuvent être apportés par l'alimentation, sous forme estérifiée dans les triglycérides ou les phospholipides, ou synthétisés, par élongation et désaturation successives à partir des deux précurseurs, l'acide linoléique pour la famille *n*-6 et l'acide α-linolénique pour la famille *n*-3. Ces deux acides gras sont donc essentiels pour la santé.

Depuis quelques années, le terme « Oméga 3 » est largement repris par les industriels. Les « Omégas 3 » seraient très bénéfiques d'un point de vue cardiovasculaire.

Les acides gras saturés, sont qualifiés de mauvaises graisses. Ils ne s'oxydent pas au contact de l'air ou de la lumière, mais lorsqu'ils sont excessivement consommés, ils augmentent le taux de transporteur de cholestérol LDL (*Low Density Lipoprotein*) traité de mauvais cholestérol. De part leur faible densité, les LDL se déposent dans les artères et peuvent favoriser l'athérosclérose et provoquer des accidents cardio-vasculaires. Ils sont présents dans la viande, la charcuterie, les produits laitiers gras et le jaune d'œuf.

Les acides gras mono-insaturés lorsqu'ils sont consommés, peuvent abaisser le taux de LDL dans le sang, sans affecter le taux de HDL (*High Density Lipoprotein*), qui récupèrent le cholestérol en excès dans les tissus et le ramènent vers le foie, où il est « recyclé » en acides biliaires. L'huile d'olive, d'arachide et de colza en sont riches.

Quant aux acides gras polyinsaturés (*n*-3 et *n*-6), ils réduisent le taux de LDL, mais aussi de HDL. Leur très forte consommation n'est donc pas si bénéfique. Les huiles végétales comme l'huile de tournesol, de maïs, de pépin de raisin ou de soja mais aussi les poissons gras en sont riches.

La consommation d'un tel acide gras ou un autre soit disant « bénéfique » est donc à relativiser. La seule information certaine est que notre organisme a besoin de ces acides gras (*n*-3 et *n*-6), mais de là en consommer sans limite n'est pas forcément bénéfique, et il faut faire le tri.

Les lipides doivent représenter 30% à 35% de l'apport énergétique total de la ration journalière, les protéines 10% à 14% et les glucides 50% à 55%. Les apports nutritionnels conseillés (ANC) ont été fixées suite à des études épidémiologiques et des enquêtes. Ils visent à équilibrer la balance énergétique. Il est recommandé que le rapport en AGPI de précurseurs *n*-6/*n*-3 tende vers 5, pour limiter la compétition enzymatique pendant la biosynthèse. L'apport quotidien en AGPI de la famille *n*-3 doit être de 0,5g dont 0,1 g de DHA.

		Homme adulte		Femme adulte		Femme enceinte		Femme allaitante		séniors	
Apport énergétique total (Kcal/j)		2200		1800		2050		2250		**1700**	
		g/j	%AET*	g/j	%AET	g/j	%AET	g/j	%AET	g/j	**%AET**
Acides gras saturés		19,5	8	16	8	18	8	20	8	15	**8**
Acides gras monoinsaturés		49	20	40	20	45,5	20	50	20	38	**20**
AGPI	**Acide linoléique (C18 :2 n-6)**	10	4	8	4	10	4,4	11	4,4	7,5	**4,4**
	Acide linoléique (C18 :3 n-3)	2	0,8	1,6	0,8	2	0 ,9	2,2	0,9	1,5	**0,9**
	AGPI-LC	0 ,5	0,2	0,4	0,2	1	0,4	1	0,4	0,4	**0,4**
	DHA	0,12	0 ,05	0,1	0 ,05	0,25	0,1	0,25	0,1	0,1	**0,1**
Apport lipidique total		**81**	**33**	**66**	**33**	**76,5**	**33,7**	**84,2**	**33,7**	**62,5**	**33,7**

Tableau 3: Synthèse des apports nutritionnels conseillés en acides gras selon les sujets. *AET= apport énergétique total. Adapté de Martin (2001).

4.3. Fonctions des acides gras alimentaires

S'il existe des acides gras essentiels pour l'organisme, les acides gras doivent jouer en général un rôle très important. En effet, en dehors du rôle incontournable dans l'apport énergétique, les acides gras sont impliqués dans la structure et signalisation cellulaires, et dans l'expression génique. Nous décrivons brièvement ci-dessous quelques fonctions des AGPI.

4.3.1. Rôle de lipides de constitution

Les membranes cellulaires sont constituées d'une double couche phospholipidique. Les AGPI essentiels, LA (C18 :2 *n*-6), AA (C20:4 *n*-6), DHA (C22 :6 *n*-3), et les acides gras mono insaturés, OLA (C18 :1 *n*-9), en sont les constituants fondamentaux. Les acides gras insaturés permettent la fluidité membranaire et régulent l'activité des protéines, enzymes, récepteurs, transporteurs, canaux, de la membrane plasmique. Les acides gras saturés, en association avec le cholestérol dans les cellules animales ou les sphingolipides dans les cellules végétales, favorisent la formation de zones rigides telles que les radeaux lipidiques (*lipids rafts*) et les calvéoles, qui régulent l'activité des protéines membranaires.

D'après Otten *et al*., (1997), le régime alimentaire détermine la distribution des phospholipides membranaires. En effet, lorsque les phospholipdes sont saturés, la membrane cellulaire est rigide, et lorsque le taux de cholestérol est élevé, la fluidité de la membrane diminue pareillement.

4.3.2. Rôle énergétique

Le rôle énergétique des acides gras a déjà été montré. Tous les acides gras sont une bonne source d'énergie, car les liaisons qu'ils possèdent, libèrent de l'énergie cellulaire lorsqu'elles sont rompues par action enzymatique. 1 gramme de lipides fournit 9 kilocalories à l'organisme. Une grande partie de l'énergie fournie est stockée sous forme de réserves disponibles.

4.3.3. Rôle régulateur de l'activité cellulaire

Certains acides gras polyinsaturés, les essentiels, jouent un rôle de précurseurs des éicosanoides, prostaglandines, leucotrènes, thromboxanes et prostacyclines. L'acide arachidonique est le principal précurseur des éicosanoides. L'action de la phospholipase A_2 sur un phospholipide membranaire libère un acide gras et un lysophospholipide. La transformation en produit actif est assurée par les oxygénases. Les cycloxygénases forment les prostanoïdes (prostaglandines, prostacyclines et thromboxanes) et les lipoxygénases forment les leucotriènes. Les produits de ces précurseurs sont impliqués dans diverses fonctions cellulaires telles que l'inflammation, la cicatrisation, la coagulation, ou les réponses immunitaires.

Les acides gras polyinsaturés sont des régulateurs de la transduction d'un stimulus cellulaire. L'acide arachidonique peut agir comme second messager activateur de la PKC, régulatrice de fonctions cellulaires (Nishizuka, 1988). Les AGLC peuvent réguler l'expression génique (Niot *et al*., 1997). Des facteurs de transcription tels que le PPAR (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*), participent à la régulation de gènes du métabolisme lipidique ou de la β oxydation dans le foie par les AGPI (Dreyer *et al*., 1993). Les récepteurs comme LXR (*Liver X Receptor*) impliqué dans la lipogenèse, ont pour antagonistes des AGPI qui bloquent son activation de manière compétitive.

4.3.4. Effets de la consommation des AGPI sur la santé

Bien que les AGPI de la famille *n*-3 et ceux de la famille *n*-6 soient métabolisés par les même désaturases, ils n'ont pas le même effet sur l'organisme.

4.3.4.1. Effets bénéfiques des AGPI de la famille n-3

L'acide docosahexaénoïque (DHA) est un acide gras à 22 atomes de carbone, comportant 6 doubles liaisons, dont la première se situe au niveau du 3eme atome de carbone à partir de l'extrémité –CH3. Il appartient donc à la famille *n*-3 et est symbolisé 22 : *n*-3. Sa consommation, ainsi sue les membres de la même famille, prévient l'installation et la progression de diverses pathologies

4.3.4.1.1 Cardio-protecteur

Les acides gras de la famille *n*-3 sont favorables à la prévention de maladies cardio-vasculaires (Kromann et Green, 1980; Kromhout, 1989). Parmi les actions cardio-protectrices, il y a la prévention des arythmies, l'action anticoagulante, la modulation de la croissance cellulaire dans la paroi des artères, l'amélioration de l'hémodynamique vasculaire, et la régulation de la pression artérielle.

Le cholestérol est un composant indispensable de la cellule qui participe à la structure de la membrane plasmique des cellules. Le cholestérol est aussi indispensable dans la formation de la bile, de certaines hormones et de divers composés comme la vitamine D. la différentiation du cholestérol se fait par rapport aux lipoprotéines responsables de son transport. On distingue les HDL (*High Density Lipoprotein*), qui part leur forte densité accumulent et débarrassent les artères des dépôts lipidiques ; les LDL (*Low Density lipoprotein*) et VLDL (*very low density lipoprotein*) quant à eux, leur faible densité provoque une accumulation des vésicules de cholestérol et la formation des plaques d'athérosclérose.

Les acides gras de la famille *n*-3 diminuent les triglycérides plasmatiques (action hypolipidémiante) et limitent la synthèse de lipoprotéines de très faible densité, VLDL mais favorisent celle des lipoprotéines de haute densité, HDL. (Fumeron *et al*., 1991. Sanchez-Muniz *et al*., 1999). A ces actions s'ajoutent des effets vasodilatateurs exercés par ces acides gras sur les endothéliums (De Caterina *et al*., 2000).

4.3.4.1.2. Anticancéreux

DHA et l'EPA peuvent inhiber le développement de certains cancers. Les huiles de poissons inhibent la croissance tumorale et la prolifération des métastases de cancérogenèse mammaire (Carroll, 1992). L'acide α-linolénique (ALA) mais aussi de façon moindre l'EPA et le DHA, ont un effet inhibiteur de la croissance des tumeurs mammaires et des métastases. Les effets anticancéreux des acides gras sont liés à la régulation des cellules tueuses ou à l'effet apoptotique des AGPI (Reddy *et al.*, 1992).

4.3.4.1.3. Effets sur le système nerveux central

Le DHA est présent dans les cellules nerveuses du système nerveux central. Il serait impliqué dans la capacité d'apprentissage et d'attention chez les rats et les singes (Lauritzen *et al.*, 2001). Des anomalies du métabolisme des AGPI favorisent le développement de certains troubles psychiatriques, la schizophrénie (Horrobin, 1998), la dépression (Bruinsma et Taren, 2000), et l'hyperactivité infantile (Burgess *et al*., 2000). Ces anomalies peuvent être des modifications des propriétés memebranaires qui affectent la neurotransmission. La carence en AGPI *n*-3 agit sur la libération de la dopamine et la sérotonine (Chalon *et al.*, 2001).

4.3.4.1.4. AGPI *n*-3 et apoptose

L'AA, l'EPA, le DHA induisent de manière spécifique, l'apoptose des cellules tumorales (Calviello *et al*., 1998). Cette action dépendrait de la capacité des acides gras à produire des radicaux libres et de la peroxydation lipidique (Das *et al*., 1991). DHA et EPA associés aux acides gras saturés tels que l'acide palmitique (16:0), peuvent, à contrario avoir un effet protecteur contre le processus d'apoptose dans les cellules normales (Calviello *et al.*, 1998). Le mécanisme d'action du DHA dans la régulation de l'apoptose est encore mal connu. Toutefois, l'implication de l'activation de la protéine Fas des cellules Jurkat-T a été montrée (Zhou *et al*., 1998). Le déclenchement de l'apoptose nécessite le système Fas/Fas Ligand dans plusieurs types cellulaires. En présence de DHA, l'expression de Fas et la sécrétion de son ligand sont augmentées (Siddiqui *et al.*, 2001).

4.3.4.1.5. AGPI *n*-3 et acuité visuelle

Le DHA est très accumulé dans la rétine. Une carence de DHA entraine des anomalies dans l'électrorétinogramme et povoque la diminution de l'acuité visuelle chez le singe (Neuringer *et al.*, 1986). Le DHA serait essentiel pour le maintient et la différentiation des photorécepteurs au cours du développement (Polit *et al*. 2001).

4.3.4.1.6. Action des AGPI *n*-3 sur le système immunitaire

Les acides gras alimentaires *n*-3 ont une variété d'effets anti-inflammatoires et immunomodulateurs (Mori et Beilin, 2004). Ces effets pourraient intervenir dans l'athérosclérose et ses manifestations cliniques, telles que l'infarctus du myocarde, la mort subite, et les accidents vasculaires cérébraux. Certains travaux sur l'obésité révèlent qu'une

inflammation chronique est la conséquence d'une trop grande accumulation d'énergie par l'organisme (Ye et Keller, 2010).

4.3.4.2. Effets controversés des AGPI de la famille *n*-6

Les effets bénéfiques des AGPI *n*-6 avaient été reconnus. Toutefois, certains travaux suggèrent que leur consommation excessive pourrait inverser les effets bénéfiques et provoquer des risques cardio-vasculaires (Rothrock et Foster, 1990).

Dans le développement des tumeurs, en l'absence des *n*-3, les acides gras *n*-6, sont des promoteurs de cancer du sein. Les acides gras *n*-3 n'exercent pas leur effet inhibiteur sur ce cancer lorsque l'apport en *n*-6 est trop élevé. Les effets anti-tumoraux des acides gras *n*-3 sont visibles lorsque les apports sont équivalents. Les acides gras *n*-3 exerceraient une action antagoniste sur une stimulation tumorale induite par les *n*-6.

5. Hydrolyse des lipides alimentaires

Les acides gras alimentaires doivent être hydrolysés par des lipases digestives durant le processus d'absorption. Durant ce processus, les lipases libèrent les acides gras dans la cavité buccale (Figure3) pour permettre leur interaction avec les récepteurs du goût (Kawai et Fushiki, 2003). Il a été observé chez le rat (Hamosh et Scrow, 1973, a, b) puis chez l'homme et la souris (Hamosh et Burns, 1977 ; DeNigris, 1988) que la lipase linguale est secrétée par les glandes de Von Ebner dans la cavité buccale. La muqueuse gastrique libère elle aussi une lipase gastrique, d'une séquence identique à celle de la lipase linguale, (Barrowman, 1970). La lipase gastrique dont l'activité ne représente que 10 % à 30 % de l'activité lipasique chez l'Homme, permet la digestion des triacylglycérides (Hamosh et Burns, 1977 ; Hamosh et Scrow, 1973, a). Il existe une lipase pancréatique très active (Roy *et al*., 1979). Toutes les lipases ont une action corrélée pour permettre la détection des produits issus de la lipolyse et pour permettre leur digestion.

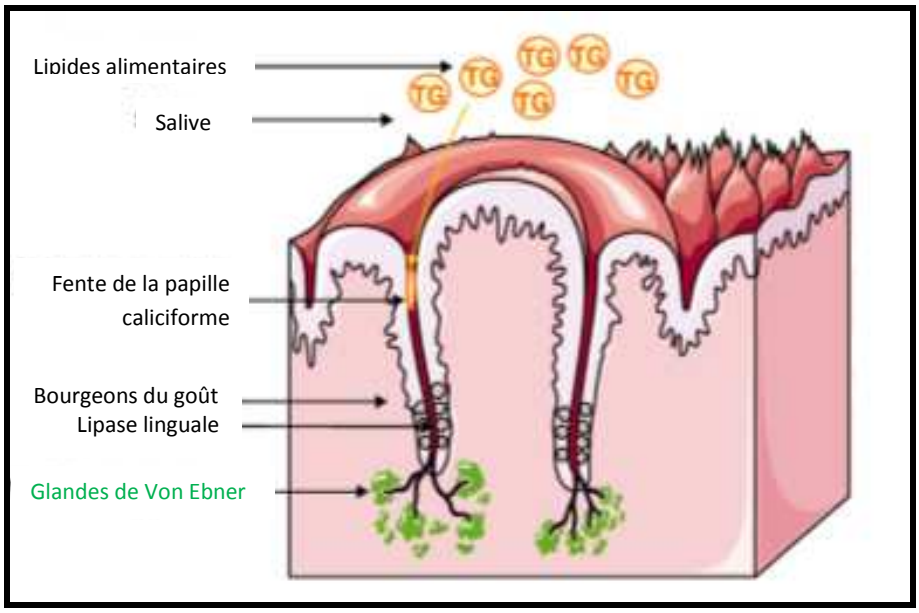

Figure 3: Localisation des glandes salivaires. Il existe un grand nombre de plus petites glandes salivaires dans la langue, les joues, les lèvres et le palais, comme les glandes de von Ebner, à l'arrière. Illustration adaptée de Naim Khan.

6. Digestion des AGLC

La digestion et l'absorption des lipides est un processus rendu complexe par le caractère hydrophobe des triglycérides. La digestion des AGLC comprend la digestion intraluminale, le captage des produits de digestion à travers la membrane entérocytaire, la re-synthèse des lipides au sein de l'entérocyte, l'assemblage et la sécrétion des chylomicrons dans le système lymphatique puis dans la circulation sanguine.

Dans l'estomac, les lipides sont dispersés par brassage mécanique, et des gouttelettes lipidiques de 0,5 µm de diamètre sont formées. Les triglycérides sont hydrolysés partiellement en sn-1,2-diacylglycérol et en acides gras libres par la lipase gastrique (Moreau *et al.*, 1988).

Dans l'intestin proximal, les acides gras contenus dans le chyme gastrique stimulent les sécrétions biliaires et pancréatiques *via* l'action de la CCK. Les sels biliaires et les phospholipides solubilisent les triglycérides et les produits d'hydrolyse pré-duodénale pour favoriser les réactions lipolytiques. La lipase pancréatique issue du pancréas exocrine achève l'hydrolyse qui stimulée par la CCK. La CCK catalyse en présence d'une colipase, l'hydrolyse des triglycérides en position *sn*-1 et *sn*-3 et libèrent deux acides gras et un 2-monoglycéride. La solubilisation micellaire est une étape indispensable dans l'absorption des lipides. Elle facilite le transport des lipides dans la phase aqueuse intraluminale et au travers de la couche d'eau non agitée jusqu'à la membrane apicale des entérocytes.

7. AGLC et comportement alimentaire

L'activation des récepteurs du goût entraine la transmission de l'information au cerveau via le noyau du tractus solitaire puis par la suite, des secrétions intestinales (Khan et Besnard, 2009). Chez les rongeurs, il existe une attraction spontanée pour les aliments enrichis en lipides (Hamilton, 1964). Les souris, peuvent reconnaitre des acides gras alimentaires sans texture ni odeur (Saitou et *al.* ; 2009). La section du nerf gustatif chez la souris annule toute détection ou préférence (Stratford *et al.*, 2006 **;** Gaillard *et al.,* 2008). Des comportements similaires existent chez l'homme (Mattes, 2009). En effet, chez les humains, lorsqu'on minimise l'olfaction en bouchant le nez ou lorsqu'on modifie la texture, les acides gras alimentaires possèdent toujours une saveur (Chale-Rush *et al.,* 2007).

7.3. Généralités sur le comportement alimentaire

Le comportement alimentaire peut être défini par l'ensemble des facteurs qui déterminent la disponibilité des aliments et l'intérêt que leur porte un individu.

Plusieurs types de facteurs peuvent réguler le comportement alimentaire chez l'Homme. Les facteurs peuvent être d'ordre psychologique, le stress ou les émotions. En effet, autant une déception peut nous pousser à consommer d'avantage d'aliment, qu'un stress peut nous faire perdre l'appétit. Les facteurs socio culturels font apparaitre les différences entre les cultures. La consommation des repas rapides « *fast food* » dans les pays nord-américains ou dans les pays occidentaux en général, diffère radicalement de la forte consommation de poisson par les Japonais. Les facteurs environnementaux sont décrits par l'abondance et la composition des aliments. En effet, alors qu'il était indispensable jadis de se déplacer pour s'alimenter, de nos jours il est aisé de manger en restant dans son fauteuil, devant un écran de télévision. Des facteurs socioéconomiques, prennent donc de l'ampleur dans la détermination du comportement alimentaire. Pour finir, l'exemple d'un facteur religieux serait le fait de faire le jeûne musulman durant tout un mois dans l'année ; cette privation détermine la prise alimentaire quotidienne.

7.3.4. Principes de la prise alimentaire

La principale fonction physiologique de la prise alimentaire est d'assurer l'apport énergétique nécessaire à l''organisme. Ce phénomène est sujet à diverses régulations. La prise alimentaire a lieu pendant la période d'activité des organismes. Pendant la phase de repos, ceux-ci observent une période de jeûne, la régulation de la prise alimentaire est donc circadienne. En effet, dans la journée, les espèces diurnes comme l'Homme s'alimentent alors que les espèces

nocturnes comme le rat et la souris se reposent et jeûnent. La nuit pendant que les espèces diurnes jeûneront durant leur sommeil, les espèces nocturnes s'alimenteront.

7.3.5. Régulation de la prise alimentaire

Un épisode de prise alimentaire (Figure4) comprend une phase d'ingestion des aliments, caractérisée par la sensation de faim, une phase dite prandiale de prise alimentaire, qui est supposée tendre vers un rassasiement et une phase post prandiale, pendant laquelle on ressent une sensation de satiété, ce, jusqu'au prochain repas.

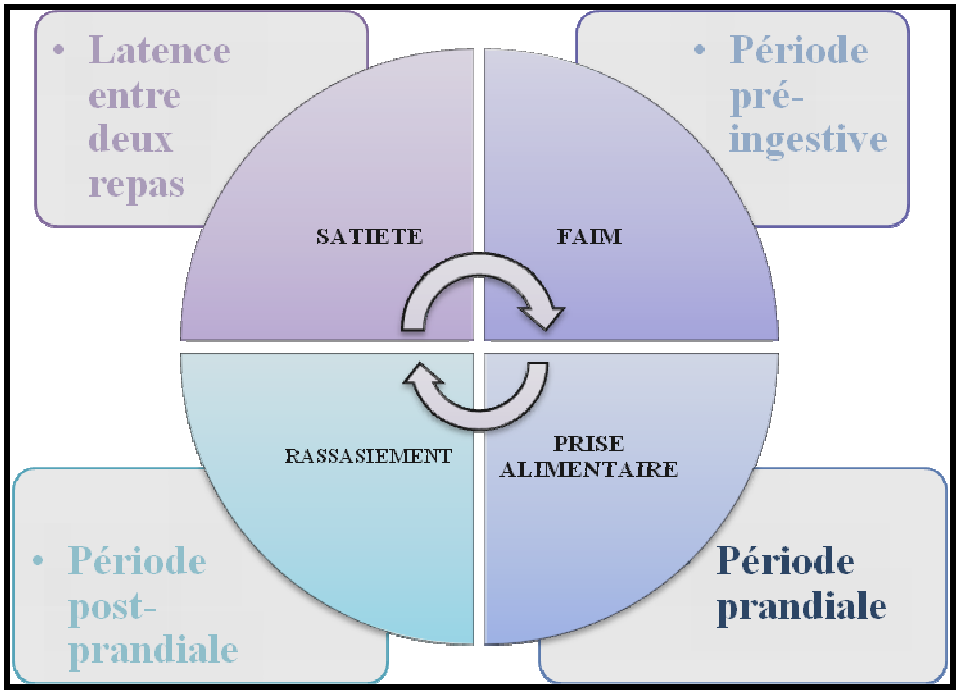

Figure 4: Les différentes phases d'un épisode de prise alimentaire.

Il existe un système de reconnaissance et de mémorisation lors de l'ingestion d'un nouvel aliment. C'est la composante cognitive ou « *learning* » de la prise alimentaire. La prise alimentaire peut répondre à un système de récompense. En effet, les actions que nous menons en vue de nous alimenter ont besoin d'être motivées. En général, la survie de l'espèce nécessite une motivation. Cette motivation représente la composante motivationnelle ou « *wanting* ». Si l'aliment ingéré est apprécié, on en reprendra. C'est la composante d'appréciation ou « *liking* » de la prise alimentaire.

7.4. Physiologie du comportement alimentaire

L'émission de signaux nerveux, hormonaux et métaboliques vers le système nerveux central permet l'intégration des paramètres de prise alimentaire, la faim ou la satiété. Lors du choix des aliments, les individus peuvent faire appel à leur souvenir, ou faire preuve de curiosité.

Dans les deux cas, la composition des aliments mobilisent les sens visuel, olfactif, et parfois tactile de l'individu pour faire son choix. Au cours des premières secondes de la mise en bouche, la texture, la température, le caractère épicé, s'ajoutent aux perceptions olfactive et gustative pour induire un stimulus neuroendocrinien. Tous ces phénomènes peuvent déclencher une prédigestion, par la sécrétion d'enzymes de digestion.
Les informations somato-sensorielles déterminent la préférence ou l'aversion, mais aussi le comportement alimentaire en général.

7.4.4. Les centres régulateurs de la prise alimentaire

Le comportement alimentaire est régulé par le système nerveux central chez les mammifères.

7.4.4.1. L'hypothalamus

L'hypothalamus joue un rôle majeur dans la régulation de la prise alimentaire (Figure5). Certains de ses noyaux, le noyau arqué (ARC), le noyau para ventriculaire (PVN), le noyau ventro-médian (VMN) et enfin l'hypothalamus latéral (LH) y sont impliqués.
Les messages circulants de satiété et de faim sont intégrés grâce au noyau arqué. Il contient deux types de neurones impliqués, les neurones à neuropeptide Y (NPY) et Agouti-Related Protein (AgRP) ou encore neurones NPY-AgRP ont une action orexigène ; les neurones à pro-opiomélanocortine (POMC) sécrètent eux l'α-MSH (*α-melanocyte-stimulating-hormone*) et le CART (*Cocain and Amphetamine Related Transcript*). Ils sont ainsi appelés neurones POMC/CART et sont de puissants répresseurs de la prise alimentaire. Les neurones NPY/AgRP et les neurones POMC/CART s'inhibent en produisant du GABA (*γ-amino butyric acid*) (Horvath, 2005).

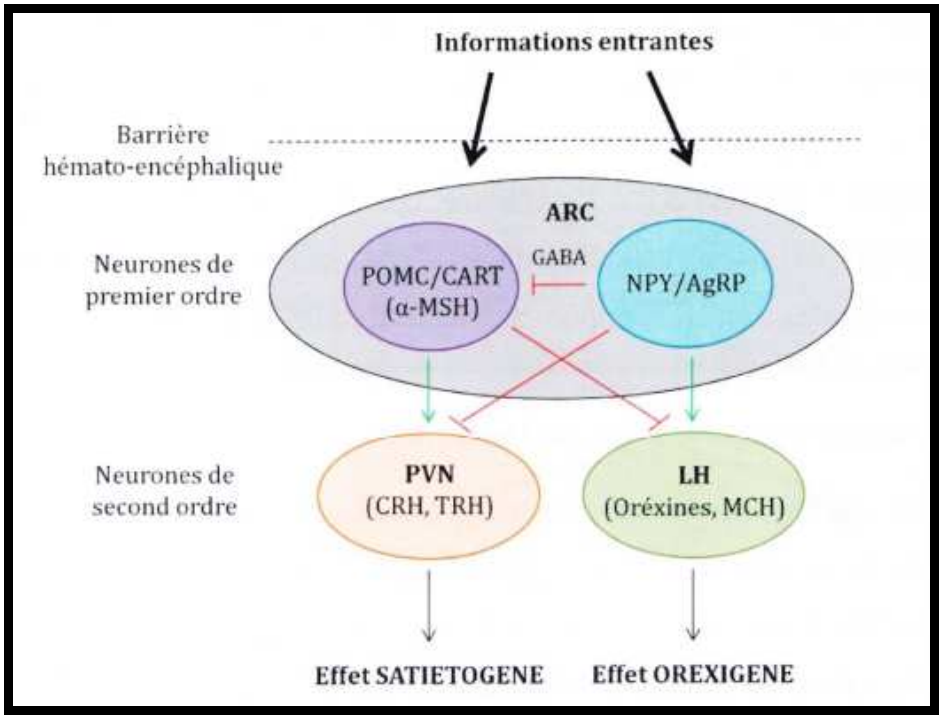

Figure 5: Le système mélanocortine central hypothalamique. α-MSH, a-melanocyte-stimulating-hormone ; AgRP, Agouti-Related Protein; ARC, noyau arqué ; CART, Cocain and Amphetamine Related Transcripl, CRH, corticotropin *releasing hormone* ; GABA, *γ-amino butyric acid* ; LH, *hypothalamus latéral*, MCH, *melanin concentrating hormone* ; NPY, *neuropeptide Y* ; POMC, proopiomélanocortine; PVN, noyau paraventriculaire ; TRH, thyrotropine releasing hormone. Illustration adaptée de P. Besnard.

Dans les autres régions de l'hypothalamus, d'autres neurones peuvent jouer un rôle secondaire dans la prise alimentaire. Ces sont les neurones du PVN, du LH ou du VMN. Les neurones du PVN expriment le récepteur aux mélanocortines MC4R. Son activation par l'α-MSH issue du gène codant pour POMC, active à son tour le PVN. Des peptides anorexigènes comme la CRH (*corticotropin releasing hormone*) et la TRH (*thyrotropine releasing hormon*) sont libérés. La prise alimentaire est abrogée et la dépense énergétique stimulée. L'AgRP, un antagoniste endogène du MC4R, stimule par contre la prise alimentaire. L'activation des neurones NPY/AgRP va activer la synthèse de l'hormone orexigène MCH via les mêmes neurones. La prise alimentaire est ainsi régulée par ces phénomènes contraires.

7.4.4.2. Les autres centres

Dans le système nerveux central, des régions autres que l'hypothalamus interviennent dans le contrôle du comportement alimentaire, tout en restant connectées avec celui-ci. Le Noyau du Tractus Solitaire (NTS), le noyau para brachial, le thalamus ou encore l'amygdale sont ces centres extra-hypothalamiques. Le NTS intègre les informations d'origine vagale et sensorielle. C'est le premier relais central gustatif. Le thalamus est impliqué dans la

perception hédonique. L'amygdale est impliquée dans les comportements motivationnels, émotionnels et d'apprentissage (Smith et St John, 1999). Le système nerveux central est le centre de commande des signaux déterminants du comportement alimentaire (Figure6).

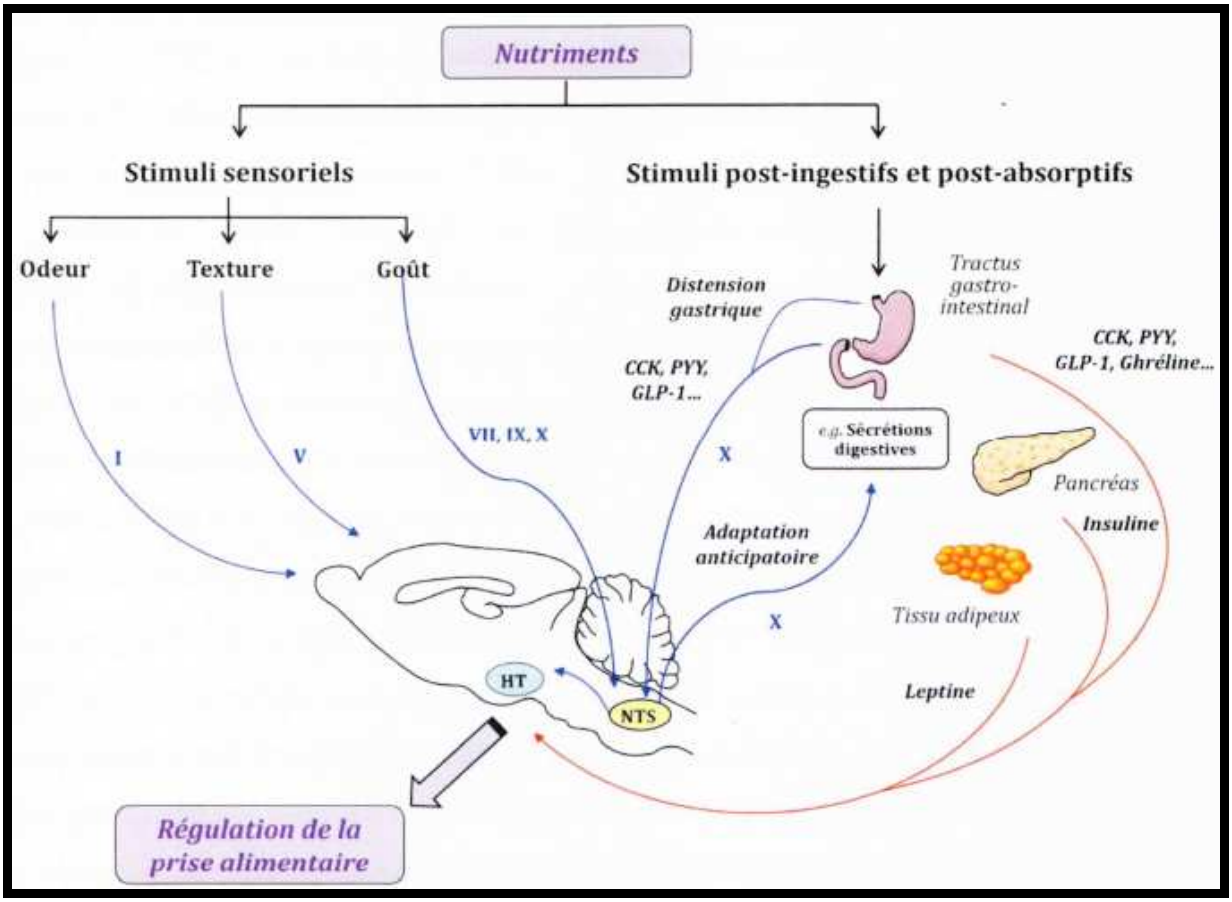

Figure 6: Représentation schématique du contrôle de la prise alimentaire par les nutriments I, nerf olfactif ; V, nerf trijumeau ; VII, corde du tympan ; IX, nerf glossopharyngien ; X, nerf vague ; CCK, cholécystokinine; GLP-l glucagon-like peptide- 1 ; PYY, peptide YY ; HT, hypothalamus ; NTS, noyau du tractus solitaire. ─ voie nerveuse ; ─ voie humorale. Adapté de Gaillard *et al*., (2008).

7.4.5. Le rôle des réserves énergétiques dans la régulation de prise alimentaire

La leptine et I'insuline sont libérées proportionnellement à la masse adipeuse. La leptine est une hormone principalement produite par les adipocytes et est régulée par la masse grasse de l'organisme (Considine *et al.*, 1996). Elle inhibe la prise alimentaire et accroît la dépense énergétique chez les mammifères (Friedman et Halaas, 1998). L'insuline est l'hormone hypoglycémiante des cellules β du pancréas. L'insuline peut inhiber au niveau hypothalamique la prise alimentaire (Benoit *et al.*, 2004) via les neurones POMC/CART. L'insuline circulante est proportionnelle à la masse du tissu adipeux (Benoit *et al*., 2004). La

ghréline, un facteur d'origine post-absorptive diminue chez les sujets obèses et augmente après un perte de poids (Stylianou *et al*., 2007 ; Scheid *et al*. , 201l) (Figure7).

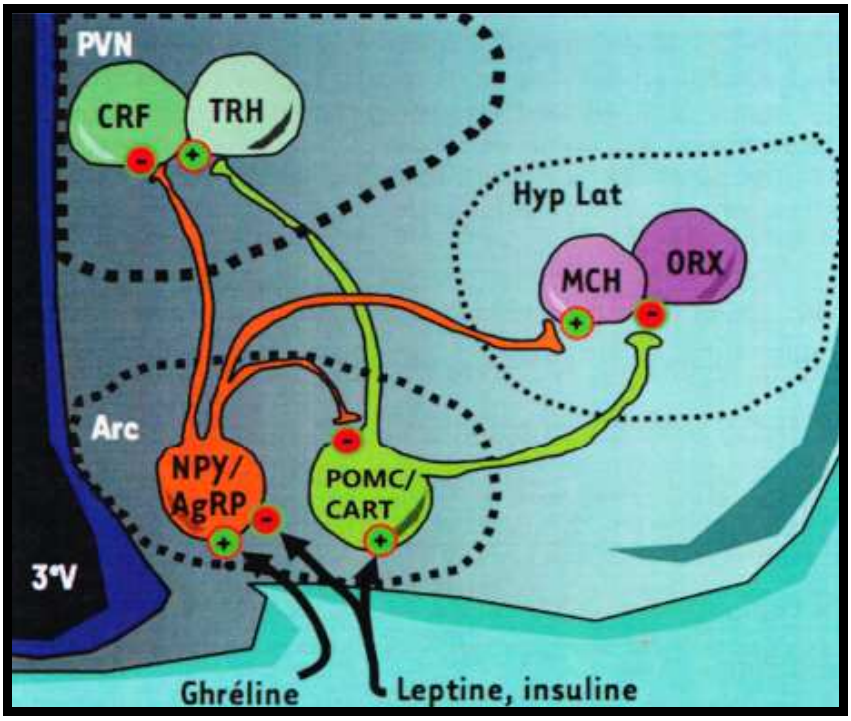

Figure 7: Modulation du système mélanocortine central hypothalamique par des facteurs circulants : leptine, insuline et ghréline. D'après Luquet (2008).

7.5. Régulation du comportement alimentaire par les lipides

L'Homme et les mammifères en général ont une attraction spontanée pour les aliments riches en graisses. Dès les premiers moments de sa vie, un bébé tète avec plus de force un lait supplémenté en lipides qu'un lait pauvre en graisses (Nysenbaum et Smart, 1982).

L'attraction des lipides alimentaires favorise leur consommation. Et lorsqu'elle n'est pas associée à une dépense énergétique suffisante, la consommation des aliments riches en graisses provoque le développement de maladies métaboliques. Ce phénomène bien qu'aussi simplement décrit fait appel à des signaux d'origine oro-sensorielle, post-ingestive et post-absorptive.

7.5.4. Action satiétogène

L'ingestion des aliments riches en graisses, déclenche comme pour d'autres aliments la secrétion de produits satiétogènes comme la cholécystokinine, pour limiter la prise alimentaire. La cholécystokinine (CCK) est produite par les cellules intestinales entéroendocrines de type I. D'autres agents satiétogènes tels que le GLP (*glucagon-like*

peptide-l) et le peptide YY dont les récepteurs sont exprimés par le nerf vague. Ces agents sont secrétés par l'iléon suite à une charge lipidique. Le nombre de récepteurs de la CCK, CCK1-R et CCK2-R, diminue après une très forte consommation de lipides (Raybould, 2007). L'intestin grêle peut secréter un médiateur lipidique endogène de la famille des endocannabinoïdes, l'oléoyl-éthanolamide (OEA) (Rodriguez de Fonseca *et al*., 2001). La libération d'OEA est proportionnelle à la présence d'aliments ingérés. Cette libération est induite en présence d'acides gras et a pour substrat l'acide oléique. L'OEA a une action satiétogène via le nerf vague. (Rodriguez de Fonseca *et al*., 2001). La consommation de lipides peut donc moduler le comportement alimentaire directement dans le système nerveux central. Cette régulation est si directe, que l'injection dans le système nerveux central d'acide oléique inhibe la prise alimentaire chez le rat (Obici *et al*., 2002). Cet effet anorexigène serait contrôlé par des neurones spécifiques sensibles aux acides gras dans l'hypothalamus (Wang *et al.*, 2006).

L'action anorexigène des acides gras au niveau hypothalamique peut s'expliquer soit, par la β-oxydation mitochondriale des acides gras, soit par l'accumulation des acides gras dans le cytoplasme. Toutefois, les canaux potassiques sensibles à I'ATP (K_{ATP}) peuvent être impliqués, du fait de leur sensibilité aux acides gras et au ratio ATP/ADP.

7.5.5. Consommation lipidique et sentiment de récompense

La palatabilité, le plaisir et le bien-être que procure la consommation d'un aliment prédisposent à sa consommation ultérieure. Un test de préférence peut être réalisé en associant à des drogues addictives, la consommation d'acides gras. Généralement l'attraction pour les aliments gras répond aux critères d'un phénomène d'addiction, semblables à ceux qui motivent la recherche de sensations euphorisantes. Lorsqu'on habitue des rats à une consommation régulière d'huile de maïs, la POMC et l'orexine sont plus exprimées dans l'hypothalamus, et la β-endorphine, un opioïde dérivé de POMC est fortement exprimée dans le sérum et le fluide cérébrospinal (Mizushige *et a1*., 2006). L'action régulatrice de la consommation lipidique a été observée pour deux autres peptides opiacés, la dynorphine et la β-encéphaline (Chang *et al.*, 2007).

En conclusion, certains opiacés stimuleraient la consommation lipidique, puis la synthèse de peptides régulateurs du comportement alimentaire.

8. Conclusion

La consommation de ces AGPI et des acides gras est en général modulée par plusieurs systèmes physiologiques. Le changement de mode de vie observé depuis la fin des années 50 a introduit de nouveaux facteurs dans la modulation du comportement alimentaire (Figure8).

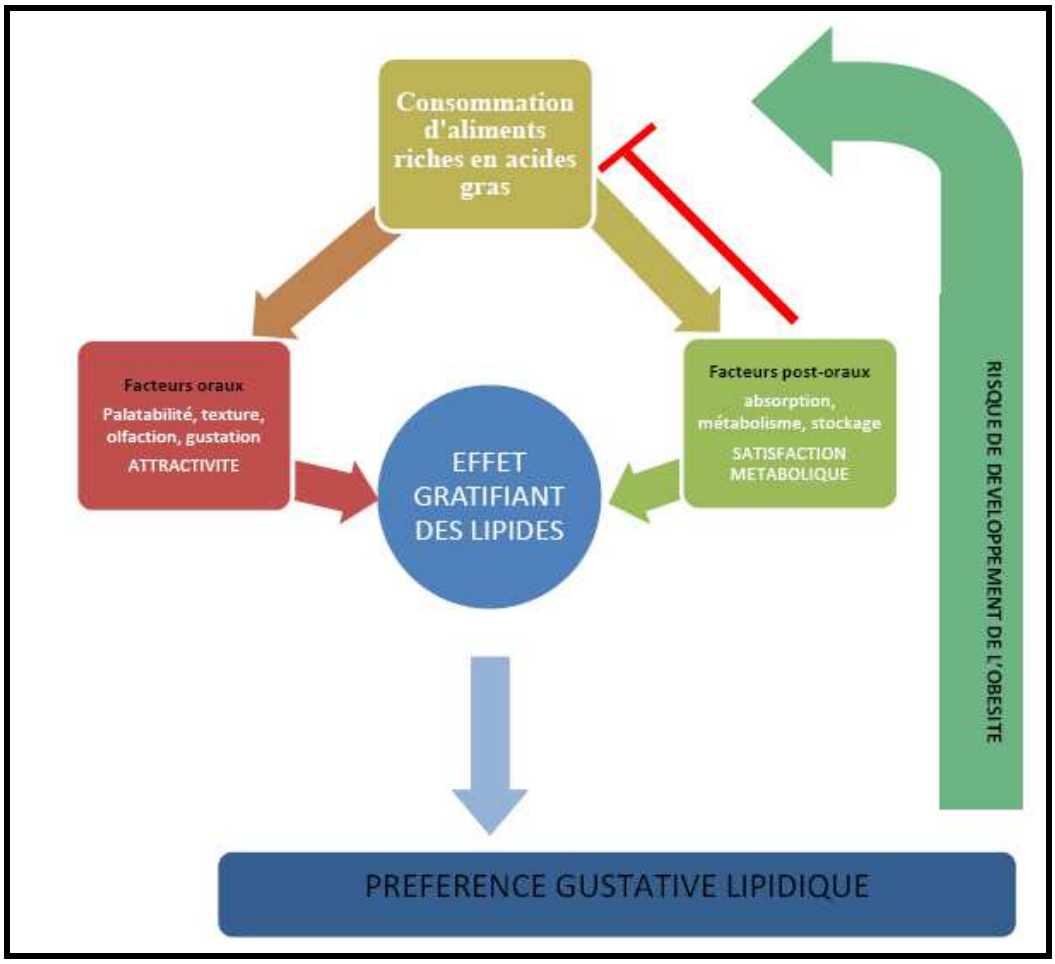

Figure 8: Schéma récapitulatif des facteurs influençant la préférence lipidique. Les facteurs oraux et post oraux déclenchés par l'ingestion d'aliments gras développent la préférence gustative lipidique associée à un effet gratifiant des lipides. Les facteurs post-oraux peuvent avoir un faible rétrocontrôle négatif sur la consommation. La préférence gustative lipidique a un rétrocontrôle positif sur la consommation des aliments gras.

De nos jours la qualité des aliments que nous ingérons déterminent notre état de santé. La prise alimentaire est contrôlée par des phénomènes semblables à la consommation de substances addictives. Suite à l'augmentation de la consommation d'aliments riches, pouvons-nous penser que le choix de notre alimentation répond désormais à une addiction ?

Pour répondre à cette question, il est nécessaire de comprendre comment nous percevons l'information gustative, notamment celle relative aux aliments gras.

Avant d'éclaircir les mécanismes de la signalisation cellulaire permettant la perception de l'information gustative lipidique, nous allons étudier une famille d'enzymes dont nous avons montré le rôle clé dans cette signalisation. Le chapitre suivant sera donc consacré à l'étude de la grande famille des phospholipases A_2.

Chapitre 2 : Les phospholipases A_2

1. Introduction

Les acides gras polyinsaturés incorporés dans les phospholipides membranaires peuvent être hydrolysés par l'action des phospholipases. Ces enzymes hydrolysent les liaisons esters des phospholipides. Il existe plusieurs liaisons esters dans un phospholipide : entre l'acide gras et le glycérol, entre le glycérol et le phosphate, et enfin entre le phosphate et l'alcool (choline, éthanolamine, sérine, glycérol, inositol, ...).

Au XIXe siècle, la grande famille des phospholipases A_2 (PLA_2), a initié l'identification des actions lytiques du venin de serpent, mais c'est seulement à la fin des années 80 que des activités semblables à celles des PLA_2 ont été observées à l'intérieur de cellules de mammifères, en contradiction avec les activités extracellulaires observées dans le venin et le pancréas.

Les phospholipases A_2 catalysent l'hydrolyse en position *sn*-2 des phospholipides, libérant un acide gras et un lysophospholipide (Figure9).

Le développement de nouvelles techniques biologiques a permis de montrer l'implication de ces enzymes dans de très nombreuses fonctions cellulaires. De même, les PLA_2, par leur action favorisent ou retardent le développement de nombreuses pathologies. Leur intérêt dans ce travail, est relatif à la régulation de la signalisation calcique des cellules gustatives.

Dans ce chapitre, nous présenterons les six types de PLA_2 et pour chacun d'eux, les différentes formes, les groupes, les sous-groupes et les mécanismes d'action. La structure et les interactions avec les membranes, les propriétés biologiques et l'implication dans diverses pathologies seront présentées en plus de divers inhibiteurs sélectifs développés. Toutefois, la nomenclature utilisée devient obsolète de nos jours, car il s'est avéré que classer les PLA_2 uniquement comme suit, cytosolique, calcium indépendant, PAF-AH et lysosomale, s'avère insuffisant. En effet, quatre des catégories sont des enzymes intracellulaires (cytosoliques). Les enzymes secrétées ont une action intracellulaire dans plusieurs vésicules et les PAF-AH, lysosomale, et certaines $cPLA_2$ sont aussi Calcium indépendants. La nomenclature des groupes que nous utilisons également dans le cadre de ce travail fournit une classification un peu moins ambiguë.

2. Généralités sur les Phospholipases

Les quatre liaisons esters du phospholipide définissent les familles de phospholipases. Les phospholipases A_1 (PLA_1) libèrent l'acide gras en position *sn*-1 du glycérol et forment un lysophospholipide. Les phospholipases A_2 (PLA_2) libèrent l'acide gras en position *sn*-2 du glycérol et forment un lysophospholipide. Les phospholipases C (PLC) hydrolysent les phospholipides contenant un inositol, en particulier le phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate (PIP_2) libérant ainsi deux seconds messagers, le diacylglycérol (DAG) et l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3). Les phospholipases D (PLD) hydrolysent l'alcool de la fonction acide du phosphate, libérant ainsi un acide phosphatidique et un alcool (Figure9).

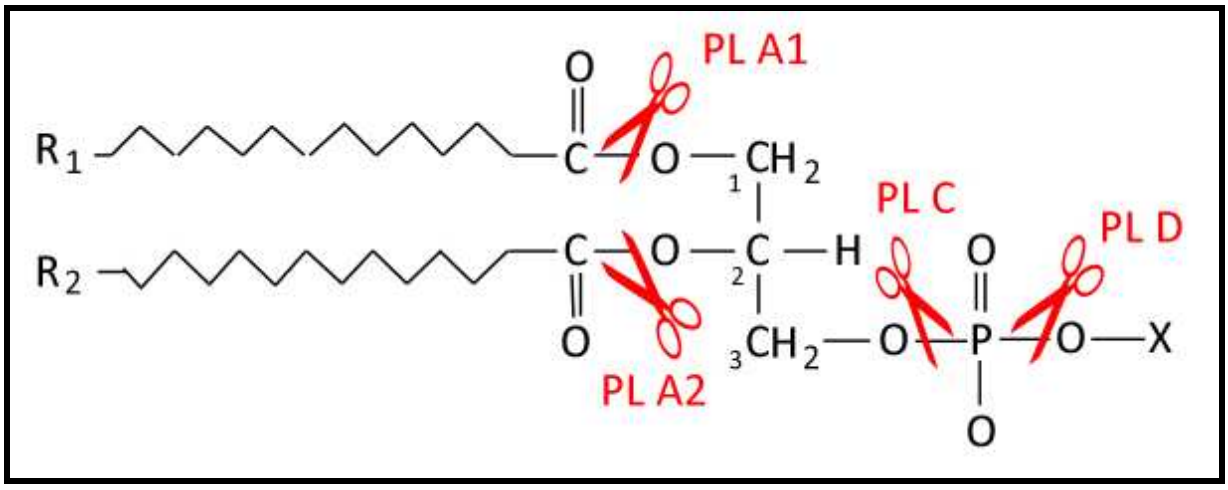

Figure 9: Les différents sites d'action des phospholipases sur les phospholipides membranaires.

2.1. La phospholipase C

Les phospholipases C sont des protéines qui clivent chez les Vertébrés, les têtes polaires des phospholipides contenant un inositol. Chez les mammifères, quatre sous-types ont été identifiés : une isoforme PLCε, deux isoformes PLCγ, quatre isoformes PLCδ et quatre isoformes PLCβ (Rhee, 2001). Certaines PLC hydrolysent préférentiellement les phosphatidylinositides tels que les phosphatidylinositols (PI), les phosphatidylinositol-4-phosphates (PIP) et les phosphatidylinositol-4,5-biphosphates (PIP_2) et conduisant à la formation d'inositol phosphates IP, IP et IP3 et de 1,2-diacylglycérol (DAG). D'autres PLC hydrolysent les phosphatidylcholine (PC) en phosphocholine et DAG.

2.2. La phospholipase D

Il existe deux grandes familles de PLD chez les mammifères, définies selon la sensibilité au PIP_2. Certaines PLD sont activées par la PIP_2, d'autres non. Dans le groupe des PLD PIP2-sensibles on distingue deux classes :

- La PLD_1, dont l'activation se fait grâce à des petites protéines G de la famille ARF (Factor d'ADP-ribosylation) et Rho, et par les protéines kinases C (PKC) (Hammond *et al*., 1995).
- La PLD_2, qui possède une forte activité basale *in vitro* (Colley *et al*., 1997 ; Kodaki et Yamashita, 1997 ; Lopez *et al*., 1998).

Les PLD PIP_2-insensibles, elles sont activées par les acides gras, comme l'acide oléique, (Frohman *et al*., 1999). Elles sont appelées PLD-oléate-dépendantes.

Les PLD sont localisées au niveau des cavéoles, qui sont des domaines spécialisés au niveau de la membrane plasmique riches en cholestérol et en sphingolipides, appelés *lipid rafts* ou radeaux lipidiques (McDermott *et al*., 2004). PLD_2 est exprimée majoritairement au niveau de la membrane plasmique alors que la PLD_1 est localisée au niveau des endosomes et des lysosomes (McDermott *et al.,* 2004).

3. Les Phospholipases A_2

Le développement des techniques de séquençage dans les années soixante-dix, a permis de montrer que ces enzymes possèdent un nombre inhabituel de cystéines (plus de 10% des acides aminés), et qu'elles possèdent toutes des ponts disulfures. Dans le cas des phospholipases A_2, chez les cobras et les crotales, possèdent six ponts disulfures en commun, et un seul localisé différemment. Cette différence conduit à la désignation du type I et du type II respectivement issus des venins de cobra et de crotale. Des études sur le suc pancréatique du porc, ont permis de montrer que cette enzyme qui hydrolyse les phospholipides (aussi chez les hommes), possède le même pont disulfure que chez le cobra, conduisant donc à la désignation du groupe IB. D'après sa séquence, le modèle de pont disulfure s'apparenterait plus à celui du crotale, que celui de l'enzyme pancréatique humaine. Cette nouvelle forme à été désignée IIA. Toutes ces enzymes devinrent alors les PLA_2s secrétées ou $sPLA_2$. En 1992, la première PLA_2 cytosolique ou $cPLA_2$ a été purifiée, séquencée et clonée, à partir de la lignée cellulaire U937 de macrophages. Pour étudier cette enzyme, et éventuellement de nouvelles PLA_2, un système numérique de groupe a été établi, utilisant la désignation existante, I et II (Tableau4). Cette nomenclature a été étendue à des sous-groupes IA, IB et IIA. Le groupe II a été ajouté pour désigner une nouvelle PLA_2 qui a été purifiée à partir du venin d'abeille. Le groupe IV désigne une nouvelle $cPLA_2$. Une autre $sPLA_2$ a été par la suite identifiée dans les macrophages ; elle possède six ponts disulfures identiques retrouvés dans les groupes I et II et n'en possède pas le septième. Pour s'assurer que cette dernière $sPLA_2$ était différente des groupes I et II, cette enzyme à été assimilée au groupe V. En 1995, a été

présentée une autre PLA_2 cytosolique purifiée à partir des macrophages, différente de celle du groupe IV et chez laquelle l'activité est indépendante du calcium. Cette nouvelle PLA_2 calcium indépendante a été identifiée comme le groupe VI. Des chercheurs de l'Université d'Utah, avaient isolé une enzyme à partir du plasma. Cette enzyme hydrolyse le facteur PAF, *Platelet Activating factor*, une phosphatidylcholine qui possède un acétate en position *sn*-2. Cette enzyme et une autre, la PAF acetyl-hydroxylase (PAF-AH) ont été plus tard reconnues comme des PLA_2 avec une spécificité pour une courte chaîne acyle en position *sn*-2 et pour les lipides oxydés dans le plasma. La même enzyme a été désignée *lipoprotein-associated phospholipase* A_2 (Lp-PLA_2). Ces enzymes ont été classées dans les groupes VII et VIII. De nouvelles $sPLA_2$ dans lesquelles la séquence ou le pont disulfure diffèrent des groupes I, II, III et V de $sPLA_2$. Ces nouveaux $sPLA_2$ appartiennent désormais aux groupes IX, X, XI, XII, XIII, et XIV issus des nouvelles formes humaines de $sPLA_2$. Le seul nouveau type de PLA_2 identifié qui n'appartient à aucun des quatre types de PLA_2, secrété, cytosolique, calcium indépendant, $LPLA_2$, a été désigné par le groupe XV. Récemment un nouveau groupe de PLA_2 a été isolé à partir de tissus adipeux et classé dans le groupe XVI. Il s'agit d'un nouveau groupe de PLA_2 appelé adipose-PLA_2 (Ad-PLA_2).

Types	Groupes	Sous-groupes	Masse moléculaire (kDa)	Résidus catalytiques
sPLA$_2$	GI	A, B	13-15	His/Asp
	GII	A, B, C, D, E, F	13-17	
	GIII		15-18	
	GV		14	
	GIX		14	
	GX		14	
	GXI	A, B	12-13	
	GXII	A, B	19	
	GXIII		<10	
	GXIV		13-19	
cPLA$_2$	GIV D(δ),	A(α), B(β), C(γ), E(ε), F(ζ)	60-114	Ser/Asp
iPLA$_2$	GVI	A(β), B(γ), C(δ), D(ε), E(ζ), F(η)	84-90	Ser/Asp
PAF-AH	GVII	A(Lp-PLA$_2$), B(PAF-AH II)	40-45	Ser/His/Asp
		A (α1), B(α2), β	26-40	
LPLA$_2$	GXV		45	Ser/His/Asp
AdPLA	GXVI		18	His/Cys

Tableau 4: La grande famille des Phospholipases A_2

3.1. Groupes et sous-groupes

3.1.1. Phospholipase A_2 Sécrétées

Les sPLA$_2$ sont de petites protéines secrétées de 14 à 18 kDa, à l'exception de la sPLA$_2$ GIII. Elles contiennent couramment 6 à 8 ponts disulfures (Tableau5). Les séquences d'acides aminés des sPLA$_2$ (Figure10) montrent l'existence d'un site actif His/Asp. La structure des ponts disulfures observée à partir du séquençage des sPLA$_2$ a permis de définir les groupes I et II. La première PLA$_2$ non issue de venin (GIB), a été isolée à partir du suc pancréatique de la vache mais est aussi présente chez d'autres mammifères. Une autre PLA$_2$ (GIIA) a été purifiée à partir du liquide synovial de patients atteints d'arthrite rhumatismale (Seilhamer *et al.,* 1989 ; Kramer *et al*., 1989).

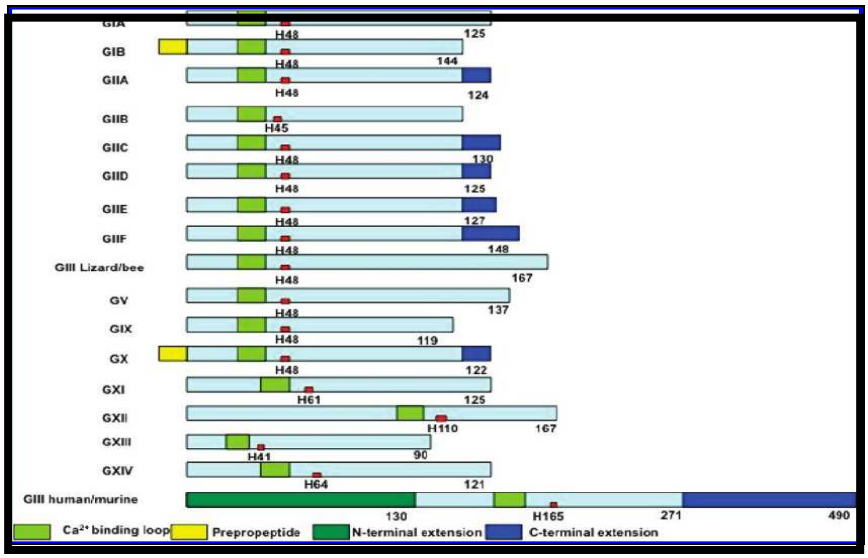

Figure 10: Représentation schématique des séquences d'acides aminés des PLA_2 secrétés. Adapté de Dennis *et al*., (2011).

Dix-sept formes de $sPLA_2$ (Tableau 5) ont été identifiées chez les mammifères, les insectes, les mollusques, les reptiles, les plantes et les bactéries. Celles-ci possèdent une large distribution et diverses fonctions physiologiques.

Suivant la structure des ponts disulfures et l'ordre de découverte, les groupes IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X et XII des $sPLA_2$ ont été identifiés chez les mammifères (Schaloske, et Dennis, 2006). Le génome humain contient neuf $sPLA_2$, celui de la souris en contient dix, incluant la $sPLA_2$ GIIC, qui n'existe que sous forme de pseudogène chez l'homme.

Groupe	Source	Masse moléculaire (kDa)	Nombre de ponts dissulfure
IA	cobras et crotales	13_15	7
IB	homme/pancreas de porc	13_15	7
IIA	crotale; liquid synovial humaine	13_15	7
IIB	Vipère du Gabon	13_15	6
IIC	rat/testicule de souris	15	8
IID	homme/souris pancreas/foie	14_15	7
IIE	homme/souris cerveau/coeur/utérus	14_15	7
IIF	homme/ testicule de souris /embryon	16_17	6
III	lézard/abeille	15_18	8
	homme/souris	55	8
V	homme/souris coeur/poumons/macrophage	14	6
IX	escargot (conodipine-M)	14	6
X	homme foie/thymus/leucocyte	14	8
XIA	Pousses de riz vert (PLA_2-I)	12.4	6
XIB	Pousses de riz vert (PLA_2-II)	12.9	6
XIIA	homme/souris	19	7
XIIB	homme/souris	19	7
XIII	parvovirus	<10	0
XIV	champignon/bacteries	13_19	2

Tableau 5: les phospholipases A_2 secrétés. Adapté de Schaloske et Dennis (2006).

3.1.2. Phospholipase A_2 Cytosolique

L'activité de la première PLA_2 cytosolique, désormais attribuée au groupe GIVA (ou $cPLA_2\alpha$), a été révélée par C. Leslie et R. Kramer dans les plaquettes et dans les neutrophiles humains (Alonso, 1986 ; Kramer, 1986). L'enzyme a été purifiée, séquencée et clonée par J. Clark et R. Kramer en 1991 (Clark, 1991 ; Kramer, 1991). PLA_2 GIVB ($cPLA_2\beta$) et PLA_2 GIVC ($cPLA_2\gamma$) (Strifler, 1999), ont été découverts en 1998 et 1999, tandis que les PLA_2 GIVD ($cPLA_2\delta$), GIVE ($cPLA_2\varepsilon$), et GIVF ($cPLA_2\zeta$) ont été découverts chez la souris au Japon en 2004 et 2005 (Ohto *et al*., 2005).

Le groupe IV des PLA_2 est composé de six phospholipases connues regroupées par caractéristiques (Tableau6) et par séquence (Figure11).

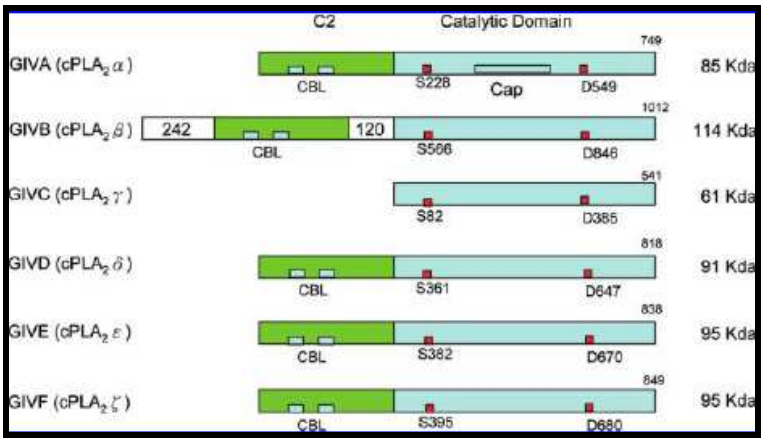

Figure 11: Représentation schématique des séquences d'acides aminés du Groupe IV des cPLA$_2$. Sont représentés, la boucle de fixation du calcium (CBL), les sites actifs (carrés rouges). Adapté de Dennis *et al*., (2011).

3.1.2.1. Groupe IVA Phospholipase A_2 (cPLA$_2$α)

La PLA_2 cytosolique a été identifiée dans les neutrophiles et les plaquettes (Alonso, 1986 ; Kramer, 1986). Le gène de PLA_2 GIVA a été cloné et séquencé en 1991 à partir de cellules U937 (Clark, 1991, Kramer, 1991). Il a été localisé sur le chromosome $1q_25$ humain et est exprimé dans la plupart des tissus humains (Tableau5) (Tay *et al*., 1995). Cette enzyme contient 749 acides aminés et a une taille de 85 kDa (Clark, 1991, Kramer, 1991). La localisation de PLA_2 GIVA près de la membrane phospholipidique, permet l'activation de son activité enzymatique par la fixation du calcium sur son domaine C2 (Clark, 1991).

Par ailleurs, la phosphorylation des MAP kinase (Lin *et al*., 1993), des médiateurs lipidiques céramide-1-phosphate (C1P) (Nakaruma, 2006) et de la phosphatidylinositol 4,5-bis phosphate (PIP_2) (Leslie et Channon, 1990) augmentent l'activité de PLA_2 GIVA. La plupart des phospholipides, tels que la phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanoamine (PE) et le phosphatidylinositol (PI), sont des substrats de PLA_2GIVA (Leslie *et al*., 1988). L'hydrolyse par PLA_2 GIVA des substrats phospholipidiques a une haute spécificité pour l'acide arachidonique en position *sn*-2 (Clark, 1991).

En plus de l'activité phospholipase, PLA_2 GIVA possède aussi une activité de lysophospholipase et transacylase (Reynolds *et al*., 1993). L'activité lysophospholipase de certains substrats est calcium-independante (Reynolds *et al*., 1993).

3.1.2.2. Groupe IVB Phospholipase A_2 (cPLA$_2$β)

Cloné en 1999, le gène GIVB PLA_2 est codé par le chromosome 15q11.2-q21.3, et l'ARNm est exprimé de manière ubiquitaire, bien qu'une forte expression soit exprimée dans le pancréas et le cervelet (Pickard *et al*, 1999).

Sous-groupes	Origine/Sources	Résidu/masse molaire	Domaine	Facteur d'activation	substrat	activité	modificatons post-traductionnelles	Chromosome humain
GIVA (cPLA2α)	Macrophages humains cellules U937 / plaquettes/RAW 264.7/ rat reins	749/85 Kda	C2 α / tête β - hydrolase	Ca2+ PIP_2 C1P	PC, PE, PI, haute spécificité AA-cn-2	PLA2, PLA1, Lyso-PLA transacylase	phosphorylation	**1q25**
GIVB (cPLA2β)	homme pancreas/foie/coeur/cerveau, ubiquitaire	1012/100_ 114 Kda	C2 α/ β hydrolase	Ca^{2+}	PC, PE / pas de spécificité *sn*-2	PLA_1, PLA_2, Lyso-PLA transacylase		**15q11.2-q21.3**
GIVC (cPLA2γ)	homme coeur/muscle squelettique	541/61 Kda	C2 α/ β hydrolase	Ca^{2+}	PC/ faible spécificité AA-cn-2	PLA_1, PLA_2, Lyso-PLA transacylas	farnésylation	**19q13.3**
GIVD (cPLA2δ)	Placenta de souris	818/91 Kda	C2 α/ β hydrolase	Ca^{2+}	PC, PE	PLA_1, PLA_2, Lyso-PLA transacylas		**15q15.1**
GIVE (cPLA$_2$ε)	Cœur de souris/muscle squelettique/ testicule/thyroide	838/95 Kda	C2 α/ β hydrolase	Ca^{2+}	PC, PE	PLA_1, PLA_2, Lyso-PLA transacylas		**15q15.1**
GIVF (cPLA$_2$ζ)	thyroide de souris/estomac	849/95 Kda	C2 α/ β hydrolase	Ca^{2+}	PC, PE	PLA_1, PLA_2, Lyso-PLA transacylas		**15q15.1**

Tableau 6: le groupe IV des cPLA$_2$

L'enzyme de 100 à 114 kDa contient 1012 acides aminés (Pickard *et al*, 1999). PLA_2 GIVB contient un domaine C2 et un domaine catalytique qui sont similaires à ceux dans GIVA PLA_2, avec 30% de résidus identiques dans les séquences primaires (Ghosh *et al*, 2006). PLA_2 GIVB préserve les sites de fixation de calcium conservés sur le domaine C2 dans l'alignement de séquences, montrant ainsi le rôle du calcium dans l'activité enzymatique.
Par rapport à GIVA PLA_2, l'activité phospholipase est faible et la spécificité du substrat pour les acides gras en position *sn*-2 est plus faible (Schaloske et Dennis, 2006).

3.1.2.3. Groupe IVC PLA_2 ($cPLA_2\gamma$)

Le gène de la PLA_2 GIVC cloné en 1998, est situé sur le chromosome 19q13.3 humain (Tableau6), et est fortement exprimé dans le cœur et dans le muscle squelettique (Underwood *et al.*, 1998). La PLA_2 GIVC est une protéine de 61 kDa et renferme 541 résidus d'acides aminés, présentant une homologie de 30% avec le domaine catalytique de PLA_2 GIVA (Figure11). La non dépendance de l'activité phospholipase de PLA_2 GIVC au calcium s'expliquerait par l'absence de domaine C2 (Underwood *et al.*, 1998), de sites de liaison PIP_2 et de sites de phosphorylation (Jenkins *et al*., 2003). Par rapport à GIVA PLA_2, la spécificité du substrat pour l'acide arachidonique est plus faible (Underwood *et al.*, 1998).

3.1.2.4. Groupe IVD ($cPLA_2\delta$), GIVE ($cPLA_2\varepsilon$), and GIVF ($cPLA_2\zeta$)

PLA_2 GIVD a été détecté dans le placenta, PLA_2 GIVE dans la thyroïde, le cœur et les muscles squelettiques; PLA_2 GIVF a été détecté dans la thyroïde (Ohto *et al*., 2005). Les longueurs des séquences de PLA_2 GIV D, E et F sont respectivement 818 acides aminés/91 kDa, 838 acides aminés/95 kDa et 849 acides aminés / 95 kDa, (Figure11). Toutes les trois protéines contiennent un domaine C2 conservé et un domaine phospholipase. Toutes les PLA_2 GIV D, E, et F présentent une activité calcium-dépendante (Ohto *et al*., 2005).

3.1.3. Phospholipase A_2 Calcium-Indépendante

Les PLA_2 peuvent avoir une activité indépendante du calcium intracellulaire. Elles ont été regroupées dans le groupe VI : GVIA ($iPLA_2\beta$; PNPLA9), GVIB ($iPLA_2\gamma$; PNPLA8), GVIC ($iPLA_2\delta$; PNPLA6), GVID ($iPLA_2\varepsilon$; PNPLA3), GVIE ($iPLA_2\zeta$; $PNPLA_2$), et GVIF ($iPLA_2\eta$; PNPLA4) (Tableau 7).

Sous-groupes	Nom alternatif	Source	Résidu/masse molaire	Domaine	Epissure	activité	modificatons post-traductionnelles	Chromosome humain
GVIA	iPLA2β PNPLA9	Homme/ souris	750/85 Kda 806/87 Kda	7_8 Ankyrin Repeats α/ β hydrolase	5	PLA2, PLA1, Lyso-PLA transacylase		**1q25**
GVIB	iPLA2γ PNPLA8	Homme/ souris	782/90 kDa	α/ β hydrolase	2	PLA_1, PLA_2, Lyso-PLA transacylase		**15q11.2- q21.3**
GVIC	PLA2δ PNPLA6, NTE	Homme/ souris	1366/146 kDa	3 cNMP	3	PLA_1, PLA_2, Lyso-PLA transacylas	phosphorylation	**19q13.3**
GVID	iPLA2ε, PNPLA3, ADPN	homme	481/52 kDa	α/ β hydrolase	2	PLA_2, TG hydrolase, transacylase		**15q15.1**
GVIE	iPLA2ζ, PNPLA2, ATGL	homme	8 504/55 kDa	α/ β hydrolase	2	PLA_2, TG hydrolase, transacylase	phosphorylation	**15q15.1**
GVIF	iPLA2η, PNPLA4, GS2	homme	253/27 kDa	α/ β hydrolase		PLA_2, TG hydrolase, transacylase		**15q15.1**

Tableau 7: Phospholipases A_2 calcium indépendantes. Adapté de Schaloske et Dennis (2006).

Toutes ces enzymes possèdent un résidu sérine catalytique et un site actif (figure12). Leur homologie avec une protéine, la patatine, permet aux membres GVI A, B, C, D, E et F d'être désignées *patatin-like-protein*, PNPLA 9, 8, 6, 3, 2 et 4, respectivement (Kienesberger *et al*., 2008).

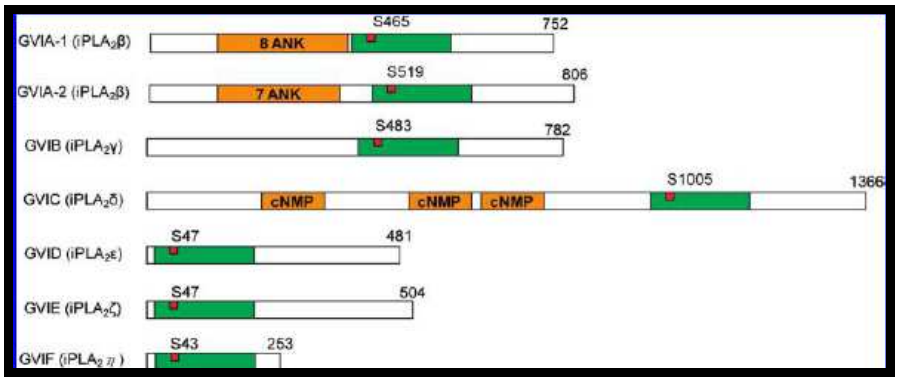

Figure 12: Représentation schématique des PLA_2du groupe VI . Les domaines de répétition de l'ankyrine, le domaine de fixation du nucléotide phosphate (cNMP), le domaine type patatine, et les résidus du site actif sont indiqués. Adapté de Dennis *et al*., (2011).

3.1.3.1. Groupe VIA PLA_2 ($iPLA_2\beta$; PNPLA9)

Le gène des PLA_2 GVIA est localisé sur le chromosome 22q13.1. L'enzyme possède 752 acides aminés et est de 85 kDa. Les PLA_2 GVIA contiennent huit domaines ankyrine (Tang *et al*., 1997). Cette enzyme possède une activité phospholipase, lysophospholipase, acyl-CoA thioesterase et transacylase (Lio *et al*., 1998). Leur site actif contient la séquence consensus d'une lipase (Tang *et al*., 1997). PLA_2 GVIA est active sous forme d'oligomère et cette activité est conservée par la fixation d'ATP (Lio *et al*., 1998). L'ATP n'a aucun effet sur l'activité PLA_2 GVIA-1 contrairement à PLA_2 GVIA-2 (Ma *et al*., 1999). Bien que pour PLA_2 GVI et PLA_2 GIV, le clivage en position *sn*-$_2$ des phospholipides soit catalisé par une sérine de leur site actif, PLA_2 GVI n'a pas une spécificité pour l'acide arachidonique en position *sn*-$_2$, contrairement à PLA_2GIV (Lio *et al*., 1998). L'activité de PLA_2 GVI serait donc régulée par la fixation d'ATP, le clivage par une caspase, et par une possible agrégation protéique d'ankyrine.

3.1.3.2. Groupe VIB PLA_2 ($iPLA_2\gamma$; PNPLA8)

Cloné en 2000 à partir de cellules squelettiques (Mancuso *et al*., 2000), et l'ADN complémentaire de lymphocytes, PLA_2 GVIB est localisé sur le chromosome 7q31et possède 782 acides aminés et a une protéine de 90 kDa (Tanaka *et al*., 2000). PLA_2 GVIB possède aussi un résidu sérine-483 et un domaine du type patatine (*patatin-like domain*). PLA_2 GVI B

possède à la fois une activité phospholipase A_1 et phospholipase A_2, avec une faible spécificité pour l'hydrolyse des acides gras en position *sn*-2 (Mancuso *et al*., 2000). PLA_2 GVIB joue un rôle très important dans l'homéostasie phospholipidique du cœur et la fonction mitochondriale (Mancuso *et al.*, 2007).

3.1.3.3. Groupe VIC PLA_2 ($iPLA_2\delta$; PNPLA6)

Découvert en 2002, PLA2 GVIC est identifiée comme une estérase caractéristique des neuropathies, *neuropathy target esterase* (NTE). Son gène est localisé sur le chromosome 19p13.3-13.2 et est exprimé dans les neurones, dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (van Tienhoven *et al*., 2002). L'enzyme exprimée est une protéine de 1366 acides aminés et de 146 kDa, qui possède une activité estérase, une activité phospholipase calcium indépendante et une activité lysophospholipide (van Tienhoven *et al*., 2002). Le domaine du type patatine, est présent dans la région 933-1100 ainsi que la sérine active, Ser-1005, dans le motif GXSXG (Figure12) (Wilson *et al*., 2006).

3.1.3.4. Groupe VID PLA_2 (iPLA2ε; PNPLA3*)*

Egalement appelé adiponutrine, le groupe VID a été identifié en 2001. Chez l'homme, il s'agit d'une protéine transmembranaire exprimée dans les adipocytes et dont le gène est localisé dans le chromosome 22q13.31, et la protéine de 52 kDa, composée de 481 acides aminés (Baulande *et al.*, 2001). PLA_2 GVID possède un domaine du type patatine dans les résidus 10-180 et une sérine active, Ser-47, dans son site actif (Figure12) (Kienesberger *et al*., 2008). PLA2 GVID en plus d'une activité phospholipase A_2, a une activité triacylglycérol-hydrolase, et une activité transacylase (Jenkins *et al*. 2004). Le gène de l'adiponutrine est très impliqué dans la secrétion d'insuline et l'obésité (Johansson *et al*., 2008), dans les dysfonctionnements hépatiques, en particulier la stéatose hépatique non liée à l'alcool (Romeo *et al*., 2008). L'arbre phylogénétique montre parmi les PLA_2 GVI, la plus proche relation entre PLA_2 GVID et GVIE (Kienesberger *et al*., 2008).

3.1.3.5. Groupe VIE PLA_2 (iPLA2ζ; PNPLA2)

Identifiée en 2004 sous ses diverses appelations, le gène de PLA2 GVIE a été cloné et localisé sur le chromosome 11p15.5. Sa protéine de 55 kDa est exprimée dans les adipocytes, près de la membrane plasmique et des goulettes lipidiques (Notari *et al*., 2006). PLA2 GVIE possède aussi un domaine type patatine et une sérine active (Figure12). En plus de l'activité PLA_2 indépendante du calcium et de l'ATP, une activité triglycéride lipase, une activité transacylase

sont attribuées à PLA_2 GVIE (Notari *et al*., 2006). Son implication dans diverses maladies telles que le diabète de type II a été démontrée (Schoenborn *et al*., 2006).

3.1.3.6. Groupe VIF PLA_2 (iPLA2η; PNPLA4)

Identifié en 1994 et nommé *gene-sequence*-2 (GS2), le gène de PLA_2 GVIF est exprimé dans de très nombreux tissus (Lee *et al*., 1994). Sa protéine de 27 kDa est composée de 253 acides aminés. PLA_2 GVIF possède un domaine du type patatine et une sérine active dans le motif GXSXG (Figure12) (Jenkins *et al*., 2004). Les activités PLA_2, triglycérides-hydrolase, acylglycérol- et rétinol-transacylase, rétinylesther hydrolase lui sont attribuées (Jenkins *et al*., 2004).

3.1.4. PAF Acetylhydrolases

Le facteur d'activation des plaquettes, *Platelet-activating factor* (PAF), est l'activateur et le médiateur phospholipidique de plusieurs fonctions, telle que l'inflammation (Prescott *et al*., 2008). Deux groupes de PLA_2, GVII et GVIII (Tableau8) catalysent l'hydrolyse du groupement acétyle en position *sn*-2 du PAF, pour produire la lyso-PAF et un acétate (Schaloske et Dennis, 2006).

PLA_2 GVIIA est une enzyme secrétée, aussi appelée plasma PAF-AH (pPAF-AH), du fait de son intervention dans le plasma humain, ou *lipoprotein-associated* PLA_2 (Lp PLA_2). PLA_2 GVIIB aussi appelée PAF-AH II, est une protéine intracellulaire qui a 41% d'identité de séquence d'acides aminés avec PLA_2 GVIIA (Hattori *et al*., 1996). .PLA_2 GVIII ou PAF-AH Ib, est un complexe intracellulaire hétérotrimérique, localisée dans le cerveau (Ho *et al*., 1997). Cette enzyme possède deux sous-unités α catalytiques de 26 kDa et une sous unité β de régulation de 45 kDa (Hattori *et al*., 1994). Les PAF-AH sont des PLA_2 calcium-indépendantes qui possèdent toutes des résidus Ser/His/Asp (Harai *et al*., 2002).

Groupe	Source	Masse moléculaire	Caractéristiques	Noms alternatifs
VIIA	Homme, souris, porc, boeuf	45	secrété α/βhydrolase N-glycosylation	*Lipoprotein associated*-PLA_2 (Lp-PLA_2) plasma PAF-AH (pPAF-AH)
VIIB	Homme, boeuf	40	intracellulaire, myristoylé, α/βhydrolase	PAF-AH II
VIIIA	homme	26	intracellulaire, homo/hétérodimère avec GVIIIB	PAF-AH Ib
VIIIB	homme	26	intracellulaire, homo/hétérodimère avec GVIIIA	PAF-AH Ib

Tableau 8: Groupes VII et VIII des phospholipases A_2

3.1.5. Adipose-Specific Phospholipase A_2

Adipose-specific phospholipase A_2 (AdPLA) a été identifiée pour la première fois comme un suppresseur de tumeur (Hajnal *et al*., 1994), puis considérée comme un membre de la famille des lécithine rétinol acyl-transférase (LRAT), (Jin *et al*., 2007). La fonction phospholipase A_2 a été récemment démontrée (Jin *et al*., 2007). La PLA_2 GXVI possède une activité calcium indépendante phospholipase A_1 et A_2 (Uyama *et al*., 2009). Toutefois, l'activité PLA_1 est plus importante que l'activité PLA_2. La protéine de 18 kDa se différencie des iPLA2 et cPLA_2 par la taille.

3.1.6. Lysosomal Phospholipase A_2

Purifiée à partir de cerveau bovin (Abe et Shayman , 1998) PLA_2 GXV a été aussi identifiée dans des cellules de souris, de rat, de vache et humaines (Tableau9) (Abe *et al*., 2004). PLA_2 GXV a une forte homologie de séquence avec la lécithine humaine (Hiraoka *et al*., 2002). Cette enzyme est une glycoprotéine soluble dans l'eau. Elle a un poids moléculaire de 45 kDa

et renferme plusieurs sites de N-glysosilation (Hiraoka *et al*., 2002). PLA_2 GXV a une activité enzymatique optimale à un pH de 4,5 et la protéine serait localisée dans les lysosomes d'où son identification en tant que PLA_2 lysosomale ($LPLA_2$) (Denys *et al*., 2011). Par ailleurs, $LPLA_2$ possède aussi une activité PLA_1 (Denys *et al*., 2011). Cette enzyme peut hydrolyser la chaine acyle en position *sn*-1 et de manière préférentielle en position *sn*-2 (Abe *et al*., 2006). $LPLA_2$ fonctionne en utilisant le même mécanisme d'interface que les membranes classiques associant des PLA_2, dans lequel le substrat provient exclusivement de la vésicule lipidique. L'addition de NaCl ou l'augmentation du pH peut réduire considérablement l'activité due à la charge négative des lipides (Abe *et al*., 2006).

Groupe	Source	Masse molaire	Caractéristiques	Noms alternatifs
XV	Homme, souris, Bœuf	45 kDa (déglycosylé)	Ser/His/Asp triad, glycosylated, N-terminal signal sequence	ACS, LLPL

Tableau 9: les PLA_2 du groupe XV

3.2. Structure des Phospholipases A_2 et interactions membranaires

3.2.1. Phospholipase A_2 Sécrétées

La plupart des $sPLA_2$ possède un site très conservé de fixation du calcium (XCGXGG) et un site catalytique (DXCCXXHD). Toutes ces enzymes possèdent un domaine catalytique His/Asp (Figure 13A). Les groupes I, IIA et X des $sPLA_2$ ont des structures similaires, trois hélices α, deux feuillets β et le domaine de fixation du calcium. Les $sPLA_2$ G XIB (présentes chez des plantes) et G XIV (procaryotique) manquent respectivement de feuillets β (Guy *et al.*, 2009) et d'hélices α (Matoba *et al*., 2002). Divers travaux rapportent l'existence d'un second site de calcium, même s'il n'y a qu'un seul ion calcium dans la structure des $sPLA_2$ (Burke *et al*., 2008)

La $sPLA_2$ GIA, extraite du venin de cobra est un modèle très étudié en enzymologie des phospholipases A_2. La $sPLA_2$ GIA possède six ponts disulfures très conservés et une septième, caractéristique (figure13 A).

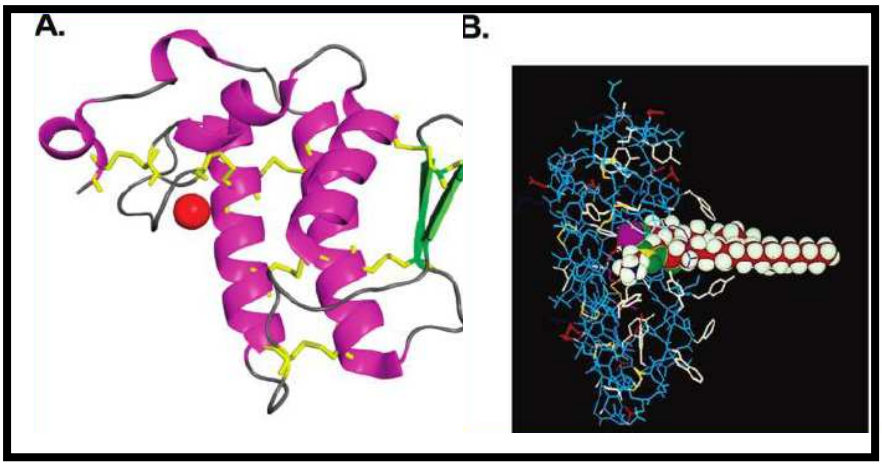

Figure 13: (A) Structure de sPLA$_2$ GIA. Les hélices sont en violet, les feuillets β en vert, et le calcium indiqué par un point rouge. Les traits jaunes représentent les ponts disulfures. (**B) Modélisation de sPLA$_2$ GIA avec son substrat phospholipidique et son site actif**. Les résidus His-48, Asp-93 du site actif et celui du calcium sont indiqués en mauve ; les résidus aromatiques en blanc. D'après Dennis (1994).

Les ions calcium sont nécessaires pour son activation. Ces derniers stabilisent la transition en coordonnant le groupe carbonyle et la charge négative de l'oxygène. La figure 13B montre comment le substrat phospholipidique interagit avec le site actif. Dans ce modèle, 9 à 10 atomes de carbone de la chaîne acyle en position *sn*-2, interagissent avec l'enzyme et le reste de la chaine est masqué. Ceci expliquerait pourquoi les sPLA$_2$ n'ont aucune spécificité pour l'acide gras en position *sn*-2. Les résidus hydrophobes Leu-2, Phe-5, Trp-19, Tyr-52, et Tyr-69, entourent la chaîne acyle du substrat lipidique.

L'activité de la plupart des membres de la famille des PLA$_2$ dépend de l'interaction de la protéine avec les agrégats lipidiques. Le mécanisme d'activation interfaciale des PLA$_2$ a été très débattu en enzymologie. sPLA$_2$ GIA peut hydrolyser les phospholipides hybrides. Ceci serait dû à la présence de résidus aromatiques sur le site interfacial. L'utilisation de la spectrométrie de masse d'échange hydrogène-deutérion (DXMS), a montré que les résidus Tyr-3, Trp-61, Tyr-63, and Phe-64 pénètrent dans la membrane lipidique pour permettre à l'enzyme d'accéder au substrat (agrégats lipidiques) (Figure14) (Burke *et al*., 2008).

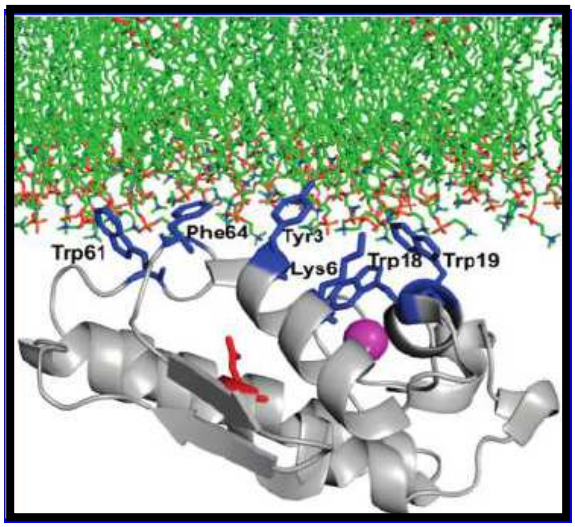

Figure 4: Modèle du site de fixation lipidique sur $sPLA_2$ GIA. Les résidus Tyr-3, Trp-19, Trp-61, and Phe-64du site inter facial sont indiqués en bleu. *Copyright 2008 American Chemical Society***.**

La $sPLA_2$ GIII est une protéine à multi domaine, d'un poids moléculaire de 55kDa. Chez les mammifères et dans le venin d'abeille, elle possède un domaine central, une extension de la terminaison N-terminale de 130 acides aminés, et une extension C-terminale de 219 acides aminés. La $sPLA_2$ GXII B, homologue de $sPLA_2$ GXII A, possède une mutation naturelle dans son site actif (H48L) qui lui supprime toute activité enzymatique (Rouault *et al.*, 2003). Elle est très exprimée dans le foie, l'intestin grêle et les reins, chez l'homme et la souris. Les $sPLA_2$ issues de cellules de procaryotes ne possèdent dans leur structure que deux ou aucun pont disulfure alors que celles des enzymes de cellules d'eucaryotes en possèdent 6 à 8. Lorsque la concentration des $sPLA_2$ augmente (monomères agrégés), l'activité enzymatique de toutes les $sPLA_2$ augmente : on parle d'activation inter faciale (Carman *et al*., 1995). En général, la plupart des $sPLA_2$ ont une plus forte activité en présence de phospholipides anioniques tels que la phosphatidyl-glycerol (PG), la phosphatidyl-ethanol-amine (PE), et la phosphatidyl-sérine (PS). Les groupes IA et XIV des $sPLA_2$ ont une plus faible activité contre la phosphatidylcholine (PC). Les groupes V et X peuvent eux hydrolyser les phopsholipides anioniques et la phosphatidylcholine (PC) (Singer *et al*., 2002).

3.2.2. Phospholipase A_2 Cytosolique

PLA_2 GIVA est très représentatif du groupe IV des PLA_2, car il existe des similitudes structurelles avec les isoformes GIVB, C, D, E, et F. Le domaine C2 de PLA_2 GIVA est responsable de sa translocation et de la fixation du calcium (Perisic *et al.,* 1998). Le domaine catalytique est composé d'un noyau hydrolase α / β et d'une zone de coiffe (Dessen *et al*., 199). La structure en crystal (Figure15) présente une poche catalytique. Les résidus Ser-228

Arg-200, et Asp-549 agissent comme site actif pour l'activité lysophospholipase et l'activité PLA_2.

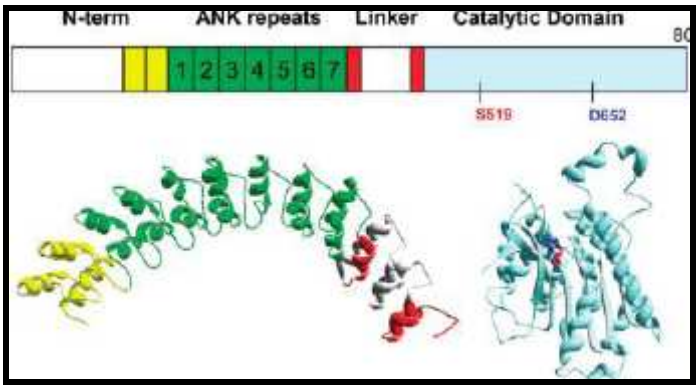

Figure 15: Structure en crystal du groupe IVA. D'après Denis *et al*. (2011).

L'activation de PLA_2 GIVA requiert une activation inter faciale (Lio et Dennis, 1998). L'enzyme est séquestrée dans une interface phospholipidique, puis est liée à la membrane par le domaine C2 (Perisic *et al* ., 1998) pour déclencher divers mécanismes tels que la translocation calcium dépendante, l'activation de seconds messagers et la phosphorylation. Des interactions découleraient de changements de conformations dans le domaine C2, de la phosphorylation, de l'activation par PIP_2 ou C1P ou d'autres changements. Deux hélices interagiraient avec la membrane phospholipidique et le domaine C2 (Burke *et al*., 2008) (Figure16).

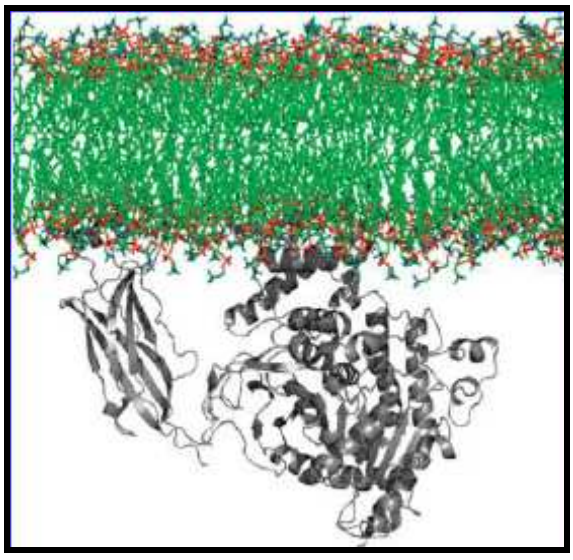

Figure 16: Modèle de la surface de fixation lipidique de $cPLA_2$ GIVA. D'après Denis *et al*. (2011).

3.2.3. Phospholipase A_2 Calcium-Indépendante

Parmi les six formes de PLA_2 GVI, PLA_2 GVIA est la plus représentative et la plus étudiée. Toutes PLA_2 GVI possèdent un domaine caractéristique de la patatine. PLA_2 GVI D, E et F sont composées essentiellement de ce domaine (Saarela *et al*., 2008). Malgré la forte homologie de séquence avec PLA_2 GVIA, PLA_2 GVI B ne possède pas de domaine avec une répétition d'ankyrines (Saarela *et al*., 2008). PLA_2 GVI C a une faible similarité avec les autres membres du groupe, excepté en ce qui concerne le domaine caractéristique de la patatine. Les régions qui possèdent une forte homologie avec la patatine, représente un domaine catalytique, et le reste, un domaine de régulation, spécifique à PLA_2GVIA et qui inclut la région N-terminale, les ankyrines et la région de fixation. La sérine du site actif de PLA_2GVIA se lie à l'intérieur de la séquence consensus d'une lipase, au dessus du domaine catalytique (Figure 17). Les PLA_2 GVI sont régulées par la fixation de l'ATP, un clivage par la caspase, une oligomérisation et la fixation de la calmoduline.

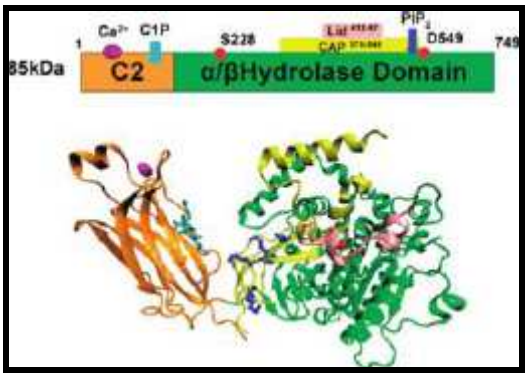

Figure 5: Homologie du groupe VIA de PLA2. D'après Hsu *et al*., (2009).

L'activité des phospholipases dépend de l'interaction de protéines avec la membrane phospholipidique. Le modèle de fixation membranaire de PLA_2 GVIA (fgure10) suggère la pénétration de la région 708-730 dans la surface membranaire avec les régions 631-655,658 et 773-778, interagissant avec le groupement chargé comportant le substrat phospholipidique (Figure18B).

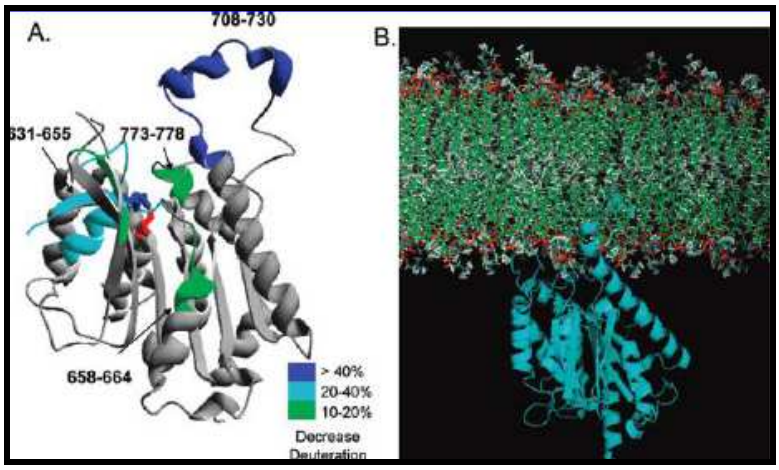

Figure 18: Fixation du phospholipide du Groupe VIA d'iPLA$_2$. (A) Effets de la fixation à la membrane phospholipidique de PLA$_2$ GVIA. (B) Modèle de la surface de fixation lipidique du groupe PLA2GVIA. D'après Hsu *et al*., (2009).

3.2.4. PAF Acétylhydrolases

3.2.4.1. PLA$_2$ Groupe VIIA (Lp-PLA$_2$)

PLA$_2$ GVIIA est une enzyme de 45 kDa de poids moléculaire, qui interagit avec les LDL et les HDL dans le plasma humain (Tjoelker *et al*., 1995). Cette enzyme contient un motif GXSXG, caractéristique des lipases et des sérine-estérases (Tjoelker *et al*., 1995). La structure de PLA$_2$ GVIIA révèle la présence de composés catalytiques Ser/His/Asp (Figure 13A) (Samanta et Bahnson, 2008) . Cette structure renseigne aussi sur la présence de deux hélices α hydrophobes (résidus 114-126 et résidus 362-369), et sur le rôle de l'enzyme dans l'association entre lipoprotéines et lipides membranaires (Samanta et Bahnson, 2008). (Figure19).

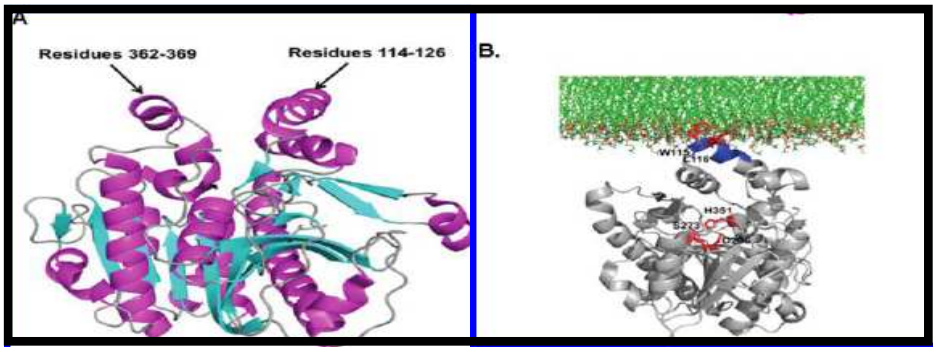

Figure 6: Structure du Groupe PLA2VIIA (A) et modèle hypothétique de l'association de Lp-PLA2 avec la surface membranaire (B). D'après Denis *et al*. (2011).

3.2.4.2. PLA_2 Groupe VIII (PAF-AH Ib)

La structure tridimensionnelle de PLA_2 GVIII/PAF-AH Ib a permis de montrer l'existence d'un complèxe d'homodimères α1/α1 et α2/α2 et un hétérodimère α1/α2 (Benítez *et al*., 2003) (Figure20).

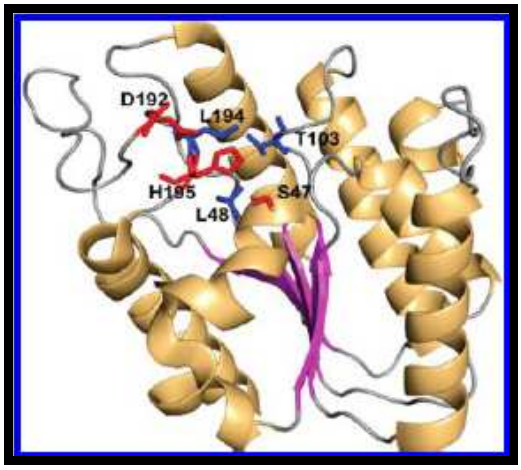

Figure20: Structure du Groupe VIII des PLA2 (PAF-AH IB). D'après Denis *et al*. (2011).

3.3. Mécanismes d'activation

3.3.1. Phospholipase A_2 Sécrétées

Les $sPLA_2$ ont été étudiées pour la première fois à partir du venin de cobra. Elles requièrent pour leur activité catalytique une quantité de calcium de l'ordre du milli molaire.

3.3.2. Phospholipase A_2 Cytosolique

3.3.2.1. Activation calcique

La concentration intracellulaire augmente en réponse à un stimulus extracellulaire, qui induit aussi la translocation de PLA_2 GIVA du cytosol vers la région de la membrane périnucléaire (Channon et Leslie, 1990). La fixation du calcium sur le domaine C2 est cruciale pour la translocation mais pas pour l'activité catalytique (Dessen *et al*., 1999). Le domaine C2 possède trois boucles de fixation du calcium, CBL1, CBL2, et CBL3, qui forment un trou d'anions sur la pointe du domaine C2. La fixation du calcium provoque un changement conformationnel dans le domaine C2 pour stabiliser la structure du domaine (Hsu *et al*., 2008). Cette conformation rigidifiée du domaine C2 est cruciale pour l'orientation correcte du domaine de liaison à la membrane phospholipidique, conduisant à l'activation inter faciale de l'enzyme et facilitant l'hydrolyse phospholipidique.

3.3.2.2. Activation par PIP_2 et C1P

La liaison de PLA_2 GIVA au second messager, la phosphatidylinositol-4, 5 -bisphosphate (PIP_2) peut aussi activer l'enzyme sans l'implication du calcium (Mosior et al, 1998). Cette activation calcium indépendante peut induire une augmentation intracellulaire de PIP_2 et une libération d'acide arachidonique (Balsinde *et al*., 2000). La forte affinité de PLA_2 GIVA avec la PIP_2 207b, est favorisée par le site de fixation formé par les résidus Lys-488, Lys-541, Lys-543, et Lys-544 (Das et Cho, 2002). L'activation par la PIP_2 requiert la présence du domaine C2 (Six et Dennis, 2003).

La Céramide 1-phosphate (C1P) est un sphingolipide bioactif phosphorylé impliqué dans l'inflammation (Lamour et Chalfant, 2005), et dans la signalisation cellulaire en tant que un second messager (Chalfant et Spiegel, 2005). Un analogue de C1P inhiberait PLA_2 GIVA pour induire une toxicité cellulaire (Makiyama *et al.,* 2010). Par contre la céramide kinase, responsable de la synthèse de C1P est un activateur de PLA_2 GIVA (Lamour et Chalfant, 2005). C1P se fixe directement au domaine C2 de PLA_2 GIVA. Contrairement à l'activation par PIP_2, celle de C1P est calcium dépendante.

3.3.2.3. Phosphorylation

Les fonctions cellulaires et l'activité enzymatique de PLA_2 GIVA sont régulées par une phosphorylation qui aurait lieu sur le résidu Ser-505 de la PLA_2 GIVA et serait initiée par la p42 MAP kinase et la PKC (Lin et al., 1993). Les résidus Ser-515 et Ser-727 (Hefner *et al*., 2000), ainsi que d'autres sites de PLA_2 GIVA, peuvent aussi être phosphorylée par des protéines kinases activées par les MAPK, la calmoduline kinase II (CaMKII), et par le *mitogène kinase interacting protein kinase* (MNK1).

3.3.3. Phospholipases A_2 Calcium-indépendantes

3.3.3.1. Activation de l'ATP

La régulation de l'ATP est très importante pour de nombreuses fonctions cellulaires, notamment à l'intérieur de la mitochondrie. PLA_2 GVIA est exprimée à l'intérieur de la mitochondrie dans divers types cellulaires (Brookes *et al*., 2004). L'ATP stabilise la structure ou active PLA_2 GVIA, sans en être un substrat, ni un cofacteur (Lio et Dennis, 1998). L'ATP

empêche la dimérisation et l'oxydation de la cystéine de PLA_2 GVIA, ce qui lui permet de maintenir son activation (Song *et al*., 2006). De même, l'ATP peut se fixer au domaine de répétition d'ankyrine et réguler les canaux calciques (Lishko *et al*., 2007). Ce procédé utilise un mécanisme de fixation complètement différent de celui des protéines Kinases, qui ne requiert pas d'ion métallique.

3.3.3.2. Clivage de la caspase

PLA_2 GVIA joue un rôle prépondérant dans l'homéostasie, permettant de maintenir un niveau adéquat de lysoPC dans les cellules macrophages (Winstead *et al.*, 2000). La protéolyse induite par la caspase sur PLA_2 GVIA, au cours de l'apoptoses, produit une protéine tronquée dans laquelle la répétition d'ankyrine est absente. Dans certains types cellulaires, la protéolyse de la caspase-3 a lieu autant pour PLA_2 GIVA que pour PLA_2 GVIA, mais seule PLA_2 GVIA est activé par ce clivage (Atsumi et *al.*, 1998). Le clivage de la caspase-3 peut être causé par la thapsigargine, qui induit une apoptose, et produit une protéine nucléaire de 62 kDa (Ramanadham *et al*., 2004). Durant cette apoptose, PLA_2 GVIA activée peut causer une dégradation de la membrane et générer des métabolites lipidiques tels que lysoPC, pour la phagocytose (Kim *et al*. 2002).

3.3.3.3. Inhibition de la calmoduline

La calmoduline est activée par la fixation de quatre ions de calcium qui induisent un changement de conformation (Chin et Means, 2000). Les protéines de fixation de la calmoduline peuvent être régulées par le calcium intracellulaire *via* la calmoduline. Bien que l'activité de PLA_2 GVIA soit calcium indépendante, l'activation de la calmoduline par le calcium inhibe son activité (Jenkins *et al*., 2000).

3.3.3.4. Oligomérisation

De nombreux travaux rapportent que PLA_2 GVIA est actif sous la forme d'un oligomère de 340 kDa, formé par un tétramère de l'enzyme de 85kDa. Cette conformation est favorisée par les ankyrines, de façon similaire à l'interaction protéine-protéine observée chez NF*k*B (Sedgwick SG et Smerdon, 1999). D'autres protéines de régulation pourraient s'associer pour permettre l'oligomérisation.

4. Fonctions biologiques des Phospholipases A_2

4.1. Fonctions antivirale et anti bactérienne des $sPLA_2$ (Groupes $sPLA_2$ I, II, III, V, and X)

Plusieurs travaux démontrent la fonction anti bactérienne des $sPLA_2$. $sPLA_2$ GIIA a une action contre les bactéries Gram-positive (Menschikowski *et al.*, 2005) telles que *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, et les bactéries Gram-négative telles que *E. coli* et *Salmonella typhimurium*. De même, la concentration de $sPLA_2$ GIIA dans le sérum de patients atteints de pathologies sévères, est 500 fois plus élevée que chez des sujets sains (Grönroos *et al*., 2002). Cette enzyme présente dans le liquide séminal, les alvéoles et la lumière intestinale, élimine par sa surexpression chez des souris transgéniques, la mortalité liée à l'infection de *Staphylococcus aureus* (Laine *et al*., 1999). Les souris transgéniques exprimant la $sPLA_2$ GIIA humaine, sont résistantes à l'infection par *B. anthracis*. Cette activité antibactérienne est calcium dépendantes et est inhibée par l'ethylene glycol bis (2-aminoethylether)-N,N'-tetraacetic acid (EGTA) (Weinrauch *et al* ., 1998). Pour éliminer la bactérie, l'enzyme doit hydrolyser la membrane plasmique, en pénétrant l'enveloppe peptidoglycane de la bactérie of Gram-positive pour atteindre les phospholipides (Koduri *et al*., 2001). L'action antibactérienne de $sPLA_2$ GIIA est plus importante sur les bactéries en phase exponentielle, grâce à son habilité à atteindre la membrane plasmique pendant la division cellulaire (Foreman *et al*., 1999).

En ce qui concerne l'activité antivirale des $sPLA_2$, les $sPLA_2$ GIII, GV et GX peuvent prévenir l'infection par un adénovirus. $sPLA_2$ GV et GX, par leur activité enzymatique convertissent la phosphatidyl-choline (PC) en lysoPC dans la membrane de cellules hôtes. Cette hydrolyse de la membrane plasmique empêche l'entrée de l'adénovirus (Mitsuishi *et al*., 2006). Par contre, $sPLA_2$ GIII, requiert pour son activité anti-adénovirus, la présence d'un domaine catalytique et d'un domaine N-terminal (Mitsuishi *et al*., 2007). La $sPLA_2$ GX humaine a la particularité de reconnaître et de dégrader l'enveloppe du HIV (Kim *et al*., 2007). De même, les $sPLA_2$ de venins d'abeille et de serpent peuvent bloquer l'entrée de HIV-1 par une inhibition stéarique du récepteur de la chémokine sur les cellules cibles, sans nécessiter une activité catalytique (Fenard *et al*., 2001).

4.2. Hydrolyse des phospholipides

PLA_2 GIVA hydrolyse l'acide arachidonique en position *sn-2* des phospholipides membranaires, en réponse à un stimulus externe18a, (Uozumi et Shimizu, 2002). L'acide arachidonique libre est métabolisé par la voie de la cyclooxygénase (COX) ou celle de la

lipooxygénase (LOX). D'une part, COX-1 et COX-2, ainsi que d'autres synthases convertissent l'acide arachidonique et génèrent la prostaglandine et la thromboxane (Murphy *et al*., 1979). D'autre part, la 5- ou la 12/15-lipoxygénase, la leukotriène A4 synthase et la LTC4 synthase produisent les leucotrènes et les lipoxines (Murphy *et al*., 1979).

Les lysophospholipides sont aussi des produits de l'hydrolyse par PLA_2 GIVA des phospholipides.

4.3. Fonction de régulation de l'appareil de Golgi

Le complexe de Golgi et le réseau associé sont des organelles impliquées dans le trafic des lipides et des protéines cellulaires. PLA_2GIVA peut agir comme une enzyme de régulation du système de Golgi, lorsqu'elle est localisée près de ce système (De Matteis et Luini, 2008).

4.4. Régulation de la NADPH Oxidase

PLA_2 GIVA régule la stimulation de NADPH oxidase pour produire des superoxides (Levy, 2006). La production de PGE_2 serait liée à la translocation de PLA_2 GIVA vers la membrane nucléaire et la production de superoxides liée à la translocation vers la membrane plasmique (Levy, 2006). PLA_2 GIVA est liée à la membrane plasmique par la NADPH oxidase qui sert de protéine adaptatrice (Levy, 2006).

4.5. Autres fonctions

Les membres du groupe VI des PLA_2 possèdent différentes activités catalytiques. Les PLA_2 GVID, GVIE et GVIF, sont localisées dans les cellules adipeuses. L'acylation des acides gras est la fonction cellulaire principale de ces enzymes (Jenkins *et al*., 2004). PLA GVIA est impliquée dans la prolifération cellulaire, le cycle cellulaire, l'apoptose la formation osseuse, la formation du sperme, la secrétion de l'insuline glucose dépendante, l'acétylation de la cardiolipine, et le recruitement de monocyte (Dennis *et al*., 2011). Les PLA_2 GVI sont impliquées dans la régulation et la réentrée du pool calcique (*store-operated calcium*) (Boittin *et al*., 2008). Les fonctions des PLA_2 GVIA sont aussi liées aux muscles (Boittin *et al*., 2006).

$LPLA_2$ joue un rôle important dans la dégradation phospholipidique lysosomale. $LPLA_2$ peut être impliquée dans le catabolisme des phospholipides tensio-actif dans les macrophages alvéolaires. De même, $LPLA_2$ serait impliquée dans la phospholipidose (Hiraoka *et al*., 2006).

5. Implications pathologiques et interventions thérapeutiques

5.1. $sPLA_2$ et Inflammation ($sPLA_2$ Groupes II, V, and X)

Le rôle des $sPLA_2$ dans les maladies inflammatoires a été mis en exergue par la présence de $sPLA_2$ GIIA dans le liquide synovial de patients atteints d'arthrite rhumatismale (Seilhamer *et al*., 1989). Chez les souris ayant une déficience du gène de $sPLA_2$ GIIA, une diminution de l'arthrite a été observée. $sPLA_2$ GV, moins présente dans le liquide synovial, exerce la même fonction anti-inflamatoire. Par ailleurs, de fortes concentrations de $sPLA_2$ ont été détectées dans le sérum ou le plasma de patients atteints de pancréatite, de choc septique, de syndrome de Crhon, d'ulcère. Cette action anti-inflammatoire est liée à l'activité enzymatique des $sPLA_2$, par la libération d'acide gras tel que l'acide arachidonique (AA). L'AA initie la biosynthèse des médiateurs lipidiques, les prostaglandines, thromboxanes et leucotriènes. De plus, le produit de l'hydrolyse, le lysophospholipide, est un facteur pro-inflammatoire (Dennis, 2000). L'implication des $sPLA_2$ dans la libération d'AA et la biosynthèse d'éicosanoide a été rapportée par divers travaux. $sPLA_2$ GIIA contrôle la libération d'AA, cytokine ou ionophore dépendante (Murakami *et al*., 1998). En plus de réguler la phagocytose par la libération d'eicosanoide dans les macrophages de souris (Balestrieri *et al*., 2008), l'addition de $sPLA_2$ GV humaine induit la libération d'AA mais aussi de leucotriènes C4 (LTC4) et B4 (LTB4) (Kim *et al*., 2002), à partir des neutrophiles humains. Le mécanisme d'action de $sPLA_2$ GV passerait par l'hudrolyse de la membrane de neutrophiles, pour libérer la lysoPC et les acides gras. Ces derniers induiraient une augmentation de la concentration de calcium.

Par ailleurs, $sPLA_2$ GX induit la libération d'AA (Hanasaki *et al*., 1999) et est impliquée dans l'inflammation par la libération d'éicosanoide (Henderson *et al*., 2007).

En plus de la production d'éicosanoide, les $sPLA_2$ peuvent induire d'autres facteurs pro-inflammatoires à partir des macrophages, des neutrophiles, des éicosinophiles, des monocytes et des cellules endothéliales (Granata *et al*., 2009). $sPLA_2$ GIB, GIIA, GV, et GX induisent la production de cytokines et chémokines pro-inflammatoires en l'absence d'activité enzymatique (Triggiani *et al*., 2000).

5.2. $sPLA_2$ et athérosclérose ($sPLA_2$ Groups II, III, V, and X)

Les $sPLA_2$ GIIA, GV et GX ont été détectées dans les lésions d'athérosclérose chez l'homme et chez la souris ; ces enzymes faciliteraient l'accumulation de lipides à l'intérieur des artères (Rosenson et Gelb, 2009). Ceci justifie la forte présence de $sPLA_2$ dans le sérum de jeunes adultes atteints de syndromes métaboliques (Mattsson *et al*., 2010). Les souris transgéniques

exprimant la $sPLA_2$ GIIA humaine, ont des symptômes caractéristiques associés à l'athérosclérose, la diminution des *high-density lipoprotein* (HDL-cholesterol) et l'augmentation des *low density lipoprotein* (LDL/VLDL-cholesterol) (Castellani *et al.*, 1999), d'une part, et d'autre part, l'expression d'Apo-lipoprotéine B100 (Apo B100) qui favorise aussi la synthèse de petite particules de LDL enrichies en lysoPC (Flood *et al*. 2004).

Le mécanisme d'action des $sPLA_2$ dans l'atherogénèse passe par l'hydrolyse des phospholipides en particules LDL ; ces derniers favorisent l'accumulation lipidique et l'augmentation des macrophages (Gesquiere *et al*., 2002). $sPLA_2$ GV et GX ont une plus grande affinité avec la PC, favorisant ainsi l'hydrolyse. D'après Wooton-Kee *et al*., 2004 ; Boyanovsky *et al*., 2005, l'action de $sPLA_2$ GV sur les LDL serait indépendante de récepteurs *scavenger* tels que SR-A et CD36. Contrairement à $sPLA_2$ GV et GIIA, $sPLA_2$ GX n'induit pas l'agrégation des LDL, ni la fixation aux protéoglycans (Karabina *et al*., 2006), mais supprime dans les macrophages l'expression des protéines de transport ABCA1 et ABCG1 qui induisent un efflux de cholestérol (Shridas *et al*., 2010). L'action de $sPLA_2$ GIII quant à elle, passe par l'altération des niveaux de lipoprotéines plasmatique (Sato *et al*., 2008).

$sPLA_2$ GX induit la *Platelet Activating Factor* (PAF) (Gora *et al*., 2006), alors que l'hydrolyse par $sPLA_2$ GV induit l'expression de l'ARNm de TNF-α et IL-6 et l'activation de NFκB (Boyanovsky *et al*., 2010).

5.3. Cancer

En dehors du rôle des $sPLA_2$ chez les patients asthmatiques, les $sPLA_2$ GIIA, GIB, GX, et GIII auraient une implication dans le développement de tumeurs. La $sPLA_2$ GIIA est surexprimée dans les cancers de la prostate chez l'homme et chez les patients atteints d'adénome colorectal d'origine familiale (Dong *et al*., 2010 ; Jiang *et al*., 2002) . Ces résultats rendent compte de l'implication des $sPLA_2$ dans le développement de tumeurs. Ce rôle est toutefois controversé car il n'est pas strictement établi si elles jouent un rôle suppresseur ou promoteur.

Les modifications apportées aux taux et à l'activité fonctionnelle de PLA_2 GIVA ont été associées au développement du cancer. L'activation de PLA_2 GIVA serait impliquée dans la croissance des cellules cancéreuses du sein via l'œstrogène (Caiazza *et al*., 2010). L'inactivation de PLA_2 GIVA chez la souris a développé 43% de tumeurs de moins que des souris sauvages toutes exposées à un produit cancérigène (Meyer *et al*., 2004).

5.4. Diabète

PLA_2 GVIA est impliquée dans l'apoptose des cellules β, la production de superoxide et l'activation de la RhoA/Rho kinase induite par le glucose. L'apoptose des cellules β, par la perte de la masse cellulaire est liée au développement des diabètes de type 1 et 2 (Lei *et al*., 2010).

5.5. Syndrome de Barth

Le syndrome de Barth est associé aux mutations du gène de la tafazine (TAZ) lié au chromosome X. Dans la mitochondrie, la tafazine est impliquée dans l'homéostasie de la cardiolipine, un composé phospholipidique de la membrane mitochondriale (Houtkooper *et al*., 2009). PLA_2 GVIA permet de maintenir l'intégrité de la membrane mitochondriale, et empêche la libération de cytochrome C lors du stress oxydatif. PLA_2 GVIA est donc impliquée dans le remodelage de la mitochondrie, mais aussi dans la déacylation de la cardiolipine et l'accumulation de monolyso-cardiolipine dans le syndrome de Barth (Malhotra *et al*., 2009).

5.6. Troubles neuronaux

De récents travaux rapportent que des mutations de PLAGVIA induisent des troubles tels qu'une dystrophie neuroaxonale infantile et une neuro-dégénérescence avec accumulation de fer dans le cerveau (NBIA) (Gregory *et al*., 2008 ; Kurian *et al*., 2008). La fonction estérase du Groupe VIC PLA_2 caractéristique des neuropathies a été confirmée par l'apparition de diverses pathologies neurologiques suite à l'inhibition de l'enzyme (Rainier *et al*. 2008). La sous-unité β de PAF-AH Ib est un produit du gène LIS1 impliqué dans la lisencéphalie de type I, une sévère pathologie causée par la migration anormale des neurones lors de la formation du cerveau (Koizumi *et al*., 2003).

5.7. Lp-PLA_2 et Atherosclerose

Principalement sécrétée par macrophages, Lp-PLA_2 est considérée comme une enzyme qui joue un rôle très important dans le développement de l'athérosclérose. Cependant, depuis sa découverte, ce rôle de la Lp-PLA_2 dans l'athérosclérose a toujours été controversé. Le rôle pro-athérogénique de Lp-PLA_2 a été mis a jour par l'utilisation d'inhibiteurs GlaxoSmithKline (GSK) SB-$_2$22657 et SB-677116, montrant la baisse de la production de lyso-PC et d'acides gras non estérifiés (Carpenter *et al*., 2001).

5.8. Lp-PLA_2 et Entérocolite nécrosante néonatale

Lp-PLA_2 et $LPLA_2$ jouent un rôle prépondérant dans l'athérogénèse et l'entérocolite nécrosante néonatale. Cette pathologie atteint les enfants prématurés et est caractérisée par l'apparition soudaine d'une nécrose inflammatoire de l'intestin. Les enfants atteints ont une accumulation systématique des niveaux de Lp-PLA_2 (Caplan *et al*., 1990).

5.9. Autres pathologies

Plusieurs fonctions biologiques des sPLA_2 sont indépendantes de leur activité enzymatique. Certains membres de la famille auraient une action anticoagulante, mais de façon intéressante, la sPLA_2 GIB du suc pancréatique, serait impliquée dans le développement de l'obésité et de la résistance à l'insuline liés à la consommation d'acides gras (Huggins *et al*., 2002). Des études chez des souris ayant un défaut du gène d'AdPLA ont montré son implication dans le développement de l'obésité liée à son rôle dans la production des tissus adipeux (Jaworski *et al*., 2009).

Une forte activité des sPLA_2 a lieu dans le liquide des alvéoles bronchiales de patients asthmatiques. sPLA_2 GIIA et GX seraient responsables de la majorité de l'activité enzymatique dans les alvéoles bronchiales (Hallstrand *et al*., 2011).

Des patients peuvent porter des mutations dans la région codante de PLA_2 GIVA. Ces mutations peuvent impacter l'interaction avec la membrane plasmique (Burke *et al*., 2008). Les patients avec ces mutations ont une absence d'activité de PLA_2 dans les plaquettes ou une ulcération intestinale. Des souris KO PLA_2 GIVA développées en 1997, ont montré que cette enzyme n'était pas indispensable pour le développement. Ces souris développent toutefois de nombreuses affections telles que des dommages liés aux acides gras au foie, un diabète, et une forte baisse de la production de médiateur lipidique (Oikawa *et al*., 2005).

6. Inhibiteurs chimiques

6.1. Premiers développements d'analogues phospholipidiques

Les premières tentatives de développement d'ihnibiteurs de PLA_2 se focalisèrent sur des analogues phospholipidiques à partir des années 80. Parmi les inhibiteurs des PLA_2 issues du venin de cobra la 1-Stearyl-2-stearoylaminodeoxy phosphatidylcholine serait moins active qu'un dérivé de la phosphatidylethanolamine et les analogues phospholipidiques contenant un groupement phosphate en position *sn*-2 de la chaine carbonée du glycérol (Yuan *et al*., 1990).

6.2. Acides dicarboxyliques

En 1992, Bristol-Myers Squibb présenta un acide di carboxylique, inhibiteur d'une PLA_2 de 14 kDa132, qui bloque la libération de l'AA (IC_{50}=10µM), la LTB4 et la PAF dans des cellules humaines stimulées par un ionophore, A23187 (Tramposch *et al*., 1994). Par la suite, les inhibiteurs BMS-188184 et BMS-181162 ont été développés et le second serait en étude clinique dans le cadre de la lutte contre le psoriasis. Les composés avec un groupe hydrophobe seraient de meilleurs inhibiteurs de PLA_2. Les laboratoires ROCHE ont développé un inhibiteur de PLA_2 présent dans le liquide synovial contenant un groupement d'acide imino-di acétique (LeMahieu *et al*., 1993).

6.3. Amides, Sulfonamides et Oxoamides

Il existerait des inhibiteurs de PLA_2 non phospholipidiques, dans lesquels, un simple groupement carboxyle remplace la phospho-choline. FPL67047XX serait l'inhibiteur le plus actif de ce groupe, avec une action contre les $sPLA_2$ des plaquettes humaines (Cha *et al*., 1996).

Une nouvelle classe d'inhibiteurs de PLA_2 GIVA a été reportée, AX006 et AX007. Ces inhibiteurs contiennent la 2-oxoamide et un groupement carboxyle libre. Les composés 2-oxoamides inhiberaient autant PLA_2 GIVA mais aussi PLA_2 GVIA (Kokotos *et al*., 2004).

6.4. Indoles

En 1995, il a été découvert un inhibiteur de $sPLA_2$ qui possède une structure indole. Les indole-3-acétamides exercent une interaction avec le site actif des enzymes. LY315920 ou Varespladib est un inhibiteur de PLA_2 GIIA humaine. Les dérivés de LY315920, l'indoxame (Yokota *et al*., 1999) et bien d'autres composés de cette famille ont été rapportés dans le cadre du développement d'inhibiteurs des $sPLA_2$.

Lehr a développé une série d'indoles, tels que des dérivés de l'acide 3-acyl-indole-2-carboxylique (Lehr, 1996) comme inhibiteurs des $cPLA_2$. Divers composés ont été ainsi développés pour leur propriétés et sont utilisés en clinique.

6.5. Oxadiazolones

Une série de 4-alkoxybenzamidines a été synthétisée et leur action inhibitrice sur les $sPLA_2$ évaluée. PMS815 et plusieurs oxadiazolones exercent une action inhibitrice sur $sPLA_2$ GII, alors qu'ils n'ont aucun effet sur les groupes I et III (Assogba *et al*., 2005).

6.6. Aptamères et Peptides

Une famille de séquence développée par la technologie SELEX (*systematic evolution of ligand by exponential enrichment*), se lierait aux $sPLA_2$ humaines non pancréatiques avec des affinités nano molaires et inhiberait l'activité enzymatique (Bridonneau *et al*., 1998). Le peptide linéaire 36 (PIP-18) inhibe l'activité de la $sPLA_2$ synoviale humaine recombinante. Le peptide interfère avec la fonction de la $sPLA_2$, mais il inhiberait aussi l'expression de l'ARNm de la $sPLA_2$ ainsi que la production de protéines correspondantes (inhibition supérieure à 80%).

6.7. Trifluoromethyl Kétones, Polyfluoroketones et Tricarbonyles

Plusieurs composés, substituts de trifluoromethyl Kétones ont des effets inhibiteurs sur la PLA_2 GIVA.

Le premier inhibiteur de PLA_2 GIVA fut l'*activated ketone arachidonoyl trifluoromethyl ketone* (AACOCF3) (Street *et al*., 1993). AACOCF3 exerce une inhibition dose dépendante sur l'enzyme. Ce composé inhibe l'activité lysophospholipase et la production d'acide arachidonique (Riendeau *et al*., 1994 ; Li et Cathcart, 1997). Récemment, l'inhibition par AACOCF3 a montré une réduction des déficits cognitifs dans la maladie d'Alzheimer (Kalyvas et David, 2004). De même, la palmitoyl trifluoromethyl ketone, la trifluoromethyl ketone et les analogues d'acide γ-linolenique et d'acide linoleique sont aussi des inhibiteurs de PLA_2 GIVA (Amandi-Burgermeister *et al*., 1997).

Dans les macrophages, les PLA_2 calcium indépendantes peuvent être inhibées par AACOCF3 et par la palmitoyl trifluoromethyl-ketone (Ackermann *et al*., 1995). Plusieurs composes trifluoromethyl-kétones ont une action inhibitrice sur PLA_2 GVI, avec une action jusqu'à 10 fois plus importante que celle obtenue sur PLA_2 GIVA (Denys *et al*., 2011). La pentafluoroethyl kétone, FKGK18 sont d'autres composés ayant une action inhibitrice sur PLA_2 GVIA (Denys *et al*., 2011). Cette classe d'inhibiteurs a permis de montrer le rôle de PLA_2 GVIA dans le développement de scléroses (Kalyvas *et al*., 2009).

6.8. Pyrroles et Pyrrolidines

Une série de substituts de pyrroles a été développée. Plusieurs de ces molécules ont une activité simaire à AACOCF3.

La pyrrophénone est un inhibiteur de PLA_2 GIV qui agit sur la libération de l'acide arachidonique, la formation de la prostaglandine E_2, la thromboxane B_2 et la leucotriène B4. Le degré d'inhibition sur la PGE_2 et la thromboxane B_2 est le même que celui de l'indométhacine (Lehr, 1996).

6.9. Methyl Fluorophosphonates

MAFP est un inhibiteur irréversible de PLA_2 GIVA et PLA GVIA (Lio *et al*., 1996). L'administration de MAFP prévient de manière dose dépendante l'hyperalgésie (Svensson *et al.*, 2005).

6.10. Bromoenol Lactone

Bromoenol lactone (BEL) est un inhibiteur covalent irréversible de PLA GVIA. Song *et al*. (2006) rapportent que cette inhibition se fait par la production de bromomethyl keto-acid qui va induire une alkylation des groupements thiols de la cystéine, plutôt que de générer un intermédiaire acyl-enzyme vers le site actif de la sérine. Dans les cellules 3T6, BEL inhibe la libération d'acide arachidonique et la production de $PGDE_2$ stimulées par le sérum de veau fœtal (Sanchez et Moreno *et al*., 2001). Cet inhibiteur agit à de très faibles concentrations comparativement aux inhibiteurs des PLA_2 calcium dépendantes. Toutefois, BEL peut avoir une action sur les autres familles PLA_2. L'utilisation de cet inhibiteur requiert donc une confirmation par d'autres types d'inhibiteurs. D'un point de vue thérapeutique, l'inhibition par BEL activerait la voie de signalisation de la p38 MAPK durant la cytostase des cellules cancéreuses de la prostate (Sun *et al*., 2010).

6.11. Pyrimidones et Azetidinones

Les pyrimidones sont des inhibiteurs réversibles de Lp-PLA_2. Une série de β lactames monocycliques (Azetidinones**)** a été développée en 1998 comme inhibiteur de Lp-PLA_2 (Tew *et al*., 1998). SB-222657 a été utilisé comme inhibiteur de Lp-PLA_2 pour montrer le rôle de l'enzyme dans la modification oxydative des lipoprotéines (MacPhee *et al*., 1999).

6.12. Produits naturels

Dans les années 1980, le manoalide 37 un sesterpène, produit naturel fut le premier inhibiteur de PLA_2 de venin de cobra, du venin d'abeille et du liquide synovial humain découvert (Lombardo et Dennis, 985). Il a été isolé chez l'éponge *Luffariella variabilis*, avec une activité anti-inflammatoire *in vivo*. Plusieurs composés naturels sont en phase d'étude clinique pour leur propriété d'inhibition de $sPLA_2$. Le thielocine B3 et YM-26567 sont des inhibiteurs naturels de la $sPLA_2$ (Tanaka *et al*., 1994).

6.13. Autres inhibiteurs

L'Annexine V appartient à une famille de protéines qui interagit avec les phospholipides d'une manière calcium dépendante pour inhiber l'activité de PLA_2 GIVA (Mira *et al*., 1997). D'autres composés tels que les Aryl-sulfonamides, les dérivés de 9,10-Dihydro-9,10-ethano-

anthracene, une série de pyrimidines, agissent de manière spécifique sur PLA_2 GIVA (Varghese *et al*., 1998)

7. Autres lipases possédant une activité des phospholipases A_2

De nombreuses protéines humaines ne sont pas catégorisées comme PLA_2 mais possède une activité phospholipase A_2 (Tableau 10).

Type	Nom	Nom alternatif	Homologie	Identification	Résidus/ masse molaire	Autre activité
$sPLA_2$	Otoconin-90	PLA_2L $sPLA_2$	$sPLA_2$	protein (mouse)	493/53	lyso-lecithine
$cPLA_2$	PLB1	phospholipase B1	PNPLA6	protéine	1458/163	lecithine acylhydrolase
$iPLA_2$	PNPLA7 PNPLA5 PNPLA1	NRE GS2-like		Protein	1317/145 429/47 532/57	Lyso-TG-hydrolase
ai PLA2	peroxiredoxin-6	1-cys peroxiredoxin $aiPLA_2$		Protein	224/25	Activité peroxiredoxine

Tableau 10: Liste des protéines humaines non classées et ayant une activité PLA_2. D'après Denis *et al*. (2011).

7.1. Otoconin-90 (Homologue $sPLA_2$)

Les $sPLA_2$ sont caractérisées non seulement par leur sécrétion extracellulaire, mais aussi leur petite taille, leur pont disulfure et leur site actif composé des résidus His/Asp. L'Otoconine-90/95 (OC 90), aussi appelé PLA_2-like (PLA_2L), contient un domaine similaire aux groupes I, II, V et X des $sPLA_2$. OC90 contient chez l'homme possède 493 acides aminés, et 453 chez la souris. L'otoconine est le composé principal de l'otoconie, impliquée dans la gravité chez les mammifères (Wang *et al*., 1998). OC90 n'a toutefois pas été classé comme une PLA_2.

7.2. Phospholipase B (Homologue $cPLA_2$)

La phospholipase B, précédemment désigné comme une PLA_2 13, n'en est pas clairement une à ce jour. Les membres PLB1 PLB2, et PLB3 peuvent hydrolyser les substrats phospholipidiques en position sn-1 et sn-2 (Jones *et al*., 2007).

7.3. PNPLA (Homologue iPLA$_2$)

Chez PLA_2 GVI (iPLA$_2$) l'élément clé est le domaine caractéristique de la patatine ; ce domaine est présent chez les membres de la famille PNPLA (Kienesberger *et al*., 2009). Il existe neuf membres de cette famille (PNPLA1-9) et six sont des PLA_2 GVI (Schaloske et Dennis, 2006) .

7.4. aiPLA$_2$ (Peroxiredoxin-6)

La peroxyderedoxine 6 (Prx6) contient chez les mammifères un domaine cystéine très conservé dans son site actif pour catalyser la réduction de l'hydrogène peroxyde et des alkyl-hydro-peroxydes. Cette enzyme de 25 kDa serait une enzyme bi fonctionnelle, possédant une activité peroxydase et une activité phospholipase A_2 (Kim *et al*., 1997).

8. Conclusion

Les phospholipases A_2 ont été étudiées depuis plus d'un siècle. Elles ont été extraites initialement du venin d'une variété de serpents, et à partir d'extraits de pancréas de mammifères. Dans ce chapitre, nous avons mis l'accent sur les fonctions biologiques des PLA_2, principalement en tant qu'enzymes digestives. Le développementd'antagonistes et d'agonistes de ces enzymes permet de développer des composés pharmacologiques capables de moduler leurs fonctions cellulaires. La structure, les fonctions protéiques et les interactions membranaires des PLA_2 ont aussi permis de mieux connaitre ces enzymes.

De toutes les fonctions étudiées chez les PLA_2, celle qui nous intéresse le plus est l'intervention dans la coupure des AGLC dans la cavité buccale afin de permettre la perception des acides gras alimentaires par les cellules gustatives lipidiques.

Le chapitre suivant expose les modalités gustatives en général, décrit la signalisation cellulaire dans les bourgeons du goût, et présente les mécanismes post-oraux de la perception gustative.

Chapitre 3 : Les modalités gustatives et la signalisation cellulaire

1. Introduction

Les cellules sensorielles dédiées à la gustation sont regroupées dans des structures sphériques, les bourgeons du goût (Figure21). Le nombre de bourgeons du goût peut varier d'une espèce à l'autre, allant de 500 à 20000 bourgeons. La majorité de ces bourgeons est localisée sur la face dorsale de la langue. D'autres structures telles que le palais mou, le pharynx et même la partie supérieure de l'œsophage en comptent une moindre proportion.

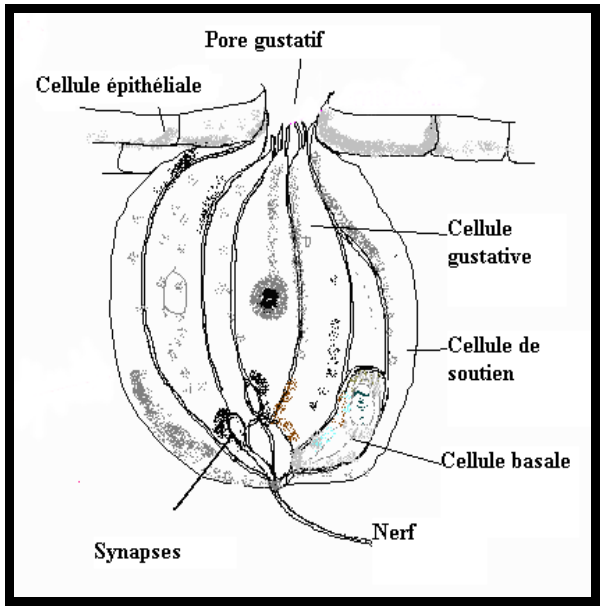

Figure21: Illustration schématique d'un bourgeon du goût. Adapté de *www.spectrosciences.com*.

Les bourgeons sont incrustés dans l'épithélium lingual et regroupés par fonction dédiée, en papilles. Il existe quatre types de papilles : les caliciformes ou *circumvallate* situées dans la partie postérieure de la langue, les fongiformes disséminées au niveau de la partie frontale de la langue, les foliées situées sur les cotés de la langue et les filiformes qui donnent à la langue sa texture (Figure 22). Chez la souris, les quatre types de papilles sont exprimés, bien qu'il n'y ait qu'une seule papille caliciforme. Les cellules gustatives constituent le siège de nombreuses interactions entre les molécules sapides et les récepteurs dédiés à leur perception. Dans ce chapitre, nous passons en revue la structure et les fonctions des cellules gustatives afin de mieux comprendre la signalisation déclenchée par des agonistes tels que les acides gras alimentaires.

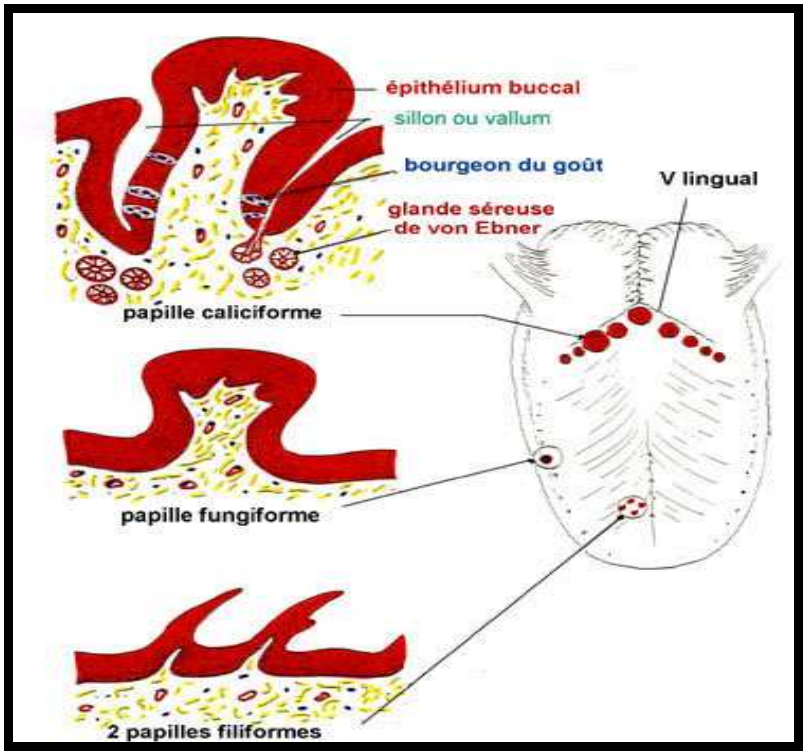

Figure22: Structure des papilles gustatives

2. Les cellules gustatives

Les papilles gustatives sont des organes sensoriels de la gustation. Chaque bourgeon du goût contient 50 à 80 cellules gustatives allongées entourées par des cellules de soutien prolifératives et périphériques (Wakisala, 2005). Ces bourgeons en forme de bulbe d'oignon laissent un pore ouvert vers l'extérieur (Figure21).

Les critères morphologiques, neurologiques, et fonctionnels acquis par les cellules gustatives au cours de leur différenciation, ont permis de distinguer trois types I, II et III de cellules du goût (Murray, 1993). Ces trois types de cellules se différencient par leur forme cellulaire globale, leur structure apicale, leur configuration nucléaire, leurs organites et la densité de leur cytoplasme (Figure 23).

2.1. La différenciation des cellules gustatives

La différenciation des cellules gustatives peut être expliquée à l'aide de deux hypothèses. D'après Finger (2005) les trois types cellulaires I, II, III pourraient dériver d'une seule population cellulaire proliférative, où il existerait deux populations de cellules souches ; l'une se différencierait en cellules de type I et l'autre en cellules de type II ou III. Cette deuxième hypothèse permet d'envisager une première différenciation en cellules de type III, puis une

suivante en cellules de type II. La transformation nécessiterait une réorganisation majeure du cytosquelette apical et une perte des structures synaptiques.

2.2. Les différents types de cellules gustatives

2.2.1. Les cellules gustatives de type I

Les cellules de type I sont minces et possèdent une très forte densité cytoplasmique. La partie apicale cytoplasmique présente des granules de 100 à 400 nm. Leurs nombreuses microvillosités peuvent affleurer dans la cavité buccale (Figure 23).

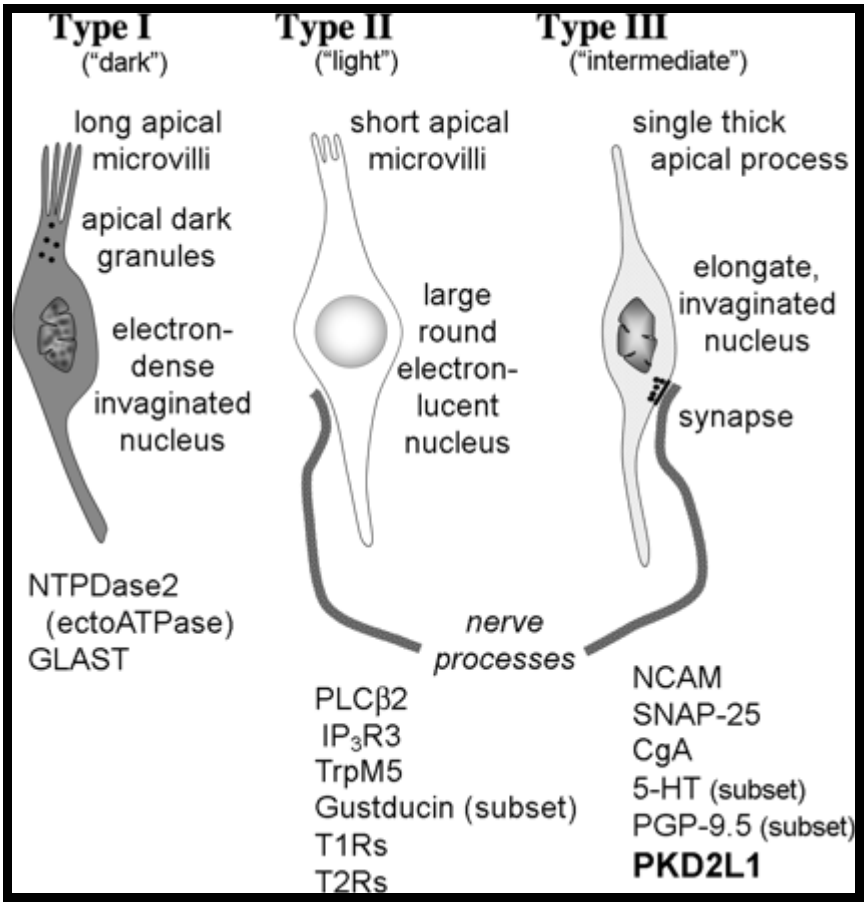

Figure 23 : Les caractéristiques des types I, II et III de cellules gustatives chez les rongeurs.
D'après Kataoka *et al*., (2008)

2.2.2. Les cellules gustatives de type II

Les cellules de type II ont un noyau rond et large, mais de courtes microvillosités uniformes. Elles expriment de nombreuses molécules impliquées dans la transduction des stimuli gustatifs des saveurs sucrées, amères et umami, grâce entre autres aux récepteurs T1R et T2R

(Hoon *et al*, 1999 ; Miyoshi *et al*, 2001). Des molécules de transduction de signal sont exprimées par des cellules de type II, suggérant leur activité sensorielle. En effet ces cellules expriment des marqueurs de la transduction des signaux gustatifs, l'α-gustducine (Boughter *et al*, 1997 ; Yang *et al*, 2000), la phospholipase C β_2 et le récepteur de l'inositol-triphosphate (IP_3R) (Clapp *et al*., 2001 ; Miyoshi *et al*., 2001).

2.2.3. Les cellules gustatives de type III

Les cellules de type III sont minces. Leur densité et leur morphologie sont intermédiares entre le type I et le type II des cellules du goût figure 23). Ces cellules possèdent une seule microvillosité et forment des synapses avec le nerf gustatif. Elles expriment la protéine membranaire synaptique SNAP25 (*synaptic associated protein*, 25 kDa) (Yang *et al*, 2000) et la molécule d'adhérence neuro-cellulaire, NCAM (*neuronal cell adhesion molecule*) (Nelson et Finger, 1993). La présence de connexions synaptiques dans les cellules de type II laisse envisager leur implication dans la transmission de l'information gustative vers les centres nerveux afférents (Lindermann, 1996 ; Murray 1986). Toutefois, ces synapses ne sont pas les structures synaptiques classiques. Les bourgeons du goût de la papille caliciforme ont une immuno réactivité avec un neuromédiateur, la sérotonine (Kim et Roper 1995). Cette population cellulaire n'exprime pas l'α-gustducine (Yee, *et al*. 2001).

2.3. La communication intercellulaire

Ces trois types cellulaires I, II et III seraient respectivement des cellules gliales, des récepteurs et des cellules pré-synaptiques (Boughter *et al*, 1997 ; Yang *et al*, 2000). Les cellules de type II et III expriment des marqueurs communs tels que la synaptobrevine-2 (Yang *et al*., 2004), l'ubiquitine carboxyle terminale hydrolase (PGP 9.5). (Yee, *et al*. 2001). Il existerait une communication entre les types cellulaires II et III, du fait qu'elles expriment les mêmes marqueurs (Figure24).

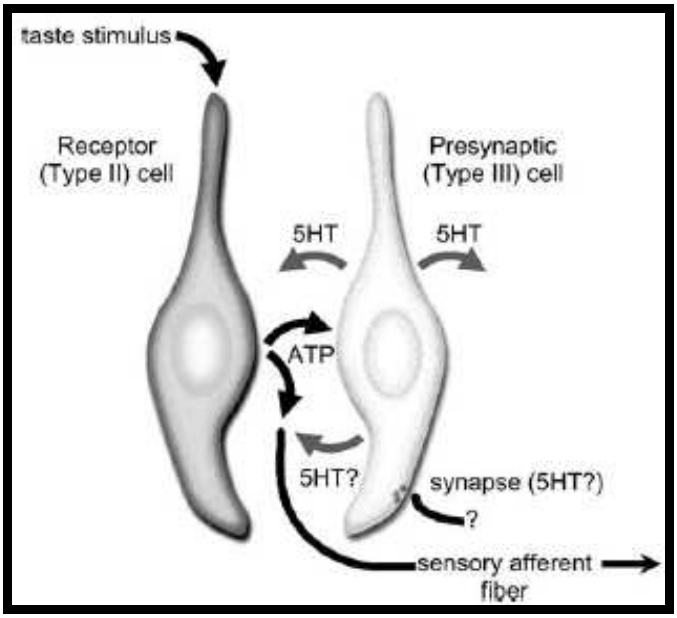

Figure24: Les communications cellules-cellules dans les bourgeons du goût de papille caliciforme de souris. D'après Roper, (2007)

Les communications de cellules à cellules dans les bourgeons du goût sont différemment interprétées. Elles faciliteraient la transmission d'information vers le système nerveux central. Selon Roper (2007). Les cellules réceptrices de type II secrètent l'ATP suite à une stimulation gustative. L'ATP stimulerait les fibres nerveuses afférentes *via* les cellules pré synaptiques de type III. Ces fibres favorisent la libération de sérotonine (5-HT). Les sites post-synaptiques de le 5-HT pourraient inclure d'autres types cellulaires, pour une activation paracrine.

3. La transduction du goût

3.1. Les récepteurs du goût

Le goût est un système sensoriel impliqué dans la détection des composés variés qui produisent de l'énergie calorique. Il permet de détecter et de distinguer les stimuli sucré, amer, acide, salé et l'umami (Lindermann, 2001). L'étape initiale de cette perception passe par les récepteurs présents dans les cellules du goût et est médiée par les canaux ioniques. Les cinq variantes du goût connues à ce jour passent par les récepteurs (TR, Taste Receptor) couplés à la protéine G (Hoon *et al*., 1999). Les récepteurs T2R seraient impliqués dans la détection du goût amer (Chandrashekar et al., 2000). T1R3 est sensible au sucré (Max *et al.*, 2001). Les récepteurs T1R1 et T1R2 seraient responsables de la détection du sucré et de l'Umami chez les mammifères. L'umami serait aussi perçu par le récepteur mGluR4 (Chaudhari *et al*, 2001). Tous les récepteurs T1R et T2R sont des cellules du goût de type II.

Différents mécanismes sont proposés par Gilberson *et al.* (2000) pour expliquer les transductions du signal dans les TRCs chez les Vertébrés. Cette voie de la PLC β est aussi utilisée par le goût sucré. Aucune voie n'est unilatérale, certaines transductions peuvent utiliser d'autres médiateurs ou intervenir de façon simultanée à d'autres.

Les récepteurs orphelins T1R (Figure 25a), les récepteurs activés par les composés amers T2R/TRB (Figure 5b), et le récepteur du goût umami (tmGluR4, figure 25b) contiennent sept hélices transmembranaires. Il s'agit d'une caractéristique typique des RCPG. Les MDEG/ENaC (Figure 5d), sont des canaux ioniques dont les membres ENaC (*epithelmial sodium channel*), ASIC (*acid-sensing ion channels*), DRASIC (*dorsal root ganglion ASIC*) et MDEG (*mammalian degenerin*) sont les plus simples avec deux domaines transmembranaires. Ces récepteurs permettent la transduction des goûts salé et acide.

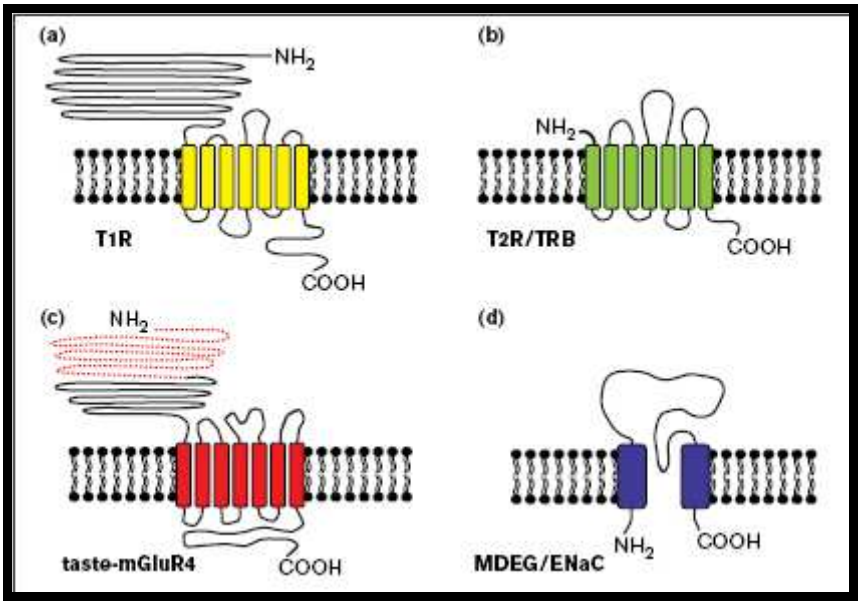

Figure25: Topologie membranaire des récepteurs des TRC. D'après Gilbertson et al., (2000).

3.2. La gustducine

Les protéines G (*Guanine nucleotide binding proteins*) sont des membres des GTPases. Elles sont un relais pour la transduction de signaux à traves la cellule. Leur découverte a été récompensée par un prix Nobel en 1994 (Gilman et Rodbel). Les protéines G possèdent des sous-unités α, β, et γ. Les sous-unités G α sont composées du domaine GTPase et d'une hélice α. Les réactions biochimiques sont contrôlées par l'équation GTP↔GDP. L'α-Gustducine est un marqueur spécifique des TRC qui contrôle deux sortes de réponses, une diminution de

l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) dans les TRC et une production de l'IP_3 (Gilbertson 2000). Les souris ayant une déficience en α-Gustducine ont une réponse moindre suite à l'ingestion de composés amers et sucrés (Wong *et al*., 1996).

3.3. Les modalités gustatives

3.3.1. Le sucré

Le goût sucré active une voie de transduction suite à un signal initié par un RCPG. Cette voie implique deux seconds messagers, l'AMPc produite par l'adénylate cyclique (AC) et l'IP_3 généré par la PLCβ_2 (Figure 26d) (Lindermann, 1996 ; Herness et Gilbertson, 1999). Dans les cellules gustatives de rat, le sucrose induit un influx calcique alors que les édulcorants artificiels, saccharine et SC45647, augmentent le calcium intracellulaire à partir des réserves internes (Bernhardt *et al.*, 1996). L'AMPc généré dans les deux cas dépolarise les TRC via la phosphorylation de protéine Kinase A (PKA) et inhibe la conductance de K^+ *via* la fermeture des canaux potassiques basolatéraux. Il existerait une ségrégation cellulaire car les cellules réceptrices du goût activées par les saveurs sucrées n'ont aucune réponse suite à des stimuli amers (Bernhardt *et al.*, 1996).

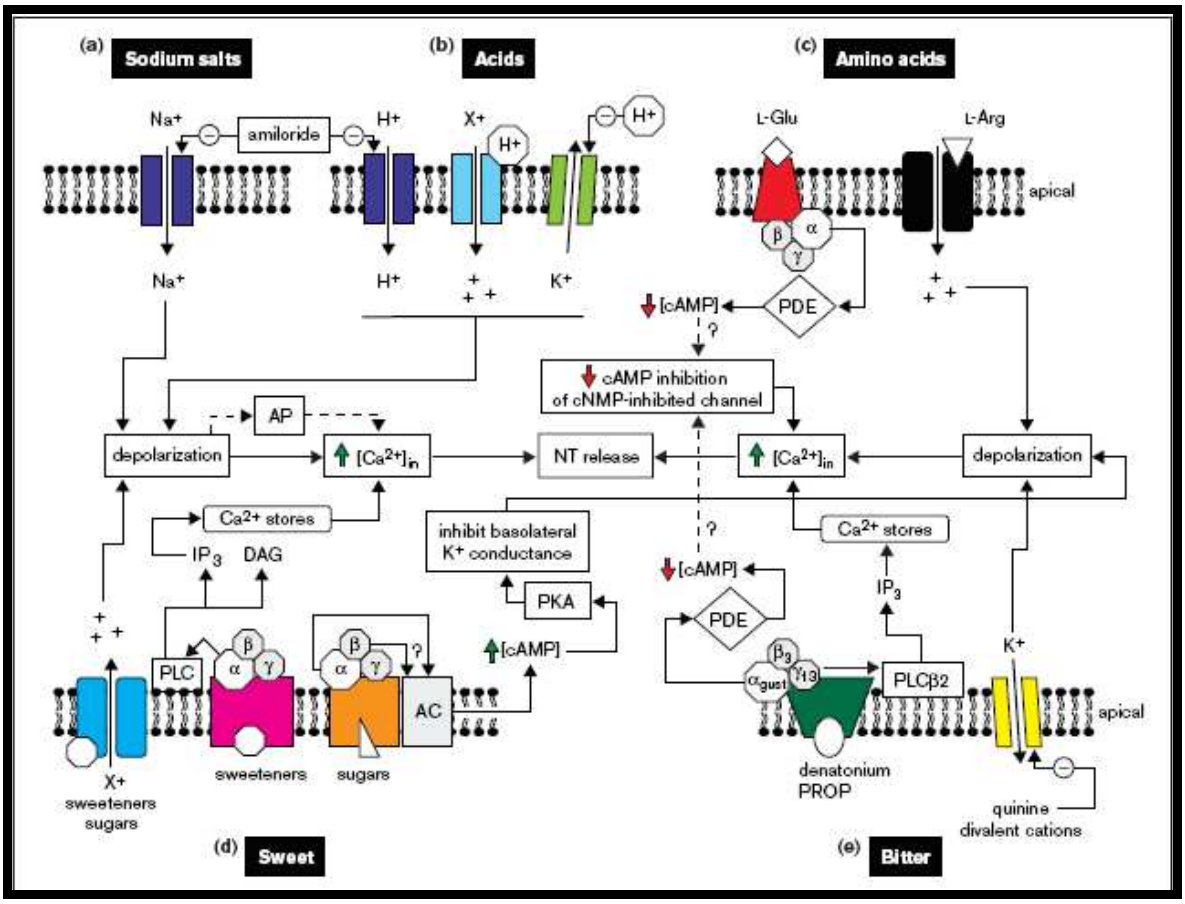

Figure26: Différents mécanismes de perception gustative proposés par Gilbertson *et al.* (2000).

3.3.2. L'amer

L'amer passe par des RCPG, en faisant intervenir respectivement la phosphodiestérase et la PLCβ2. Les composés amers tels que le dénatonium et le PROP activent des isoformes particuliers du TR/TRB qui induisent l'activation de la gustducine. L'activation de la sous-unité α de la gustducine stimule la phosphodiestérase et hydrolyse l'AMPc alors que les sous-unités βγ activent la PLCβ2 et la production de l'IP_3. Le calcium est ainsi libéré à partir du pool intracellulaire. D'autres composés amers tels que la quinine inhibe les canaux K+ apicaux dans certaines espèces (Figure 26e).

3.3.3. L'acide

Le goût acide est détecté par les canaux à protons. Les protons (H^+) perméabilisent les canaux ENaC, activent les canaux à cations H^+-dépendants, MDEG et inhibent les canaux K^+ apicaux.

3.3.4. Le salé

Le goût salé est contrôlé par les canaux ENaC sensibles à l'amiloride (Gilbertson *et al*., 2000). Les sels de sodium dépolarisent les TRC via l'influx de Na^+ à travers les canaux (Figure26a).

3.3.5. L'Umami

Le L-glutamate qui a un goût d'umami active le récepteur tmGluR4, un RCPG, qui diminue le niveau de l'AMPc par l'activation de la phosphodiestérase. Cette diminution de l'AMPc peut lever l'inhibition des canaux calciques, inhibés par NMPc. D'autres acides aminés tel que l'arginine (L-Arg) activent les récepteurs ionotropiques du glutamate et induisent la dépolarisation des TRC (Figure 26c).

3.4. Les comportements alimentaires liés à la perception gustative

L'activation des récepteurs du goût par la fixation des substrats (molécules sapides) entraine la transmission de l'information au cerveau via le noyau du tractus solitaire puis par la suite, des secrétions intestinales (Khan et Besnard ; 2009). Chez les rongeurs, il existe une attraction spontanée pour les aliments enrichis en lipides (Hamilton, 1964). Les souris, peuvent reconnaitre des acides gras alimentaires sans texture ni odeur (Saitou et *al.* ; 2009). La section du nerf gustatif chez la souris annule toute détection ou préférence (Stratford *et al*., 2006 **;** Gaillard *et al.*, 2008). Des comportements similaires existent chez l'homme (Mattes, 2009). En effet, chez les humains, lorsqu'on minimise l'olfaction en bouchant le nez, ou lorsqu'on

modifie la texture, les acides gras alimentaires possèdent toujours une saveur (Chale-Rush *et al.*, 2007). Cette saveur n'est similaire à aucune des cinq saveurs précédemment décrites mais est identifiable et succulente. La perception de cette saveur serait déterminante dans le comportement alimentaire des humains. Il a été constaté que les personnes obèses ont une préférence pour les aliments contenant une forte proportion d'acides gras, contrairement aux personnes dites minces (Drewnowski *et al.*, 1985 ; Mela *et al.*, 1988).

De nombreux travaux suggèrent l'existence d'une sixième modalité du goût dédiée à la perception des acides gras (Khan et Besnard, 2009). Il reste à étudier l'implication des cellules réceptrices du goût candidates à la perception d'un goût du gras.

4. La signalisation des cellules gustatives lipidiques: « le goût du gras »

La détection des acides gras par les cellules réceptrices du goût a été peu étudiée. Kawai et Fushiki (2003) ont proposé qu'une lipase linguale, FAT/CD36 libère les acides gras pour permettre leur détection par les cellules gustatives du goût. L'immuno-localisation de FAT/CD36 (*Fatty Acid Transporter/CD36*, figure 27) dans la partie apicale des cellules de papilles caliciformes de souris (Laugerette *et al.*, 2005) a permis de suggérer que les cellules de ces papilles seraient adéquates pour cette fonction. En effet, le FAT/CD36 possède une très forte affinité pour les acides gras à longue chaîne (Baillie *et al.*, 1996).

4.1. Les récepteurs impliqués dans la signalisation des cellules gustatives

Trois protéines membranaires seraient impliquées dans le transport des AGLC ; le Fatty Acid Binding Protein, FABP (40kDa), Fatty Acid Translocase (88 kDa, fortement glycosilé), homologue du CD36, et le Fatty Acid Transport Protein FATP (62 kDa).

4.1.1. Le FAT/CD36

La protéine CD36 appartient à la super-famille des récepteurs *scavenger*, la famille des récepteurs *scavanger* de la défense de l'hôte, et la classe SR-B. Le CD36 est formé de :

- 471 résidus d'acides aminés
- une région transmembranaire de 27 acides aminés (résidus 439 – 465) et une autre région transmembranaire potentielle à côté de l'extrémité N-terminale
- une partie cytoplasmique très réduite (résidus 466 – 471)
- une région extracellulaire de 438 acides aminés, contenant une région hydrophobe (résidus 184 – 204) qui s'associe probablement avec la membrane cellulaire externe.

CD36 est exprimé au dans les plaquettes (88 Kda / 113 Kda) les macrophages, les monocytes matures, les cellules endothéliales microvasculaires, les cellules endothéliales mammaliennes (80 – 90 KDa), et dans les cellules erythroidiennes en stade de développement (Greenwalt *et al*., 1994). Les autres appellations de CD36 sont GPIIIb, GPIV, OKM5-antigène (Ockenhouse *et al*. 1989 ; Leung *et al*., 1992). La protéine CD36 possède un site de fixation pour différents ligands tels que les acides gras, la thrombospondine-1, les LDL oxydés, les produits fortement glycosylés, les peptides de libération d'hormones de croissance, et une protéine membranaire exprimée dans les entérocytes infectés par le *P. falciparum* (Silverstein *et al.*, 2009) (Figure 27). Cette protéine est impliquée dans la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques, sert de molécule d'adhésion cellulaire dans l'agrégation et l'adhésion des plaquettes, intervient dans les interactions cellulaires entre plaquettes, monocytes et plaquettes, et entre cellules tumorales. Cette protéine joue aussi un rôle de cytoadhérence des enthérocytes infectées par *Plasmodium falciparum* (Endemann *et al.*,1993).

En ce qui concerne les modifications post-transcriptionelles de CD36, il existe deux formes alternatives de l'ARNm, une première qui n'a pas les résidus d'acides aminés 41 – 143 et une deuxième qui n'est pas encore traduite mais dans laquelle les derniers 89 résidus d'acides aminés sont enlevés. Quant aux modifications post traductionnelles, les 10 sites de glycosylation de la région extracellulaire permettent une glycosylation qui lui confère sa résistance au clivage protéolytique ; la thréonine 92 est phosphorylée et le CD36 est palmitoylé sur l'extrémité cytoplasmiques N- et C-terminale.

La structure du CD36 (Figure27) présente une glycoprotéine en forme d'épingle à cheveu. Elle possède une large poche extracellulaire localisée entre deux courtes queues cytoplasmiques (Abumrad *et al*.,, 1993).

Laugerette *et al.*, (2005) ont mis en évidence le rôle de CD36 dans la perception des lipides par les souris. En effet, l'inactivation du gène CD36 abolit la préférence spontanée pour les acides gras à longue chaine observée chez des souris normales (Laugerette *et al.*, 2005). Il semblerait que la protéine CD36 et la protéine α-gustducine, connue pour son implication dans la perception gustative, ne coopèrent pas dans la fonction de lipido-réceteur. Ces deux protéines ne sont pas systématiquement exprimées ensemble dans les récepteurs du goût (Laugerette *et al.*, 2005) et de plus, l'inactivation du gène de la protéine α-gustducine n'affecte aucunement le comportement des souris vis-à-vis des lipides.

Le CD36 affecte la phase céphalique de digestion induite par la fixation des acides gras. Cette phase pré digestive prépare l'appareil digestif à l'arrivée des acides gras. De fait, la sécrétion

de bile observée après activation du CD36 par des acides gras à longue chaîne est supprimée chez des souris CD36 KO (Laugerette *et al.*, 2005).

Tous ces résultats ont permis de confirmer que le CD36 lingual est impliqué dans la perception des lipides alimentaires chez les rongeurs, pour favoriser la consommation, la digestion et l'absorption des aliments riches en énergie.

Les esters d'AGLC sulfo-N-succinimidyl (Figure28) se lient de façon spécifique au FAT/CD36 et inhibent le transport des AGLC à travers la membrane. Dans les fractions membranaires d'adipocytes de rat, le SSO réduit de 65% l'entrée des AGLC (Tanaka et Kawamura, 1995).

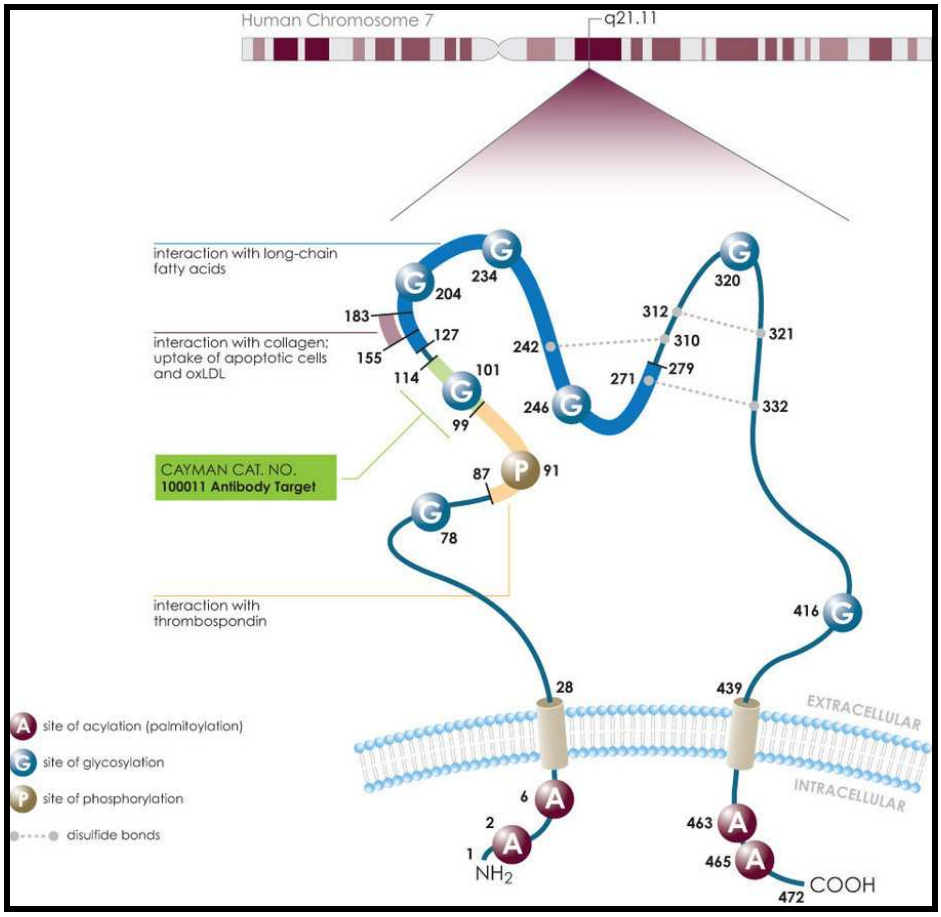

Figure27: Structure de FAT/CD36. Adapté de *Cayman Chemicals*.

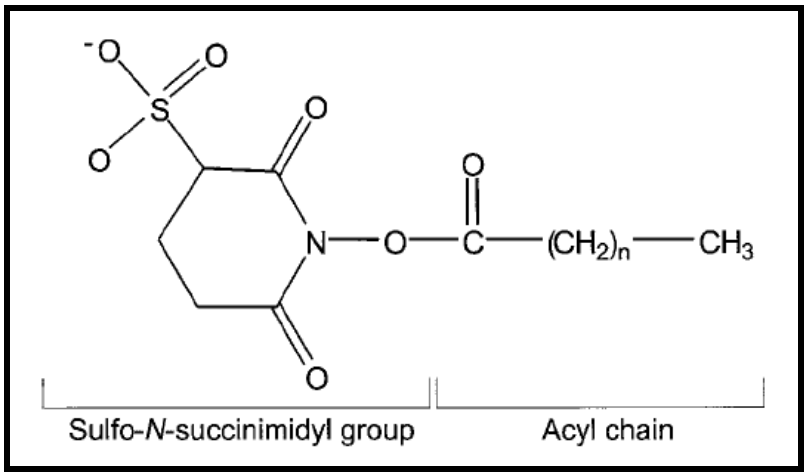

Figure 7: Structure des esters de sulfo-N-succinimidyl d'acide gras. La molécule est le produit d'un groupement sulfo-N-succinimidyl et d'une chaine acyle (myristate, palmitate ou oléate).

4.1.2. Les GPR

FredRiksson *et al.* (2003) ont identifié un récepteur orphelin de 120kDa couplé à la protéine G, GPR120. Le GPR120 fonctionne comme un récepteur des AGLC insaturés et est très exprimé dans l'intestin de souris et dans celui de l'homme (Hirasawa *et al*, 2005). Les réponses au nerf de la corde du tympan et au nerf glossopharyngien ont été émoussées chez des souris GPR120 KO (Cartoni *et al*., 2010). De nombreux acides gras sont des ligands de GPR40, un autre récepteur orphelin de 41 kDa couplé à la protéine G (Itoh *et al*., 2003). GPR40 a été localisé dans les papilles caliciformes et foliées. GPR40 est exprimé dans le pancréas et module la sécrétion d'insuline par le transport d'AG. GPR40 est aussi exprimé dans les cellules entéro-endocrines de l'intestin et module la stimulation de l'incrétine par les AG (Cartoni *et al*., 2010). Matsumura *et al*., (2007) ont montré l'expression de GPR 40/120 dans les papilles caliciformes de rat. Par contre, les ARNm correspondant ne sont pas détectés dans l'épithélium lingual non sensoriel. Il n'existe à ce jour aucun couplage mis en évidence entre CD36 et GPR. Dans les cellules STC-1, une lignée de cellules endocréniennes, les acides gras induisent via le GPR120 la mobilisation du calcium et la libération de GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*) (Hirasawa, 2005). GPR120 et CD36 emprunteraient des voies différentes pour favoriser la transcription de stimuli liés à la perception des acides gras. Le rôle de CD36 dans le mécanisme de transduction serait probablement de transférer les molécules d'acide gras au GPR120. Un transporteur serait requis pour transférer les molécules au récepteur à partir de la salive où il y aurait association grâce à des protéines de liaison. Il a déjà été démontré que CD36 est un co-récepteur ou un facilitateur de l'activation des récepteurs Toll-like TLR2 et TLR6 par le diacylglycéride (Hoebe, 2005) et que la SNMP, la protéine homologue de CD36 chez la drosophile, est essentielle pour la détection des

phéromones, qui sont eux aussi des acides gras (Benton, 2007). Dans les deux cas CD36 agit comme un transporteur du ligand vers le récepteur.

La transduction des AG pourrait faire intervenir les canaux DRK, ‘‘canaux potassiques retardés’’. Ils sont inhibés par les AGPI *in vitro* (Gilbertson *et al*.,, 1997). Ces canaux contribueraient à la perception du gout du gras, indépendamment de la signalisation des RCPG.

GPR120 et GPR40 ne sont pas associés à la gustducine car la réponse aux AG est normale chez les souris qui n’expriment pas l’α-gustducine (Martin *et al*., 2011). Les deux RCPG jouent un rôle dans le mécanisme de transduction du gras et sont largement exprimés dans les bourgeons du goût, notamment les type I pour GPR40 et type II pour GPR120. La sélectivité du goût serait déterminée par la co-expression de GPR40 ou GPR120 avec CD36 et une régulation en aval des DRK. Alternativement, il serait possible que toutes les cellules expriment GPR40 et GPR120 et l’activation se ferait par l’AG ou par des neuromédiateurs qui encodent le signal du gras.

4.2. L’activation des Protéines Tyrosines Kinases (PTK)

Dans les plaquettes humaines, l’activation du FAT/CD36 par la thrombine induit la phosphorylation de plusieurs protéines sur les résidus tyrosine. Les protéines tyrosines kinases (PTKs) responsables de ces événements de phosphorylation on été recherchées. Des PTKs reliées à Src (pp60SRC, pp60FYN, pp62YES, pp61HCK) et deux produits Lyn correspondant à 54 et 58 KDa ont été détectés dans ces plaquettes (Huang *et al*.1991). Il a été montré que le CD36, une glycoprotéine majeure des plaquettes, formait un complexe protéique avec les proteines Fyn, Yes et Lyn. Des associations similaires ont été observées dans les cellules melanomiales C32 et les cellules Hela. Les PTKs sont impliquées dans les couplages protéiques au niveau de la membrane plasmique en réponse à des stimuli. Ces résultats suggèrent que les interactions des récepteurs avec les ligands pourraient activer les voies de signalisations qui sont générées par la phosphorylation des tyrosines. Les Src sont activées par l’action d’une phosphatase, ou par le changement de conformation suite à une interaction avec une autre molécule.

4.3. La signalisation calcique

L’ion Ca^{2+} est l’élément chimique le plus abondant dans le corps humain (2 % du poids total). Il joue un rôle important dans la coagulation du sang, la contraction musculaire, le relarguage de neurotransmetteurs, la mobilité du cytosquelette. Les signaux calciques contrôlent une très grande variété des évènements cellulaires. Le calcium peut contrôler la croissance et la

différenciation cellulaire, ou induire l'apoptose. La concentration intracellulaire des ions calcium libres est généralement de l'ordre du nano molaire, mille fois inférieure à celle du milieu extracellulaire. Il existe deux possibilités d'augmentation du calcium intracellulaire ; la première possibilité estqu'il y ait un influx à partir du milieu extracellulaire via les canaux calciques de la membrane plasmique. Les ions Ca^{2+} se déplacent selon le gradient électro physiologique. La deuxième possibilité est une libération des réserves calciques intracellulaires, constituées par exemple par le réticulum endoplasmique, activé par l'IP_3. Les réserves sont limitées et doivent être reconstituées à partir de l'environnement externe. Le réapprovisionnement s'effectue par les canaux capacitatifs calciques (Montell, 1997).

4.3.1. Le déclenchement de la signalisation

Dans la majorité des cellules animales, le signal calcique commence par une mobilisation calcique des réserves intracellulaires suite à l'activation des canaux dédiés. Les activités tyrosine-kinase induites lors de l'activation des récepteurs produisent une phosphorylation de nombreuses protéines cellulaires, telle que la phospholipase C (PLC) (June *et al*., 1990). La PLC hydrolyse la phosphatidyl inositol 4,5diphosphate (PIP_2). Parmi les produits de cette hydrolyse, figurent l'IP_3, et le diacyl-glycéro (DAG). Le DAG est un activateur naturel de la PKC (Nishizuka, 1986). L'IP_3 se fixe sur les l'IP_3R situés sur la membrane du réticulum endoplasmique et induit la libération des réserves calciques intracellulaires (Berridge, 1984).

4.3.2. Le modèle capacitatif

Il s'agit d'un courant calcique activé par la déplétion du calcium interne. Ce mécanisme particulier fait suite à un influx de calcium appelé entrée de calcium capacitif. En électrophysiologie, le courant calcique qui en résulte est nommé I_{CRAC} (*Calcium Release-Activated Calcium current*). Plusieurs hypothèses scientifiques pourraient expliquer cette réentrée de calcium.

4.3.3. L'influx SOC

D'après Putney et McKay (1999), les canaux appelés SOC (*stored operated calcium channels*) ont une réponse exclusive, suite à la déplétion calcique, favorisant ainsi l'influx calcique. Les signaux permettant l'activation des canaux SOC sont encore inconnus, mais trois hypothèses tendent à expliquer cette activation.

4.3.3.1. Les hypothèses

La première hypothèse est celle du couplage conformationnel. Suite à un signal, le récepteur de l'IP_3 situé sur la membrane du réticulum endoplasmique, initierait une interaction directe avec les canaux SOC situé sur la membrane plasmique. Cette hypothèse serait confortée par l'existence d'une interaction entre les canaux TRPC1 et TRPC3 et l'IP_3R (Boulay *et al*., 1999 ; Rosado *et al*., 2002). Toutefois, l'hypothèse du couplage conrformationnel est remise en cause par le fait que les canaux TRP sont activés sans l'intervention de l'IP_3R (Jayaraman *et al*., 1995).

D'après l'hypothèse du messager diffusible, les canaux calciques fusionneraient avec la membrane plasmique pour activer l'influx SOC ; ce mécanisme n'a toutefois pas été identifié (Patterson et al. 1999 & Yao et al., 1999). D'après cette hypothèse, lorsqu'ils ne sont pas actifs, les canaux SOC ne seraient pas localisés au niveau de la membrane plasmique, et y seraient insérés, suite à une déplétion calcique par un mécanisme d'exocytose.

La troisième hypothèse, la plus probable (Figure29), est celle de l'existence d'un facteur, CIF (*calcium influx factor*). Il s'agit d'un composé de faible poids moléculaire purifié à partir de cellules T Jurkat stimulées. Le CIF libéré par le réticulum endoplasmique est de nature non protéique et phosphorylé (Randriamampita et Tsein, 1995). Le CIF pouvait activer la phospholipase A_2 Ca^{2+}-indépendante ($iPLA_2$) localisée proche de la membrane plasmique (Smani *et al*., 2004). Le clivage des phospholipides par $iPLA_2$ génère l'acide arachidonique et des lysophospholipides. Les lysophospholipides activeraient directement les canaux SOC.

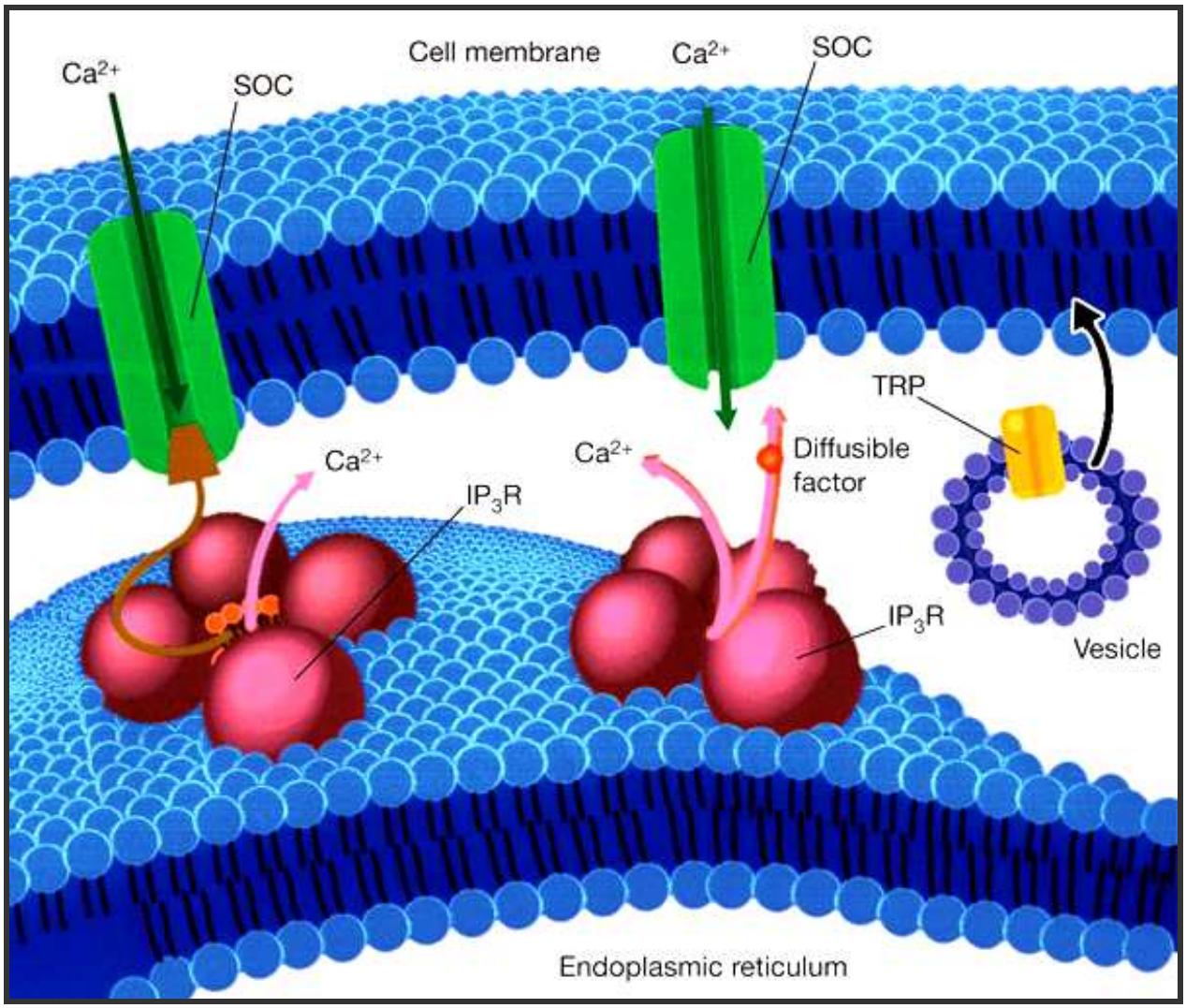

Figure29: Les trois théories de l'influx SOC.
La déplétion du Ca^{2+} dans les réserves du RE induit l'ouverture des canaux SOC. **1**, il existe un lien direct avec l 'IP$_3$R qui ouvre le canal SOC, c'est une analogie avec le lien qui existe entre les récepteurs de la ryanodine et les canaux Ca_v. **2**, la déplétion du Ca^{2+} induit la fusion des vésicules contenant SOCs avec la membrane plasmique. **3**, un second messager diffusible libéré, à partir du RE déplété de Ca^{2+}, active les SOC. D'après Clapham (2003).

4.3.3.2. Les canaux impliqués dans l'influx SOC

L'influx SOC, encore appelé CRAC (*Ca^{2+} Release Activated Ca^{2+})* a été identifié dans les mastocytes et les lymphocytes T (Hoth et Penner, 1992). Des courants CRAC ont depuis été identifiés dans de nombreux types cellulaires (Parekh et Penner, 1997). La nature moléculaire des canaux SOC a longtemps été difficile à identifier jusqu'à la découverte de STIM1 et ORAI1 (Feske *et al*., 2006).

ORAI1 (aussi appelé CRACM1, TMEM142a) appartient à une nouvelle famille de canaux ioniques. Les autres membres de cette famille sont ORAI2 (ou CRACM2, TMEM142b) et ORAI3 (CRACM3, TMEM142c). ORAI1 a été identifié dans les cellules S2 de drosophile (Feske *et al*., 2006). Chez l'homme, le gène d'ORAI1 est composé de deux exons et code

pour une protéine très conservée de 301 acides aminés des protéines, quatre domaines transmembranaires et les extrémités N- et C-terminales intracellulaires (Feske, 2010). D'un point de vue stoechiométrique, les canaux CRAC sont composés de quatre unités d'Orai1 (Ji *et al.*, 2008)). Une expression simultanée d'Orai1 avec STIM1 (Figure30) serait la cause de la naissance d'un courant I_{CRAC} (Peinelt *et al*., 2006). Quant à la contribution d'Orai2 et Orai3 dans l'infux SOC, en dépit de leur expression simultanée dans de nombreux tissus et organes (Feske *et al*., 2009), Orai2 serait incapable de restaurer l'influx SOC dans des cellules dépourvues d'Orai1, alors que Orai3 entraîne une partielle restauration (Gwack *et al*., 2007).

STIM1 (*stromal interaction molecule*) est essentiel pour l'influx SOC. STIM1 a été initialement identifié comme suppresseur de tumeur nommé GOK, exprimé dans le muscle squelettique, mais absent dans le rhabdomyosarcome où son expression induit la mort cellulaire (Sabioni *et al*., 1997, Parker *et al*., 1996). STIM1 et son analogue STIM2 sont des protéines transmembranaires phosphorylées contenant de multiples domaines protéiques (Manji *et al*., 2000).

STIM1 est une protéine transmembranaire à passage unique qui est principalement localisés dans la membrane du RE, bien qu'exprimé dans la membrane plasmique (Manji *et al*., 2000). Les domaines protéiques de STIM1 comprennent entre autres deux domaines nécessaires pour la détection du calcium et un motif SAM (*stérile alpha motif*) (Williams *et al*., 2001). Les dysfonctionnements dans le fonctionnement d'Orai1 provoquent le développement nombreuses pathologies comme la formation de thrombus (Braun *et al.*, 2009) et de métastases de cellules cancéreuses (Yang *et al*., 2009).

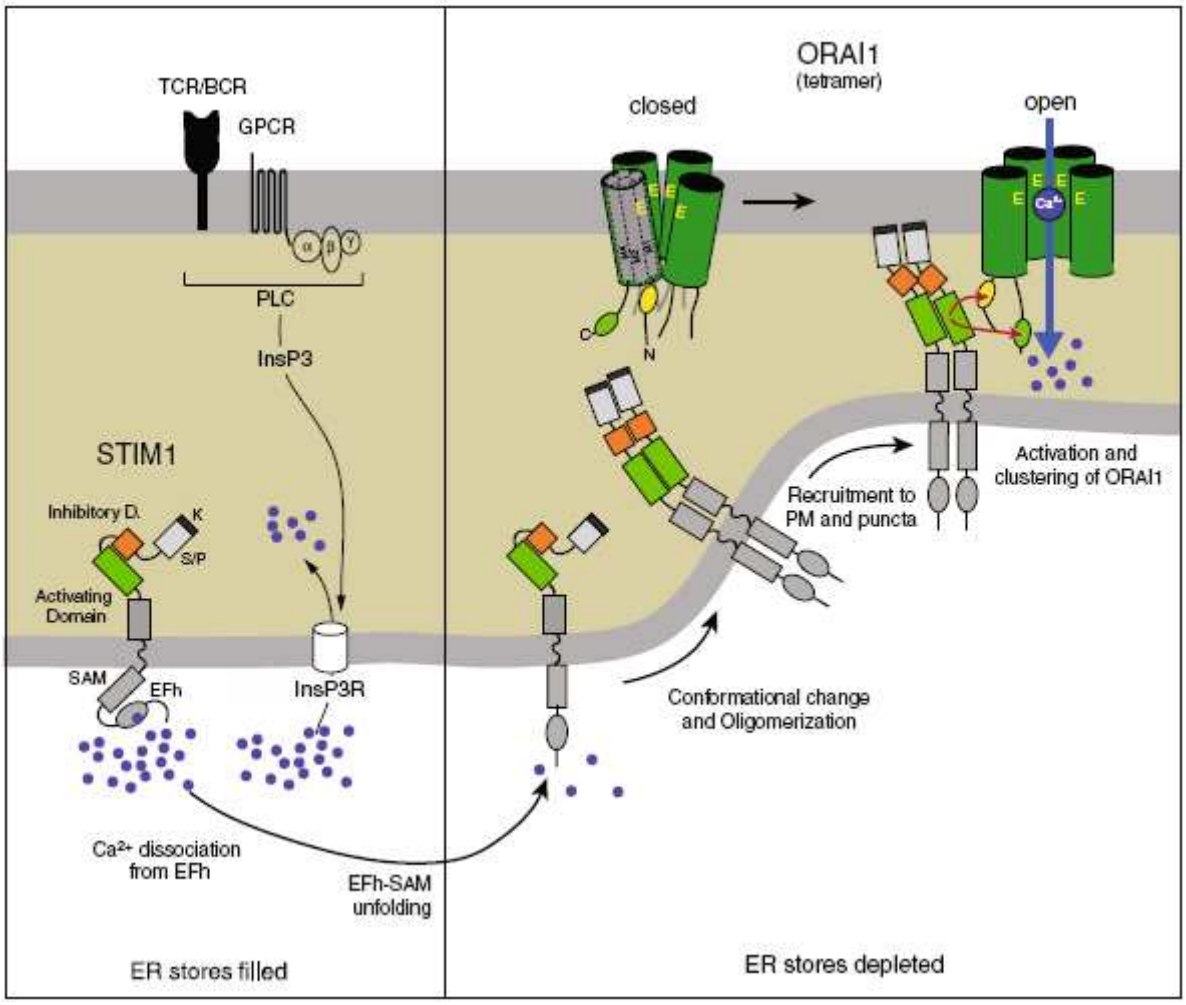

Figure30: Activation d'Orai1 par STIM1 lors de la déplétion calcique. Lorsque les cellules ont des réserves calciques élevées, STIM1 est localisé dans une configuration inactive dans la membrane du RE, non loin de la membrane plasmique et ORAI1 (à gauche). L'appauvrissement des réserves calciques déclenche la libération de calcium à partir du RE. STIM1 se lie directement à Orai1 suite à une libération minimale de calcium (activation des récepteurs à l'IP_3). D'après Feske S, (2010).

4.3.4. Le rôle des MAPK dans la signalisation des cellules gustatives

L'activation de CD36 active plusieurs voies de signalisation cellulaires. De nombreux travaux rapportent l'activation de la voie des MAPK suite à celle de CD36. Suite à l'activation de CD36, les p38 MAP Kinases sont activées dans les cellules endothéliales TSP-1, JNK 2 dans les macrophages via la src-PTK, FYN. Dans les plaquettes les LDL oxydés recrutent FYN et LYN pour induire la phosphorylation de MKK4 et JNK2 (Chen *et al*., 2008). Dans les macrophages de rats le sérum Amyloid A (SAA) active le CD 36 puis les 3 familles de MAP Kinases, principalement JNK. Dans les cellules HEK293, une lignée cellulaire transfectée avec un plasmide contenant CD 36, l'activation par SAA du CD36 induit 2 familles de MAP Kinases, les ERK1/2, et les JNK, ceci augmente l'expression de cytokines, l'IL8 (Baranova *et al*, 2010). Les SR-BI/CLA-1 présentss dans l'intestin, jouent un rôle dans le "sensing" des

micelles postprandiales. Leur activation induit l'activation de 5 protéines Kinases: pAK1/2/3, MEK1, p38a, ERK1/2, et PKA, dont des MAP Kinases. Ces protéines kinases vont induire la sécrétion de triglycérides riches en lipides (Béaslas *et al*., 2009). Récemment, une étude sur des cellules CHO (*chinese hamster ovary*) a montré que la libération d'acide arachidonique est régulée par des PLA_2 activés par la phosphorylation des ERK1/2. (Kuda *et al*., 2011).

En ce qui concerne les papilles gustatives, on sait que les EGF régulent la croissance des papilles gustatives grace aux récepteurs EGFR. Les EGFR sont activés par MERK/ERK, p38 Kinases, et PI3K/Akt. De même, dans les cellules neuronales, les récepteurs AMPA de la région pré synaptique activent les MAP Kinases par l'intermédiaire des src PTK (Schenk *et al,* 2005). Les caractéristiques neuronales des cellules gustatives laissent penser qu'un tel sytème serait impliqué dans leur signalisation.

L'activation des cellules PC12 par la pardaxine induit l'activation de MEK-ERK de manière calcium dépendante et la libération de Dopamine (Bloch-shilderman *et al.*, 2001). Tous ces résultats laissent envisager une implication de la voie des MAPK dans la signalisation des cellules gustatives. A nos jours aucun travail formel n'a été effectué.

4.3.5. La transmission de l'information gustative au cerveau

4.3.5.1. La libération de neuromédiateurs

Dans une cellule réceptrice sensorielle, le stimulus gustatif provoque une modification du potentiel membranaire, c'est la transduction. La transduction d'un signal gustatif implique plusieurs processus différents, mais une voie finale commune. En effet, l'interaction entre la molécule sapide et son récepteur entraîne une dépolarisation de la membrane cellulaire conduisant à une augmentation intracellulaire du calcium. L'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaire entraîne la libération de neurotransmetteurs vers les voies afférentes des fibres nerveuses gustatives.

4.3.5.1.1. Les cathécolamines

Les catécholamines sont des produits organiques de la tyrosine. Elles peuvent jouer un rôle hormonal ou de neurotransmetteur. L'adrénaline (épinéphrine), la noradrénaline (norépinéphrine) et la dopamine sont les catécholamines les plus courants. La structure des catécholamines est basée sur un noyau portant en position initiale une chaîne latérale éthylamine parfois substituée. Le noyau catéchol est caractérisé par la présence de deux groupements hydroxyles adjacents sur un noyau benzénique en position 3 et 4. Les cellules de la médullo-surrénale et les neurones post-ganglionaires du système nerveux orthosympathique

sont responsables de la synthèse des cathécolamines. Le composé le plus simple de la famille des catécholamines est la dopamine. Elle est constituée d'un noyau catéchol et d'une chaîne latérale éthylamine. L'adrénaline est à la fois un neurotransmetteur du système nerveux central et une hormone de la circulation sanguine. La noradrénaline également présente dans le sang, est quant à elle, un neurotransmetteur du système nerveux sympathique périphérique. Le nom de la noradrénaline est dérivé de l'adrénaline, le préfixe *nor*-, qui signifie non radical, indique l'absence de radical méthyle (Figure31).

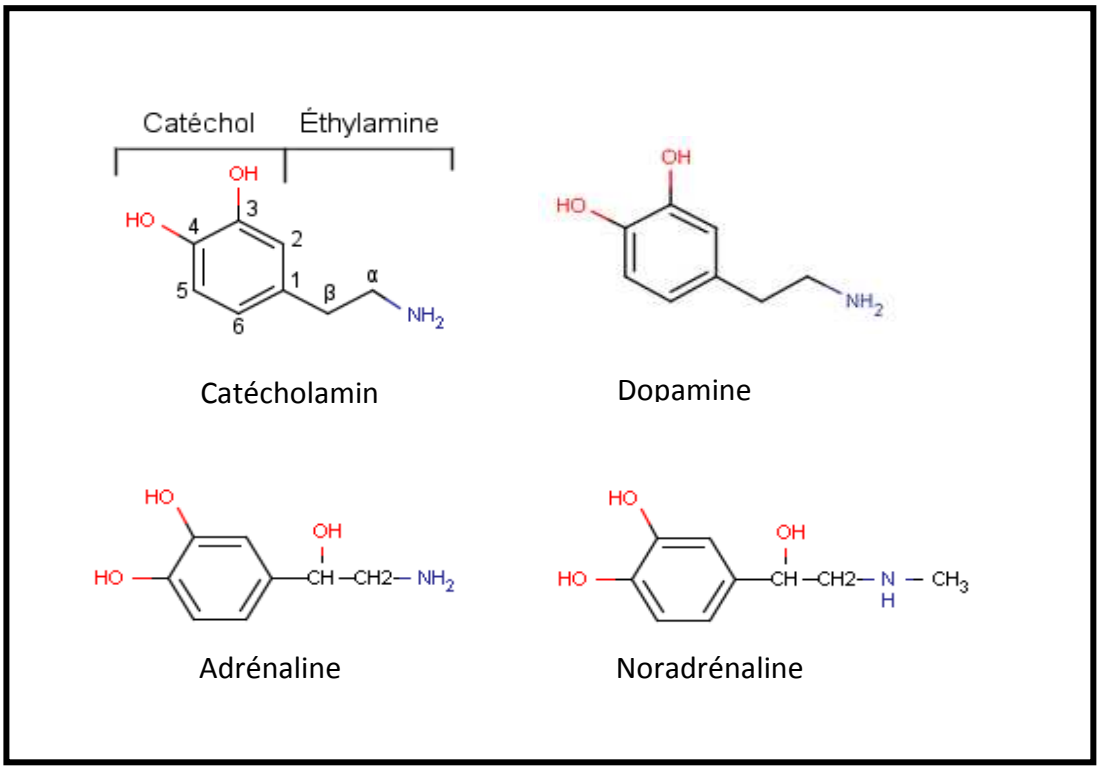

Figure31: Structure chimique des différentes catécholamines

4.6.5.1.2. La sérotonine

En 1935, V. Erspamer a montré l'existence d'une substance extraite de l'intestin capable de contracter les muscles lisses. Cette substance fut appelée entéramine. Le nom de sérotonine, dérivé de séro (serum) et tonin (tonus), a été donné par M.M.Rapport et ses collaborateurs en 1947 après avoir suggéré l'existence d'une telle molécule dans le sérum. Par la suite, cette molécule a été dentifiée comme étant la 5-hydroxytryptamine (5-HT). En 1953, Twarog et Page ont démontré que cette amine biogène joue aussi le rôle de neurotransmetteur dans le cerveau des mammifères.

La sérotonine ou 5-hudroxytryptamine (5-HT) stimule les fibres sensorielles afférentes gustatives quand elle est injectée à l'intérieur de la langue à côté des bourgeons du goût (Esakov *et al*., 1983), la 5-HT pourrait être le neurotransmetteur des bourgeons du goût

(Nagai *et al*., 1996). La sérotonine est présente dans une sous population des cellules de goût chez plusieurs espèces (Kim and Roper, 1995). Chez les mammifères, les cellules du goût qui ont une synapse avec les fibres nerveuses sont sérotonergiques. Les récepteurs de la 5-HT sont localisés dans les cellules du goût (Kaya *et al*., 2004). Les cellules du goût libèrent la sérotonine chez les amphibiens lorsqu'elle sont dépolarisées (Nagai *et al.*, 1998). L'utilisation de cellules bio-détectrices a montré que la sérotonine est secrétée par les bourgeons du goût et que la stimulation du goût provoque la libération de la sérotonine (Huang *et al*., 2005).

4.3.5.2. Transformation de l'information gustative

Le stimulus chimique entrant en contact avec les récepteurs gustatifs induit la libération de neurotransmetteurs qui conduisent à l'excitation de fibres nerveuses afférentes en générant des potentiels d'action. Les fibres nerveuses ont des ramifications dans plusieurs papilles parfois plusieurs dans une même papille (Miller, 1971). Les bourgeons du goût sont innervés par le nerf VII, le nerf IX et le nerf X (Figure32).

Les nerfs innervant les bourgeons du goût produisent des facteurs de croissance nécessaires pour leur survie (Guth, 1957 ; Ganchrow et Ganchrow, 1989). Lorsque les nerfs gustatifs sont sectionnés, les bourgeons du goût dégénèrent. Les nerfs peuvent cependant se régénérer puis ré innerver les papilles, ce qui contribue à la formation des bourgeons du gout (Cheal et Okley, 1977). Chez le rat, la capacité à différencier le salé de l'acide est altérée par une section de la corde du tympan, alors que celle du glossopharyngien n'a pas d'effet sur cette discrimination (Spector et Grill, 1992). Le glossopharyngien contribue plutôt à détecter le goût acide et les composés pouvant être toxiques pour l'organisme (Spector et St John, 1998).

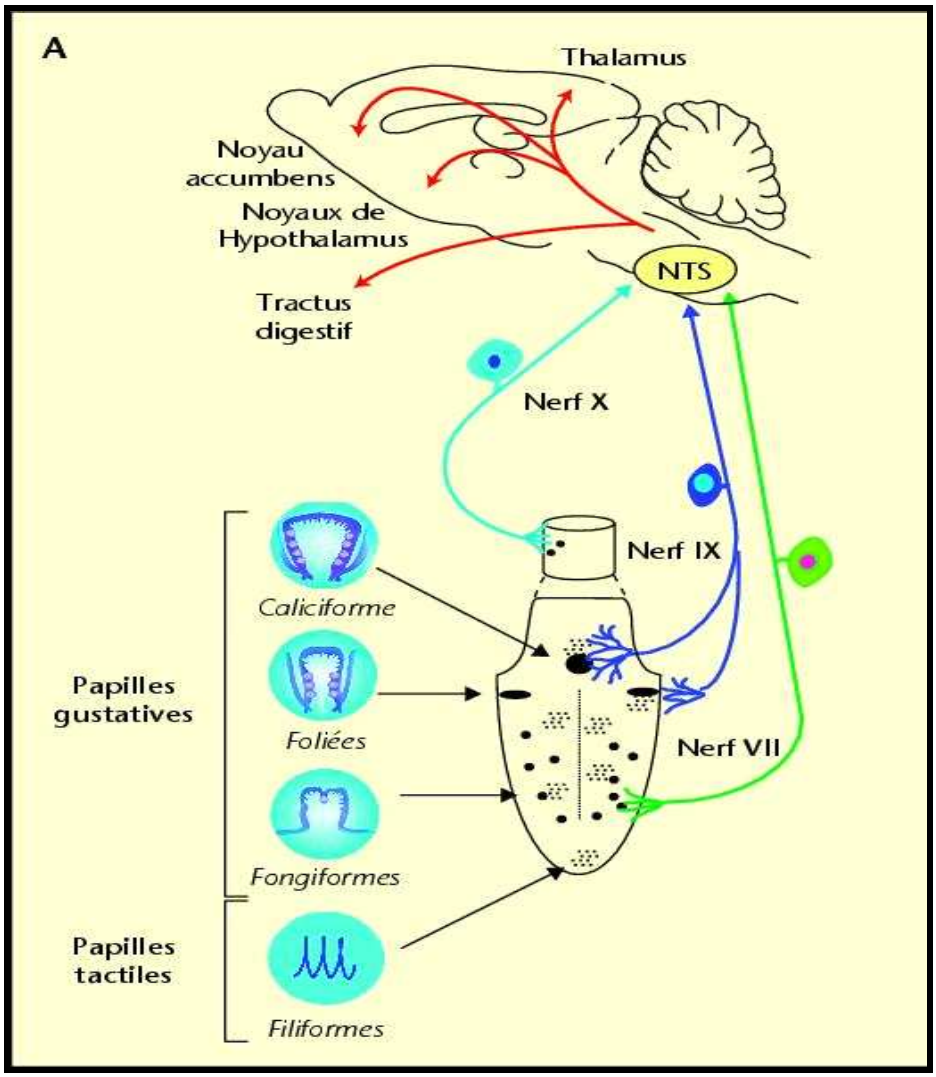

Figure32: Innervation de la langue par les nerfs X, IX et VII.

Les branches gustatives sont, 1, le grand petrosal supérieur (GSP) (branche du nerf VII), qui innerve le palais ; 2, le glossopharyngien (branche linguale du nerf IX) qui innerve la partie postérieure de la langue (papille caliciforme et foliées) ; 3, la corde du tympan (branche linguale du nerf VII), innervant la partie antérieure de la langue, donc les papilles fongiformes, ainsi que certaines papilles foliées. Ses fibres empruntent le trajet du nerf trijumeau, puis ces neurones quittent le nerf lingual pour former la corde du tympan ; 4, Le nerf vague (branche supérieure laryngée du nerf X) qui innerve les bourgeons du gout autres que ceux présents sur la langue à savoir le larynx, le pharynx et l'œsophage. D'après Gaillard *et al*. (2008).

5. Conclusion

La signalisation des cellules gustatives lipidique se résume comme suit : l'interaction d'un acide gras à longue chaîne (acide linoléique) avec le CD36 augmente la concentration du calcium libre intracellulaire. Cette augmentation de calcium intracellulaire est due à une mobilisation de calcium à partir de la réserve du réticulum endoplasmique (RE) par l'activation des récepteurs de l'inositol triphosphate situés sur la membrane du RE. L'augmentation de calcium intracellulaire est suivie par un efflux calcique. La déplétion des

réserves calciques active un senseur calcique, STIM1, qui libère un facteur, le CIF et réalise un couplage avec les canaux calciques Orai1. Il s'en suit un influx calcique via l'ouverture de canaux dits SOC (composés d'Orai1). Ces canaux sont ouverts seulement lorsque les réserves calciques intracellulaires diminuent par un efflux calcique vers le milieu extracellulaire lors de l'activation cellulaire via un récepteur couplé à la phospholipase C. Cette augmentation de calcium intracellulaire induite par l'interaction entre LA et le CD36 est responsable de la libération de la sérotonine et de la noradrénaline par les cellules gustatives lipidiques et l'activation des nerfs afférents impliqués dans la perception du goût du gras.

DEUXIEME PARTIE : LES CONTRIBUTIONS PERSONNELLES

1. Introduction:

Nous nous sommes interessé à l'étude du goût du gras depuis le mois de Février 2008. Cette thématique a été abordée au cours de notre Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) avant de déboucher sur la préparation d'un doctorat.

Ainsi, après une familiarisation avec l'expérimentation animale, nous avons appris à purifier les cellules de papilles gustatives exprimant la protéine CD36. Il a d'abord été question de caractériser ces cellules. En effet, bien que ce sujet ait fait l'objet d'une Thèse de Doctorat soutenue en 2008 dans l'équipe « Lipides et Signalisation cellulaires » de Dijon, il était nécessaire de mieux identifier à nouveau ces cellules pour envisager de nouvelles pistes. Nous avons recherché l'expression des phospholipases A_2 dans notre modèle cellulaire, puis nous avons étudié leur activité. Il a ensuite été question de mieux comprendre le mécanisme calcique. En effet, il était préalablement envisagé que seuls les canaux TRPM5 seraient impliqués dans la signalisation calcique de ces cellules. Nous avons recherché l'expression de divers canaux calciques dans le modèle cellulaire et montré que leur action était liée à un « senseur » calcique.

Au cours de ce travail, l'analyse statistique des données a été faite à l'aide du logiciel Statistica (version 4.1, Statsoft, Paris, France). Les données sont présentées en moyenne ± SEM. L'importance des différences entre les valeurs moyennes a été déterminée par analyse de variance à sens unique, suivie d'un test de différence significative (LSD). Pour tous les tests, le niveau de signification choisi était de $p < 0,05$.

Tous les protocoles d'étude sur des souris ont été menés selon la déclaration d'Helsinki et des directives éthiques européennes. Les protocoles ont été approuvés par le Comité Régional d'Ethique.

Nos travaux nous ont conduit à de nombreux résultats qui pour la plupart ont fait l'objet de diverses communications orales dont l'une a été sanctionnée par un prix de la Société francaise de Physiologie et de Publications dans deux Revues internationales fortement côtées (*Impact factor* 4,5 et 15).

2. Travaux publiés:

2.1. Mécanismes de signalisation cellulaire de la perception gustative des lipides: Les cellules gustatives peuvent-elles être la cible d'agents anti-obésité?

[Current Medicinal Chemistry, 2011, 18, 3417-3422 *IF=4,5*]

Dans cet article, nous avons tenté de mettre en évidence les récentes avancées sur les mécanismes de signalisation cellulaire et avons relevé l'importance des protéines CD36 et GPR120 dans les maladies dites de pléthore. Les mécanismes mis en jeu sont détaillés par les travaux de la deuxième publication.

2.1.1. Le rôle de CD36 dans la perception gustative lipidique

La protéine de liaison des lipides, CD36, a été détectée dans les papilles caliciformes de l'épithélium lingual chez les rats et les souris (Kawa et Fushiki, 2003). La structure de CD36 est très intéressante car cette glycoprotéine présente une structure en épingle à cheveux avec une grande poche hydrophobe extracellulaire située entre deux courtes queues cytoplasmiques (Abumrad *et al*., 1993 ; Greenwalt *et al*., 1992) ce qui justifie son rôle en tant que capteur de lipides par voie orale. C'est une équipe de l'Université de Bourgogne qui a fourni la première preuve que les cellules gustatives CD36-positives jouent un rôle important dans la perception des lipides alimentaires chez la souris. En effet, l'inactivation du gène de CD36 abolit entièrement la préférence spontanée pour les acides gras longue chaîne (AGLC), observée dans les souris sauvages (Laugerette *et al*., 2005). Il est remarquable que cet effet sur le comportement alimentaire soit spécifique aux lipides puisque la préférence des aliments sucrés et l'aversion pour les aliments amères ne sont pas affectées chez ces souris transgéniques (Laugerette *et al*., 2005).

Il semblerait que CD36 et la protéine α-gustducine ne coopèrent pas, et que ces deux protéines ne soient pas systématiquement co-exprimées sur les cellules réceptrices du goût (Laugerette *et al*., 2005). En outre, l'invalidation du gène de l'α-gustducine n'affecte la préférence des aliments contenant de la graisse chez la souris (Sclafani *et al*. 2007) Le CD36 affecte la prédigestion induite parl'induction de signaux vers le système nerveux central. En effet, la production de sécrétion biliaire et de protéines pancréatique, après l'ingestion d'AGLC, a été significativement réduite chez les souris CD36-KO (Laugerette *et al*., 2005). En résumé, le CD26 lingual participe bel et bien à la perception des lipides alimentaires chez les rongeurs favorisant à la fois la consommation et la digestion / absorption de l'énergie des aliments riches en acides gras.

2.1.2. La signalisation via CD36

L'ingestion d'aliments gras dans les cellules gustatives plusieurs mécanismes de signalisation. L'un des premiers événements de la signalisation cellulaire est l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire libre, $[Ca^{2+}]$ i. Nous avions préalablement montré que

l'acide linoléique, un AGLC, induit une augmentation rapide de la [Ca^{2+}] i dans les cellules CD36-positives, purifiée à partir de cellules de papilles caliciformes de souris (Gaillard *et al*., 2008). Nous avons par ailleurs observé que l'activation de CD36 par l'AGLC, provoque un recrutement des réserves de calcium du réticulum endoplasmique via l'activation d'une phospholipase-C (PLC), comme en témoigne la production de l'inositol-tri-phosphate (Figure33). Cet effet est spécifique puisque les AGLC n'ont pas induit cette augmentation de [Ca^{2+}]i dans les cellules CD36-négatives (Gaillard *et al*., 2008). Nous avons aussi observé que l'AGLC a aussi induit la phosphorylation de Src-PTK en particulier de Fyn59 et Yes62. En outre, nous avons observé dans les cellules CD36-positives l'activation des canaux (SOC), suivant un modèle capacitif de l'homéostasie calcique (Figure33).

L'augmentation de [Ca^{2+}]i est impliquée dans la libération de neurotransmetteurs par les cellules gustatives (Roper, 2006). Plusieurs neurotransmetteurs ont été proposés, l'acétylcholine, la noradrénaline (NA), la sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT), les acides aminés (glutamate et de GABA), et des peptides (substance P et de la calcitonine gene-related peptide). Parmi ces candidats, la 5-HT se pose comme le neurotransmetteur majeur des bourgeons du goût (Roper, 2006). Nous avons observé dans les cellules gustatives lipidiques CD36-positives, que les AGLC induisent à la fois la libération de neurotransmetteurs et de dépolarisation de la membrane plasmatique (El Yassimi *et al*., 2008 ; Khan *et al*., 2008 ; Khan et Besnard, 2009). Les mécanismes exacts de la dépolarisation ne sont pas connus. Toutefois, le canaux TRPM5 (*transient receptor potential melastatin-5)* peuvent être impliqués dans la dépolarisation de la membrane plasmique induite par les AGLC. Liu et Liman (Liu et Liman, 2003) ont montré que l'augmentation initiale de [Ca^{2+}]i active les canaux TRPM5, en favorisant ainsi l'influx de Na^+ responsable de la dépolarisation de la cellule. Récemment, Sclafani *et al*. (2007), ont rapporté que l'invalidation du gène de TRPM5 abolit la préférence pour les matières grasses chez des souris

Bien que TRPM5 soit un canal activé par le calcium, une régulation directe par l'acide arachidonique (AA) a été signalée dans les cellules gustatives de souris (Oike *et al*., 2006, b). Par ailleurs, les cellules TRPM5 positives expriment aussi la lipase monoglycéride et la phospholipase A_2-IIA (PLA_2-IIA), responsable de la libération des acides gras libres (principalement AA) à partir des phospholipides membranaires (Oike *et al*., 2006, b). Grâce aux techniques de RT-qPCR et de microscopie confocale, nous avons observé que les cellules gustatives lipidiques CD36-positives expriment les différents sous-types de $sPLA_2$, $iPLA_2$, et $cPLA_2$ (résultats publiés dans la deuxième publication). Ces différentes isoformes de PLA_2 semblent être impliquées dans la régulation de l'homéostasie du calcium dans ces cellules.

Nous n'avons pas déterminé à quel type I, II ou II de cellules gustatives appartiennent les cellules CD36-positives. De même il reste à étudier l'établissement de contact synaptique avec le système nerveux.

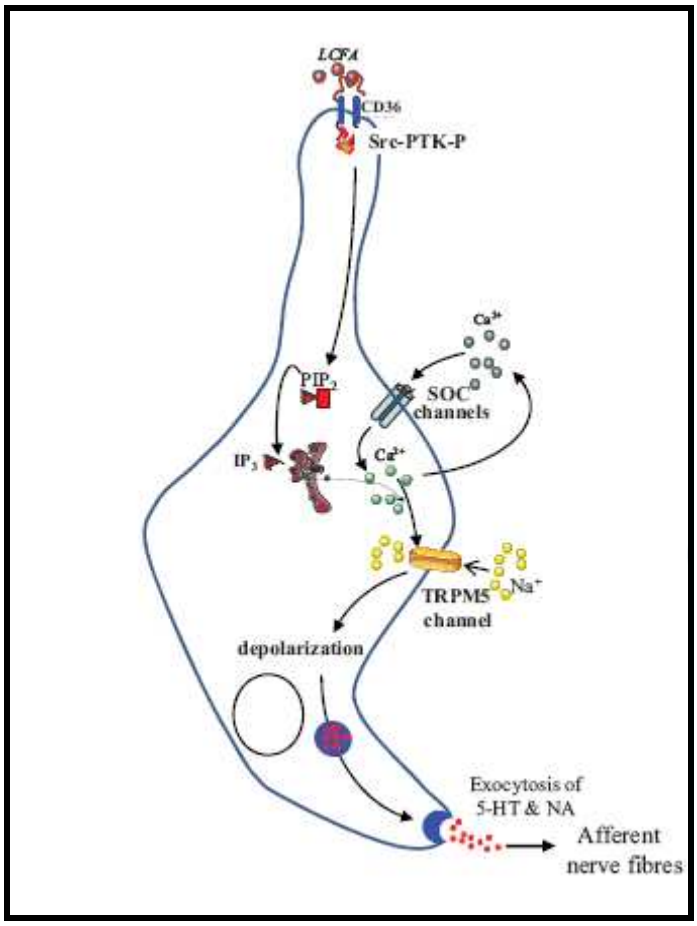

Figure33: Mécanismes de signalisation de la cellule gustative lipidique

2.1.3. Rôle de GPCR dans la perception lipidique

Les récepteurs couplés à la protéine G (RCPG) sont des protéines membranaires intégrales avec sept hélices transmembranaires. La super-famille des RCPG est parmi les plus grandes familles et la plus diversifiée de protéines chez les mammifères (Lander *et al*., 2001 ; Venter *et al*., 2001). Les fonctions des GPCR sont très variables, car ils jouent un rôle important dans la physiologie de tous les principaux systèmes d'organes périphériques et aussi dans le cerveau des vertébrés supérieurs. Les RCPG sont localisés sur la surface cellulaire et sont responsables de la traduction d'un signal endogène dans une réponse intracellulaire par les protéines G hétérotrimériques qui ciblent d'autres protéines, souvent des enzymes qui influencent le niveau de messagers intracellulaires (Fredriksson *et al*., 2003). Il existerait sept membres de la superfamille des récepteurs GPCR humains, GPR100, GPR119, GPR120, GPR135, GPR136, GPR141, et GPR142 (Fredriksson *et al*., 2003). Hirasawa et *al*. (2005) et

Oh et *al*. (2010) ont montré que GPR120 agit comme un récepteur pour les acides gras polyinsaturés (AGPI). GPR120 participe à la sécrétion d'acides gras induite par du glucagon-like peptide-1 (Hirasawa et *al*. 2005) et la cholécystokinine (CCK) dans des cellules SC-1 (Tanaka *et al*., 2008). GPR40 a été signalé comme étant un récepteur d'acides gras à chaîne longue et moyenne (Tanaka *et al*., 2008). Les papilles caliciformes et fongiformes expriment l'ARNm de GPR120, mais pas de GPR40, dans la langue de rat (Matsumura *et al*., 2007) Par contre, Cartoni et al. (2010) ont récemment démontré chez la souris l'expression de GPR40 dans les papilles caliciformes. On ignore pourquoi il y a cette différence. Toutefois, elle pourrait être due aux différences entre les espèces. GPR120 et GPR40 sont respectivement exprimés dans les cellules gustatives de type I et de type II (Cartoni *et al*. 2010). Ces chercheurs ont aussi mené des expériences sur des souris knock-out et ont observé que les animaux GPR40 KO ont eu une préférence moindre pour l'acide linoléique et l'acide oléique et les GPR120 KO pour l'acide linoléique. Ils ont montré que les réponses du nerf glossopharyngie), qui innerve le dos de la langue, chez les souris KO GPR40 et GPR120 KO à l'acide oléique, l'acide linoléique, acide linolénique et étaient plus faibles que celles des souris témoins. GPR40 ou GPR120 doivent avoir un rôle important dans la capacité des souris à détecter les acides gras.

2.1.4. La signalisation via GPCR

Les GPCR activent les protéines G hétérotrimériques, comme le G_{as}, G_{ai}, et G_{aq}. Les ligands se lient spécifiquement aux RCPG pour stimuler et induire plusieurs types de réponses cellulaires via différentes voies de seconds messagers, telles que, celles de l'AMPc, la PLC, via des canaux ioniques, et les MAPK (Schulte et Fredholm, 2003). Les mécanismes de signalisation cellulaire de GPR120 et GPR40 n'ont pas encore été élucidés. Il reste aussi à les caractériser dans les cellules réceptrices du goût. Cependant, on peut citer quelques études qui ont abordé la signalisation par l'intermédiaire GPR120/40 dans différents types de cellules.

Hirasawa *et al*. (2005) a montré que la stimulation de GPR120 par les acides gras libres, conduit à l'élévation du calcium intracellulaire et l'activation de la cascade des MAPK, notamment ERK. Oh et al. (2010) ont rapporté que GPR120 fonctionne comme un capteur d'acides gras *n*-3 et sa stimulation inhibe les deux réponses inflammatoires de TLR4-et le TNF-α. TNF-α et TLR2/3 peuvent également stimuler TAK1, en activant IKKβ et JNK (Takaesu *et al.*, 2003) Les β-arrestines peuvent servir d'échafaudage ou de protéines adaptatrices pour une large gamme de RCPG (Miller *et al.*, 2001)La région C-terminale de GPR120 contient plusieurs (S/T)X4-5(S/T) caractéristiques des β-arrestines (Cen *et al.*,

2001)Après la liaison du ligand, les β-arrestines peuvent s'associer avec les domaines cytoplasmiques de GPCR et se coupler au récepteur en l'aval des voies de signalisation spécifiques (Luttrell *et al.*, 2002)

Les autres candidats pour les récepteurs du goût de graisse sont les canaux DRK (*delayed rectifying potassium channels*), qui sont inhibés par des acides gras polyinsaturés in vitro (Gilbertson *et al.*, 1997)Ces canaux peuvent contribuer à la réponse du goût du gras, soit de façon indépendante des GPCR ou en faisant intervenir en partie la cascade de transduction initiée par l'activation de GPR40 ou GPR120 (Cartoni *et al.*, 2010). Dans les cellules du pancréas, l'acide linoléique réduit le courant potassique voltage dépendant via GPR40 (Feng *et al*., 2006). Les voies de signalisation en aval de GPR40 et GPR120 restent à être déterminées. GPR120 et GPR40 sont peu susceptibles de se coupler à la gustducin car les souris α-gustducin knock-out ont une réaction normale à à l'huile de soja (Oike *et al*., 2006, a)

2.1.5. Y-t-il un lien entre CD36 et GPCR ?

Nous avons mentionné ci-dessus que les protéines CD36 et les RCPG sont les candidats potentiels de la perception du goût des lipides. Savoir comment deux protéines réceptrices pourraient être impliquées dans une tâche identique rete une énigme. GPR120/40 et CD36 coopérèrent-ils dans le mécanisme de signalisation cellulaire ? Il est fort probable que le CD36 agisse comme un co-récepteur de GPR120/40. Un transporteur peut être nécessaire pour la translocation des acides gras sur le récepteur ou ils peuvent être associés à des protéines de liaison ou des micelles de formation, puisque la plupart des concentrations d'acides gras qui ont été utilisés jusque-là sont au-dessus de leur concentration micellaire critique. Il a été démontré chez la souris que CD36 est un corécepteur de l'activation des récepteurs toll-like 2 et 6 par le diacylglyceride (Hoebe *et al*., 2005) En outre, le SNMP, un homologue de CD36 chez la drosophile, est essentiel pour la détection des phéromones (Benton *et al*., 2007). Dans les deux cas, CD36 agit par transport du ligand au récepteur. Il est aussi possible que CD36 peut servir de site de liaison qui facilite le blocage des canaux DRK (Gilbertson *et al*., 1998).

2.1.6. Les antagonistes de GPR120 et de CD36 peuvent-ils avoir une action anti-obésitaire ?

À l'avenir, il serait possible de synthétiser des antagonistes sélectifs des récepteurs du goût des lipides afin de diminuer la sensibilité du goût du gras chez des sujets normaux ou obèses. Dans le passé, les dérivés sulfo-N-succinimidyle d'acides gras à longue chaîne, comme

l'acide oléique et l'acide myristique, ont été synthétisés (Harmon *et al*., 1991). Par conséquent, le SSO (sulfo-N-succinimidyle oléate) qui se lie spécifiquement à CD36, a été révélée comme étant un inhibiteur de la signalisation de CD36. Récemment, Sun *et al*. (2010) ont synthétisé plusieurs antagonistes et agonistes de GPR120 sur la base de relations structure-activité, mais leur potentiel en tant que agents anti-obésité est inconnue. La meilleure approche serait de faire la synthèse des agents qui présentent non seulement une haute spécificité pour la liaison au récepteur, mais possèdent également une valeur intrinsèque du "goût des lipides". On peut citer un exemple de molécules qui ne possèdent aucune valeur calorique comme l'aspartame ou l'alitame qui présentent, respectivement, un pouvoir sucrant de 200 et 2000 fois plus élevé que le glucose et, par conséquent, peuvent être prises pour éviter la consommation d'édulcorants classiques qui sont très caloriques. Nous ne savons toujours pas si les personnes qui préfèrent les aliments de type «*fast food*» ont une surexpression de CD36 ou de GPR120/40 dans leurs papilles. Si c'est le cas, les antagonistes de ces récepteurs vont certainement aider à moduler le comportement alimentaire humain. Certains résultats (Sun *et al.*, 2010) suggèrent que l'expression de CD36 dans les papilles caliciformes de rats obèses peut être associée à une diminution de la sensibilité gustative du gras. Les patients obèses ont une plus grande préférence pour les aliments gras que celle qui ont un indice de masse corporel faible (Drewnowski, 1985). Mela et Sacchetti (1991) ont montré une corrélation positive entre la préférence globale de matières grasses et la masse grasse corporelle chez l'homme. Stewart et al. (Stewart *et al.*, 2010) ont trouvé que les personnes qui ont été définies oralement hypo sensible à l'acide oléique, ont consommé plus d'énergie et de matières grasses et avaient un indice de masse corporel (IMC) plus élevé, que celles définies comme hypersensibles. Ces observations indiquent que la diminution de la sensibilité gustative du gras, peut contribuer à un règlement de la préférence accrue pour les aliments. La suralimentation et le gain soutenu de poids corporel peuvent être alors éradiqués. Fait extraordinaire, les cellules gustatives de l'homme expriment CD36 dans papilles caliciformes et foliées (Simons *et al.*, 2010).

2.2. STIM1 régule la signalisation calcique et la préférence gustative lipidique via les phospholipases A2 et les canaux calciques Orai1 et Orai3

[J Clin Invest doi:10.1172/JCI59953 *IF=15*]

2.2.1. Objectifs

Notre but est de montrer ici que l'acide linoléique (LA) en activant différentes isoformes de sPLA2, cPLA2 et iPLA2 via CD36, produit de l'acide arachidonique (AA) et lyso-phosphatidylcholine (lyso-PC) et déclenche in influx calcique. De plus comment CIF, AA et lyso-PC interviennent dans l'ouverture des canaux SOC ? De quoi sont constitués ces canaux ? La préférence gustative lipidique observée passe-telle par ces canaux ? Pour répondre à ces questions, nous avons utilisé de nombreux outils et techniques.

2.2.2. Matériels et Méthodes

2.2.2.1. Matériels

Durant les trois années de ce travail, les expériences ont été faites sur des souris mâles C57BL/6J âgées de 6 à 10 semaines dont l'élévage, la commercialisation et le transport étaient assurés par la l'entreprise Janvier Elevage (Le Genest-st-isle, France). Après la livraison les animaux étaient acclimatiés pendant un minimum de trois jours. Le Sulfo-N-succinimidyl-oléate (SSO) a été un généreux don de JF Glatz. Les milieux de culture RPMI 1640 et L-glutamine ont été achetés chez Verviers Lonza. Fura-2/AM a été obtenu chez Invitrogen. Les enzymes élastase et dispase ont été achetées chez Serlabo et Roche Diagnostics, respectivement. Les anticorps anti-PLA_2 et les anticorps anti-CD36 anticorps couplés à l'anticorps anti-phycoérythrine et l'α-gustducin ont été obtenus chez Santa Cruz Biotechnology Inc anticorps anti-Orai1 et anti-Orai3 ont été obtenus chez Interchim. Les inhibiteurs Arachidonyle cétone trifluorométhyle (ATK), bromoenol lactone (BEL) et le kit de mesure d'activité enzymatique de PLA_2 ont été achetés chez Cayman Chemical. Le Méthyle arachidonyle fluorophosphonate a été obtenu chez Calbiochem. L'acide arachidonique-^{3}H (activité spécifique, 217Ci/mmol) et le sulfate de créatinine de 5-hydroxytryptamine (sérotonine), 5 - [1,2-3H (N)] - (activité spécifique, 25Ci / mmol) ont été achetés chez Amersham. Les anticorps anti-PLA_2 ont été obtenus chez United States Biological (MA, USA). Les colonnes Sep-Pak Vac C18 ont été obtenues chez Millipore. Tous les autres produits chimiques, y compris l'acide arachidonique (20:4 n-6), l'acide linoléique (18:2 n-6), la collagénase de type I, l'inhibiteur de la trypsine, l'acide aristolochique, le 4-bromo bromure de phénacyle et l'anticorps anti-STIM1 ont été obtenus chez Sigma-Aldrich.

2.2.2.2. Isolation des cellules CD36-positives à partir des papilles caliciformes de souris

La technique de prélèvement de la papille caliciforme ou de souris a été mise au point par Laugerette *et al*. (2005). Nous l'avons adaptée puis améliorée à partir des travaux de Ruiz *et al*. (2001) et Miyamoto *et al*. (1996). Les souris sont euthanasiées par dislocation cérébrale, puis la langue est dégagée en coupant la mâchoire ainsi que les ligaments et le frein qui la retiennent. La langue est placée ensuite dans une boite de Pétri contenant une solution de tyrode contenant 120 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 10 mM d'HEPES, 1 mM de $CaCl_2$, 10 mM de glucose, 1 mM de $MgCl_2$, 10 mM de Pyruvate de sodium, à un pH de 7.4. La langue est ensuiteet coupée transversallement en deux parties de manière à séparer les papilles fongiformes des papilles caliciformes et foliées pour faciliter les injections. Les deux morceaux sont gardés quelques minutes dans la solution de tyrode froide (4°C) afin de durcir légèrement les tissus. Puis, une solution enzymatique, constituée d'élastase (2 mg/ml) et de dispase (2mg/ml) en solution dans le tyrode, est injectée directement sous l'épithèlium lingual pour l'isoler. Il contient les bourgeons du goût de la musculature sous-jascente. Les morceaux injectés sont incubées 10 min à température ambiante dans une solution de tyrode sans calcium dans laquelle le $CaCl_2$ et le $MgCl_2$ ont été substitués par l'EGTA qui permettait l'activation des enzymes. Sous une loupe binoculaire, la papille caliciforme ainsi que l'épithèlium non gustatif adjascent sont isolés et mis séparément dans des eppendorfs contenant le milieu de culture RPMI 1640 et maintenus à 4°C.

Après la collecte des papilles caliciformes et les papilles témoins d'un nombre suffisant de langues, les tissus sont incubés séparément dans le milieu RPMI 1640 contenant 2 mM d'EDTA, 1,2 mg/ml d'élastase, 0,6 mg/ml de collagénase type I et 0,6 mg/ml d'inhibiteur de la trypsine à 37°C pendant 20 minutes. Les cellules dissociées sont ensuite centrifugées à 600g pendant 10 minutes. Le culot de cellules est repris dans le milieu de culture RPMI 1640 afin de prélever les cellules en suspension. Ces cellules sont lavées et débarrassées de toute trace d'enzyme. Cette opération est répétée 3 fois sur les tissus non digérés par la mixture enzymatique.

Pour la sélection, les différentes populations de cellules collectées de toutes les papilles caliciformes sont incubées avec l'anticorps anti-CD36 couplé avec la phycoérythrine (Santa Cruz Biotechnology Inc, USA) pendant 2 heures. La préparation cellulaire est lavée avec du PBS (600 g, 10 min) et suspendue à nouveau dans une solution contenant des microbilles-

couplées avec un anticorps IgG anti-phycoérythrine. Les cellules CD36 positives sont isolées en passant la suspension contenant les complexes cellules-anticorps anti-CD36–Phycoérythrine – anti-Phycoérythrine – microbilles (Figure34) dans une colonne (MACS) de Miltenyi dotée d'un système magnétique. Les cellules CD36 positives collectées ont été reprises dans un milieu RPMI 1640 frais contenant 10% du sérum du veau fœtal (SVF), 200 U/ml de pénicilline et 0,2 mg/ml de streptomycine. Le mélange est semé dans une boite de Pétri traitée par Poly-D-Lysine (Biocoat Cellware 35 mm Dish, BD BioCoat™, Elvetec) et cultivé pendant 24 heures. Avant toute utilisation des cellules purifiées, un volume de cellules est traité avec du bleu de trypan pour tester la viabilité cellulaire et effectuer une numération cellulaire. Pour s'assurer de la pureté et de l'identité des cellules retenues dans la colonne, nous avons procédé à la vérification de l'expression du gène CD36 et α-gustducine par l'utilisation d'une part la technique RT-PCR et la technique d'immunocytochimie.

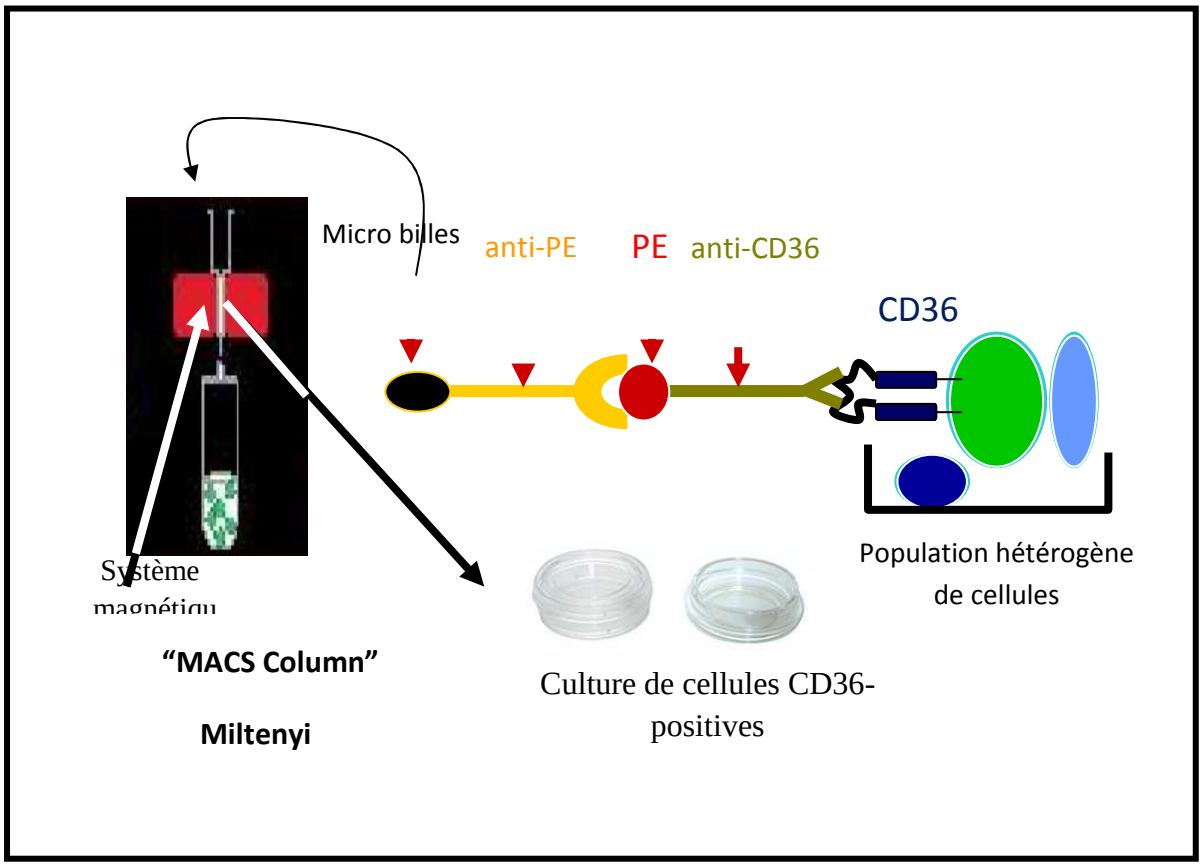

Figure34: Système de sélection des cellules CD36-positives.
Les cellules CD36 positives sont isolées en passant la suspension contenant les complexes cellules-anticorps anti-CD36–Phycoérythrine–anti-Phycoérythrine –microbilles dans une colonne (MACS) de Miltenyi dotée d'un système magnétique. Les cellules CD36 positives collectées ont été reprises dans un milieu RPMI 1640 frais contenant 10% du sérum du veau fœtal (SVF), 200 U/ml de pénicilline et 0.2 mg/ml de streptomycine. Le mélange est semé dans une boite de Pétri traitée par Poly-D-Lysine (Biocoat Cellware 35 mm Dish, BD BioCoat ™ , Elvetec) et cultivée pendant 24 heures.

2.2.2.3. Détermination de l'expression des ARNm par RTqPCR

La RT-qPCR est une technique qui permet d'utiliser l'ARN comme matrice pour l'amplification d'une séquence d'ADN complémentaire double brin cible. Cette opération s'effectue *in vitro* après une transcription inverse des ARN par extension de deux amorces situées de part et d'autre de la cible à amplifier grâce à une ADN polymérase. L'amplification est effectuée par la répétition de cycles de dénaturation, hybridation et extension qui assure une duplication exponentielle de chaque brin.

Les conditions d'amplification optimales (nombre de cycles, température d'hybridation, temps d'extension) sont déterminées expérimentalement pour chaque paire d'amorces et en fonction de la séquence à amplifier.

L'ARN total a été extrait de cellules CD36-négatives et/ou CD36-positive, en utilisant du Trizol (Invitrogen). Ces cellules sont traitées par un kit débarrassé de toute ADNase ou ARNase (Qiagen). Un µg d'ARN total subit une transcription inverse avec la super script II ARNase H de la transcriptase inverse en utilisant des oligo (dT) selon les instructions du fabricant (Invitrogen). La RT-PCR a été réalisée sur iCycler iQ, doté d'un système de détection et d'amplification en temps réel. La sonde de détection utilisée est le SYBR Green I. Les amorces oligo-nucléotidiques sur les séquences de gène chez la souris ont été recherchées dans la base de données Genebank (Tableau 11). L'amplification a été réalisée dans un volume total de 25 µl qui contenait 12,5 µl de SYBR ® Green, et 12,5 µl d'un tampon *supermix* [50 mM, KCl, 20 mM, Tris-HCl (pH 8,4); 3 mM, MgCl2, 0,2 mM de chaque dNTP, 0,63 polymérase ADN U ITAQ et SYBR ® Green 1,0 nM fluorescéine] (0,3 µM) de chaque amorce et d'ADNc dilué.

Les résultats ont été évalués par les logiciels iCycler iQ, y compris les courbes d'étalonnage, de l'efficacité d'amplification (E) et le seuil du cycle (Ct). La quantification relative de l'ARNm dans les différents groupes a été déterminé comme suit: ΔΔCt = ΔCt du gène d'interet - ΔCt de la β actine. ΔCt = Ct des CD36-positive ou CD36-negative cells - Ct de toute la population cellulaire. La quantité relative (RQ) est calculée comme suit: RQ = (1+E) (-ΔΔCt). Pour les déterminations semi-quantitatives, l'amplification a été réalisée dans les mêmes conditions, décrites ci-dessus, pour 30 cycles, suivis par une période d'extension finale de 72 ° C pendant 10 minutes. Les produits de la réaction ont été soumis à une électrophorèse sur un gel d'agarose 1,5% imprégné de bromure d'éthidium. Le modèle d'ARN a été visualisé par transillumination UV.

β-actin	**Sens**	**5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3'**
	Anti-sens	5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'
iPLA2 type VI	Sens	5'- CCGTATGAAGGACGAGGTGT-3'
	Anti-sens	5'-CGGTGGCTTCAGGTTAATGT-3'
iPLA2 type VIβ	Sens	5'-ATGATTATCAGCATGGACAGCA-3'
	Anti-sens	5'-ACACAGGTTACAGGCACTTGAGG-3'
cPLA2 type IVc	Sens	5'-TTCAGCAGGCTCTGGGTACT-3'
	Anti-sens	5'-TGGTCGAGAAACTGCTCCTT-3'
cPLA2 type IVf	Sens	5'-ACGGAACTCTTTGGCTCTGA-3'
	Anti-sens	GACACTGACACTCCCCCTGT-3'
cPLA 2 type IVd	Sens	5'-AGATGAGGTCCCTGTTGTGG-3'
	Anti-sens	5'-TTCCCGAAGCTTCAGTGTCT-3'
cPLA2 type IVa	Sens	5'- GTCCTTTGCCTCTCTTCACG-3'
	Anti-sens	5'-TTTGCCATGCCAATCTCATA-3'
sPLA2 type IIa	Sens	5'-GGCTGTGTCAGTGCGATAAA-3'
	Anti-sens	5'-TTTTCAGCATTTGGGCTTCT-3'
sPLA2 type X	Sens	5'- GCTGTTATTGTGGCCTTGGT-3'
	Anti-sens	5'-TTGGCATTTGTTCTCTGCTG-3'
sPLA2 type V	Sens	5'-GATGCACGACCGTTGTTATG-3'
	Anti-sens	5'- CAGGCAGTAGACCAGCTTCC-3'
Stim1	Sens	5'-GGTAGCCGAAACACACGAAT-3'
	Anti-sens	5'-GAAAGGAAGGGAGGTGAAGG-3'
Orai1	Sens	5'- TCCCTGGTCAGCCATAAGAC-3'
	Anti-sens	5'-TCATGGAGAAGGGCATAAGG-3'
Orai3	Sens	5'-GCCACCTCCTGTAAGCTCTG-3'
	Anti-sens	5'- TCCTGGAGGAGCAAACAACT-3'

Tableau 11:Liste des amorces utilisées.

2.2.2.4. Détermination des isoformes de PLA_2 par microscopie confocale

La microscopie confocale, consiste à marquer les échantillons à étudier avec des fluorochromes. Les fluorochromes sont alors excités par un laser adapté. Pour cela, le faiseau du rayon laser balaye l'ensemble de l'échantillon grâce à un jeu de miroir. L'émission des fluorochromes, résultant de l'excitation, est captée par le photomultiplicateur et l'image est

reconstituée point par point sur un écran. Grâce à la présence du pinhole (petit trou) devant le détecteur, seule la fluorescence provenant du plan focal est captée. La fluorescence hors focus est bloquée.

Pour étudier les isoformes de PLA2 exprimées par les cellules CD36-positives, des lames de *Cytospin* sont préparées. Ces lames contiennent les cellules CD36-positives, fixées dans de l'éthanol à 95% et réhydratées dans 0,1 M de PBS, à pH 7,4. Les préparations cellulaires ont été fixées dans du PBS, contenant 5% de sérum de veau fœtal et 0,2% de triton X-100, pendant 30 minutes à température ambiante. Les anticorps primaires anti-cPLA_2, anti-sPLA_2 et anti-iPLA_2 (dilution 1:100) sont incubées sur les préparations cellulaires pendant une nuit à 4° C. Après lavage, les lames sont incubées pendant 2 heures à température ambiante avec des anticorps secondaires, conjugué à FITC IgG anti-souris pour l'expression de la sPLA2 et iPLA2, et IgG de souris conjugué à Alexa Fluor 633 pour la détection cPLA2 (dilution 1:600). La spécificité de coloration a été évaluée par le traitement de diapositives en l'absence d'anticorps primaires. Après trois lavages avec du PBS, une goutte de milieu de montage Aqua Poly-Mount est ajoutée sur les lames pour l'analyse au microscope fluorescent (Zeiss).

2.2.2.5. Mesure de l'activité enzymatique des PLA_2

Les enzymes constituent la classe de protéines la plus vaste et la plus spécialisée. Ce sont des instruments primaires de l'expression et de l'action d'un gène, puisqu'ils catalysent les milliers de réactions chimiques qui constituent le métabolisme intermédiaire des cellules. L'enzyme, lors de son interaction avec le substrat, modifie la réactivité moléculaire et facilite la réaction du substrat. L'activité enzymatique rend compte de la réaction du substrat. Cette activité peut être mesurée de diverses manières, notamment en quantifiant un produit de la réaction. Dans le cas considéré, le substrat est l'arachidonoyl-thio-PC. Etant donné que l'action des PLA_2 sur les triglycérides en position *sn*-2 consiste à hydrolyser le pont arachidonoyl-thioester, les thiols libérés peuvent être détectés par le DTNB (*5,5'-dithio bis-2(nitro benzoic acid*).

L'activité des différentes isoformes de PLA2 a été déterminée selon le protocole fourni avec le kit. En bref, les cellules CD36-positive (10^6/essai) incubées dans une boîte de Pétri, ont été grattées par une spatule en caoutchouc, soniquées dans 1 ml de tampon froid (HEPES 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) et centrifugées à 10 000g pendant 15 minutes à 4 ° C. Le surnageant a été retiré et conservé dans la glace. La quantité de protéines a été déterminée par l'acide bicinchoninique (Pierce) et les essais ont été effectués le même jour pendant 1 h à 20 ° C. Les dosages pour cPLA_2 et sPLA_2 ont été effectués suivant le protocole du fourniseur mais, pour détecter l'activité de iPLA_2, une activité phospholipase a été dosée par l'incubation des

échantillons avec le substrat, arachidonoyl Thio-PC dans une version modifiée de tampon sans calcium (300 mM, NaCl, 0,5%, le Triton X-100; 60%, le glycérol; 4 mM, EGTA; 10 mM, Hepes à pH 7,4 et 2 mg/ml d'albumine de sérum bovin) comme proposé par Smani *et al*. (2004). Par ailleurs, nous avons aussi ajouté les inhibiteurs de $sPLA_2$ (acide aristolochique et 4-bromo bromure de phénacyle, BPB) et $cPLA_2$ (arachidonyle cétone trifluorométhyle, ATK) à 15 µM pour bloquer toute ingérence de ces enzymes. La réaction a été stoppée par l'addition de DTNB pendant 5 minutes, et l'absorbance a été déterminée à 405 nm en utilisant un lecteur de plaque standard. L'activité PLA_2 est exprimée en nmol/min/ml. L'activité basale indépendante d'$iPLA_2$ a été déterminée dans des échantillons de contrôle quand $iPLA_2$ était inhibée par BEL (15 µM). Cette activité basale a été soustraite de toutes les lectures.

2.2.2.6. Mesure de la libération d'acide arachidonique tritié

Le marquage radioactif est une technique qui s'est généralisée ces dernières années grâce aux nouvelles techniques de radioprotection. Il consiste à insérer des atomes radioactifs dans la structure d'un composé. L'identification d'un produit radioactif étant plus facile, le produit marqué sera suivi. Pour marquer spécifiquement l'ADN, on utilise un précurseur avec de la thymidine. La thymidine n'existe pas dans l'ARN. Pour marquer un produit organique, on peut insérer du carbone ou de l'hydrogène radio actif. Le Carbone-14 est un noyau qui contient 6 protons et 8 neutrons, au lieu de 6 pour le Carbone-12 ordinaire. Le tritium est un isotope radioactif de l'hydrogène qui émet des électrons bêta. Son noyau est constitué d'un proton et de deux neutrons. Le tritium est trois fois plus lourd que l'hydrogène ordinaire dont le noyau est réduit à un proton et une fois et demie plus lourd que le deutérium dont le noyau est constitué d'un proton et d'un neutron.

L'acide arachidonique est le produit majeur de l'activité des PLA_2. Leur activité peut être mesurée par la libération de l'acide arachidonique (Hichami *et al*., 2002) En bref, les cellules CD36-positives ($2x10^6$/essai) ont été incubées avec de l'acide arachidonique marqué au tritium ([^{3}H]) (AA-[^{3}H], 1,5 µCi/$3x10^8$ cellules) pendant 2 heures dans du RPMI 1640 sans sérum supplémenté avec 0,2% de sérum bovin albumine sans acides gras (BSA). À la fin de l'incubation, les cellules ont été lavées deux fois avec du milieu RPMI 1640 sans sérum contenant 0,2% de BSA. Les cellules ont été remises en suspension dans 500 µl de milieu RPMI 1640 complété avec de BSA 0,5% à une concentration finale de $12x10^6$ cellules par ml et traitées avec 15 µM d'inhibiteurs de PLA_2 ou dans le solvant seul (DMSO, 0,1% v/v) pendant 10 min avec ou sans thapsigargine (5 µM), et acide linoléique (20 uM). Enfin, les

cellules sont centrifugées (1250g, 3 minutes). Le surnageant est récupéré dans des fioles de lecture et est additionné de liquide de scintillation en vue du comptage de réactivité.

L'AA-[^{3}H] libérée est exprimée en% du total des AA-[^{3}H] dans les cellules et normalisée pour les cellules non stimulées.

L'incorporation des acides gras dans la membrane plasmique des cellules a été mesurée. Après incubation avec les acides gras et lavage des cellules par le milieu RPMI contenant 0,2% BSA, le culot cellulaire est repris par 1 ml de méthanol, et les lipides totaux sont extraits selon la méthode de Bligh et Dyer. Brièvement, les lipides totaux sont extraits par un mélange méthanol/chloroforme/NaCl 0.5M (1/1/0.9 ;V/V). Après avoir agité puis centrifugé les tubes ; la phase inférieure (chlorophormique) est récupérée à l'aide d'une pipette Pasteur, puis séchée sous azote. Le culot sec est repris par 50 µL de mélange chloroforme / méthanol (V /V) puis déposé sur plaque de silice G60 (phase stationnaire), ensuite les lipides sont séparés dans une cuve saturée avec la phase mobile suivante : chloroforme/méthanol/acide acétique (35/14/2,7 ; v/v/v). Cette phase polaire permet la séparation des phospholipides en fonction de leurs polarité ; plus les phospholipides sont polaires moins ils migrent alors que les lipides neutres se retrouvent au front de migration. A la fin de la migration la radioactivité présente sur la plaque est repérée par un scanner BioScan, et les phospholipides sont identifiés en référence à des standards authentiques. Les facteurs de rétention (Rf) des phospholipides sont comme suit : Phosphatidyl choline (PC) : 0,11 ; Phosphatidyl Inositol (PI) : 0,3 ; Phosphatidyl Ethanolamine (PE) : 0,6. Ensuite les zones de silice contenant les différentes classes de phospholipides et des lipides neutres sont grattées et leur radioactivité est quantifiée par compteur beta (Packard Tri-Carb 2900TR) en présence de liquide scintillant (Ultimate Gold XR ,4ml). L'incorporation d'acide gras radioactif dans les phospholipides est exprimée par quantité de protéine mesurée. Ainsi, dans un tube supplémentaire réservé au dosage de protéines, le culot cellulaire a été lysé avec du NaOH 0,05M et un dosage protéique réalisé à l'aide de l'acide bicinchonique (BCA).

2.2.2.7. Mesure de la signalisation calcique

Les cellules de papilles caliciformes ont été cultivées pendant 24 heures et lavées avec un tampon calcium (1,2 mM CaCl2 ; 110 mM NaCl ; 5,4 mM KCL ; 250 mM $NaHCO_3$; 0,8 mM MgCl2 ; 0,4 mM KH_2PO_4 ; 20mM Hepes-Na ; 0,33 mM NaHPO4, le pH ajusté à 7,4). Les cellules ont été ensuite incubées avec la sonde FURA-2/AM (5µL par million de cellules) à 37°C et 5% CO_2 pendant une heure. Après incubation, les cellules ont été à nouveau lavées avec le tampon calcium pour éliminer l'excès de sonde et le calcium libre mesuré par la

méthode décrite par Grynkiewicz (Grynkiewicz *et al*., 1985). Dans certaines expériences nous avons utilisé un tampon dépourvu de calcium (0% calcium) ; la composition de ce tampon est identique à celle du tampon riche en calcium sauf que le $CaCl_2$ est remplacé par l'EGTA à 2 mM.

Les intensités de fluorescence ont été mesurées par le spectrophotomètre PTI à des longueurs d'ondes de 340 nm et 380 nm pour l'excitation, et à 510 nm pour l'émission. Un barreau magnétique a permis d'effectuer une agitation tout au long de l'enregistrement. Les solutions à tester ont été ajoutées pendant l'expérimentation dans la cuve de lecture sans interrompre l'enregistrement. La concentration de calcium libre a été calculée suivant la formule suivante : $[Ca^{2+}]_i = K_d \times (R-R_{min})/F_{max} - F) \times (Sf_2/Sb_2)$. K_d est la constante de dissociation du complexe Fura-2/Calcium et a pour valeur 224nM. R est le rapport de l'émission à 340nm divisée par celle à 380 nm. R_{min} représente la valeur de R en absence de calcium (solution 0% Ca^{2+}) et F_{max} la valeur de R en présence de Ca^{2+}. Sf_2/Sb_2 est le rapport entre les fluorescences émises à 380 nm dans des solutions à 0% et riche en Ca^{2+}. F_{max} et R_{min} sont obtenus respectivement par addition d'ionomycine (5µM) et de $MnCl_2$ (2µM).

Nous avons utilisé un protocole CFCR (*calcium free calcium réintroduction*), c'est-à-dire que l'expérience a été faite initialement dans un tampon 0% calcium et du calcium est rajouté pour avoir 1,2 mM de $CaCl_2$ finale dans la cuve. La réponse calcique est induite par l'ajout préalable de la thapsigargine. Pour les expériences dans lesquelles les inhibiteurs de PLA_2 ont été utilisés, les cellules ont été incubées pendant 20 minutes avec ces inhibiteurs avant leur activation.

2.2.2.8. Imagerie calcique

Le microscope inversé Ti dans sa version motorisée, associé au logiciel d'analyse d'images NIS-Elements AR, est une solution particulièrement adaptée à l'imagerie calcique. Cet outil à la pointe de la technologie actuelle en matière d'imagerie cellulaire nous a servi à faire nos études d'imagerie calcique.

Les cellules CD36-positives ont été cultivées dans des boîtes de Pétri ou des plaques de 6 ou 24 puits avec un fond de verre. Elles ont été préalablement incubées avec la sonde Fura-2/AM. Les variations de calcium intracellulaire ont été directement visualisées sous le microscope Nikon (TIU) à l'aide de l'objectif 40x S-fluor à immersion d'huile. Les images ont été enrégistrées à Z=0,3 µm, et le logiciel NIS-Elements a été utilisé pour déconvoluer les images. La double excitation a permis de renseigner le rapport $Fura_{340nm}/Fura_{380nm}$. Le microscope est équipé d'une caméra d'EM-CCD (Lucas) pour l'enregistrement en temps réel

des images à 16 bits numériques. L'imagerie de fluorescence du système a été utilisée pour l'étude des cellules individuelles. Les changements dans le calcium intracellulaire ont été exprimés en *ΔRatio*, calculé comme la différence entre les pics du rapport F340/F380.

2.2.2.9. Extraction et purification de CIF

L'activation d'un facteur d'induction de l'influx calcique, CIF (*calcium influx factor*) est l'hypothèse la plus probable pour expliquer la réentrée du calcium suite à une déplétion des réserves. La possibilité d'isoler ce facteur était salutaire dans la démarche de justification cette hypothèse. Nous avons suivi le protocole d'extraction de CIF proposé par Smani *et al*. (2004). Les cellules CD36-positive (10^6 cellules/essai) ont été stimulées avec l'acide linoléique (20 µM) ou la thapsigargine (5 µM) pendant 15 minutes. Après trois lavages, les cellules sont remises en suspension dans 0,85 ml solution saline équilibrée de Hanks (HBSS). La suspension a été extraite avec 0,2 ml de HCl molaire pendant 30 minutes à température ambiante. Après centrifugation, le surnageant est neutralisé avec NaOH 10 M, et 10 mM de BaCl2 ajouté pour précipiter les composés contenant des phosphates, y compris les inositol-1 ,4,5-triphosphate. Après une nouvelle centrifugation, le surnageant est lyophilisé et le résidu extrait avec 0,8 ml de méthanol en mélange continu pendant 15 minutes. L'extrait contenu dans le méthanol est passé à travers une colonne Sep-Pak Vac C18, et la cartouche lavée avec 0,8 ml de méthanol. La préparation éludée est séché à 30° C sous un flux d'azote et de re-suspendu dans 100 µl d'acide acétique à 0,1 M. L'extrait reconstitué est purifié par ultrafiltration centrifuge à travers un Centricon 30 (Millipore). Une étape supplémentaire de purification des extraits de CIF est effectuée par HPLC dans une colonne Partisil 10 SAX échangeuses d'anions (Keystone Scientific) et l'élution est effectuée par un sel de gradient linéaire et de pH 5 et 750 mM de (NH_4) H_2PO_4 à pH entre 2,8 et 3,7, (Trepakova *et al*., 2000). Les extraits de CIF induisent à partir d'1µl une augmentation de calcium intracellulaire dans les CD36-positives et dans d'autres cellules.

2.2.2.10. Electrophysiologie

Le Patch-clamp est une technique électrophysiologique d'enregistrement des courants ioniques transitant à travers les membranes cellulaires. Cette technique consiste à mettre en continuité électrique une micro-pipette en verre (diamètre de contact de l'ordre du micron) remplie d'une solution ionique de composition définie avec la membrane d'une cellule vivante isolée. Les cellules étudiées peuvent être des cellules excitables comme les neurones, les fibres musculaires et les cellules beta du pancréas, ou des cellules non excitables qui

présentent aussi à leur surface des canaux ioniques. Il existe 4 configurations de patch clamp (Figure35). Dans la configuration *whole-cell*, l'activité macroscopique de l'ensemble des courants cellulaires est mesurée ; dans la configuration *Cell-attached*, la micro-pipette est pressée contre la membrane, et le fragment de membrane sous la pipette n'est pas brisé comme dans la configuration cellule entière, ni la pipette éloignée de la cellule ; dans la configuration *Inside-out*, le fragment de membrane est accolé à la pipette de mesure et sa face intracellulaire en contact avec l'extérieur de la pipette ; enfin dans la configuration *Outside-out*, la face intracellulaire du fragment de membrane accolé à la pipette de mesure est en contact avec l'intérieur de la pipette.

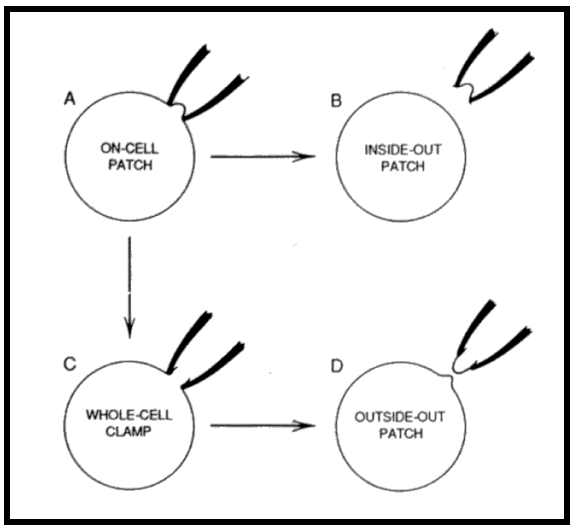

Figure35:Différentes configurations de Patch-clamp.

Des enregistrements électro physiologiques ont été effectués à température ambiante (20-23°C) dans une configuration classique cellule entière (*whole-cell*) de la technique du patch-clamp (Hamill *et al*., 1981) La capacitance membranaire (Cm) a été déterminée comme décrit par Chouarbe et al. (1997). Les valeurs moyennes pour la Cm des cellules Jurkat T était de 18,4 ± 1,0 pF (n = 28). La résistance variait de 1,5 à 8,2 MΩ. La capacitance de la membrane et la résistance n'ont pas été compensés. La commande et l'acquisition des données ont été faites avec le logiciel pClamp (Axon Instruments). Les courants membranaires ont été induits toutes les 3 secondes à partir d'un potentiel de maintien de 0 mV, par des rampes de tension de 50 ms, appliquées de -100 à 100 mV, échantillonnés à 20 kHz et filtrées à 3 kHz. Les traces n'ont pas été corrigées pour la suite. La solution externe contenait (en mM): 145, NaCl; 2,8, KCl; 2, MgCl 2, 20, CaCl 2; 6, CsCl, 10, glucose; 10, Hepes; ajusté à pH 7,4 avec du NaOH. La solution interne (à l'intérieur de la pipette) contenait (en mM): 145, Cs-glutamate; 8, NaCl; 1, MgCl2; 4, MgATP: 0,2, BAPTA; 10, Hepes ajusté à pH 7,2 avec CsOH. Les

extraits de CIF purifiés à partir de cellules CD36-positives stimulées par l'acide linoléique ont été inclus dans la solution de pipette à la dilution de 1 à 15. La libération de calcium activée par le courant I_{CRAC} a été enregistrée comme lanthane (La^{3+}) sensibles. Elle est obtenue par soustraction de du courant La^{3+} résistant au courant total.

2.2.2.11. Inhibition par siRNA

Les *small interfering-RNA* (siRNA) sont de petits ARN double brin de 21 nucléotides. Les *si*ARN, à l'état de double brin sont reconnus dans le cytoplasme cellulaire par un complexe protéique nommé complexe RISC (*RNA induce silencing complex*). Celui-ci s'active en libérant le brin complémentaire de l'ARN ou brin « sens ». Ce complexe activé va reconnaitre son transcrit « cible », un ARN messager, par complémentarité des bases nucléiques. Ce système de reconnaissance assure la haute spécificité du mécanisme. Une fois la cible liée, la protéine « Argonaute », faisant partie du complexe RISC, va couper le transcrit au niveau du site de reconnaissance (Figure36). La protéine argonaute va avoir une action endonucléase. Les deux morceaux du transcrit clivés vont être rapidement dégradés *via* leurs extrémités par des exonucléases. La transfection de *si*ARN dans les cellules a donc pour conséquence la destruction spécifique des ARNm ciblés, empêchant toute nouvelle traduction de la protéine codée par ces ARN messagers.

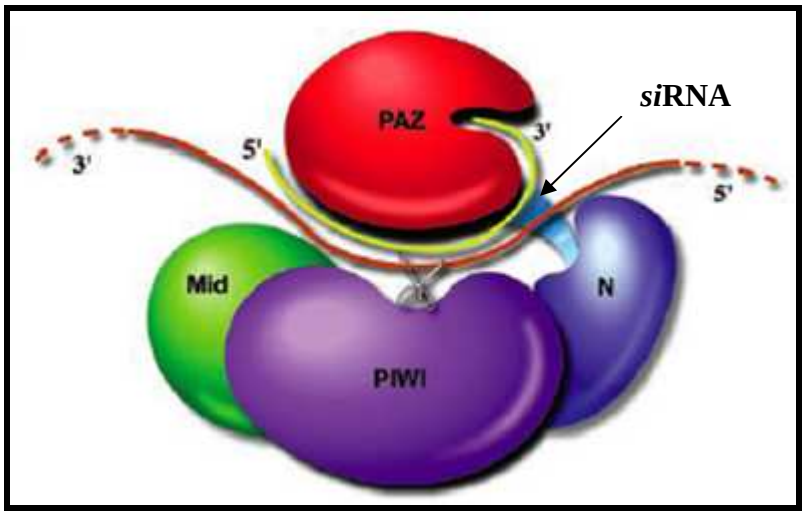

Figure36: Structure d'une protéine Argonaute.
Le siARN est représenté en jaune, et l'ARNm ciblé en rouge. une protéine Argonaute est définie par la présence des domaines PIWI et PAZ. Le domaine PAZ, voisin de la partie N-terminale de la protéine, interagit avec les deux nucléotides non appariés de la région 3' du siARN ou du microARN. Près de l'extrémité C-terminale de l'Argonaute, on retrouve le domaine PIWI. Ce domaine contient la région catalytique appelée « DDH » (deux aspartates et une histidine), un motif analogue au motif catalytique de la famille des RNases H. D'après Song *et al.* (2004)

Les cellules CD36-positives ont été transfectées avec des *si*RNA. Le pool obtenu par le fournisseur était concentré à 25 nM et était conçu pour résister à Orai1, Orai3, STIM1, différentes isotypes de PLA_2. Le contrôle utilisé était un siRNA non ciblé (Dharmacon). Les séquences des duplex utilisés sont représentées dans le tableau 12. 24 heures avant le traitement, les cellules ont été placées dans le milieu de culture sans antibiotiques et transfectées avec le siRNA en utilisant DharmaFECT (Dharmacon). Après 24 h d'incubation, le milieu a été aspiré et remplacé par du milieu frais sans siARN pendant 48 h avant les mesures calciques ou l'analyse Western blot.

Gène	Complexe *si*RNA
STIM1	5′-GAAGUAGGCAGACUAGGGU-3′
	5′-AAACAUAGCACCUUCCAUG-3′
	5′-GAUCGGAGCCACAGGCAGA-3′
	5′-UACAGUGGCUCAUUACGUA-3’
Orai1	5′-AAUAUAUUCACAAGGGACA-3’
	5′-UCACUAAACACCAGUCUUU-3′
	5′-GGAAAUGGCUCGGGGACAA-3
	5′-ACAUCGAGGCUGUGAGCAA-3′
Orai3	5′-GAUCCUUGGUUGCCCACAA-3′
	5′-GGAGAAGAUUCAGCCCUUA-3’
	5′-CUGUGGGACUAGGUGUUUAU-3′
	5′-AGGUACAGCUGGAGAACGA-3’
PLA_2 type IIa	5’-GCUUAGCUAUGCCUUCUAU-3’,
	5’-ACUCAUGACUGUUGCUACA-3’
	5’-GAUCAUGGCCUUUGGCUCA-3’
	5’-GAACAUUGCGCAGUUUGGG-3’
PLA_2 type V	5’-ACGGAACACAUGCGAUCUA-3’
	5’-GAGAUAUAUCAAUGGCGGA-3’
	5’-CAAGUCAUCUAUCGCUUUA-3’
	5’-UUGAGAAGGUGACCGGGAA-3’
PLA_2 type VI	5’-GGUGCGAGAUGGUCGGCAU-3’
	5’-GCACCUGGCCAUGUCGAAA-3’
	5’-GCUCCAUGAGGGACGAGAA-3’
	5’-GGGCCAAGAACGCCGAGAU-3’
PLA_2 type IVc	5’-CCUCUAUAAACACGGUAAA-3’
	5’-GGAAUGAGACCUCCGCAGA-3’
	5’-UAGAAGGACCAGUGACAUA-3
	5’-AGAGAUUUGCUGAGGGUAU-3’

Tableau 12: séquences des complexe siRNA utilisés

2.2.2.12. Détection par Western Blot

Le *Western Blot* est une méthode de biologie moléculaire permettant la détection et l'identification de protéines spécifiques dans un échantillon biologique.

Après transfection des cellules CD36-positives en culture pendant 24 heures, elles ont été lysées avec 50 µl de tampon contenant: 20 mM, pH 7,3 HEPES, 1 mM, EDTA, 1 mM, EGTA; 0,15 mM, NaCl, 1%, Triton cocktail 2 mM, orthovanadate de sodium et anti-protéase (2 µl dans 1 ml de tampon); X-100; 10% de glycérol, 1 mM, fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF). Après centrifugation (13 000g x 1 min), le lysat cellulaire est utilisé immédiatement ou conservé à -20 ° C. La teneur en protéines est déterminée par l'acide bicinchoninique, BCA (Pierce). Les protéines dénaturées (30 µg) sont séparées par SDS-PAGE (10%) et transférées sur des membranes à difluorure de polyvinylidène (PVDF), et une immunodétection est effectuée en utilisant des anticorps anti-STIM1 (4 µg/ml), anti-Orai1 (2 µg/ml) ou anti-Orai3 (4µg/ml). Pour la détection des PLA_2 de, les anticorps sont utilisés à une dilution de 1:2000 et les protéines révélées. Après le traitement des membranes un anticorps secondaire anti-souris couplé à la peroxydase, l'activité peroxydase a été détectée avec des réactifs ECL (Amersham).

2.2.2.13. Déficience génétique des souris

L'invalidation d'un gène est basée sur la recombinaison homologue (Figure37). Pour être invalidé, il doit être localisé dans le génome et remplacé par un autre gène. Ceci annule son activité.

Des souris homozygotes déficientes en Stim1 ou Orai1 ont été générés à partir de clones de cellules souches embryonnaires et la transmission à la lignée germinale est effectuée, comme décrit ailleurs (Braun *et al.,* 2009). Parce que les souris $Stim1^{-/-}$ et $Orai1^{-/-}$ ont souffert de retard de croissance et de la létalité précoce, des souris âgées de 3-5 semaines ont été utilisées dans les expériences et des souris de type sauvage de la même portée ont été utilisées comme témoins. Il n'y avait pas de différences significatives dans le rendement de cellules CD36-positive entre sauvage et $Stim1^{-/-}$ ou $Orai1^{-/-}$ souris.

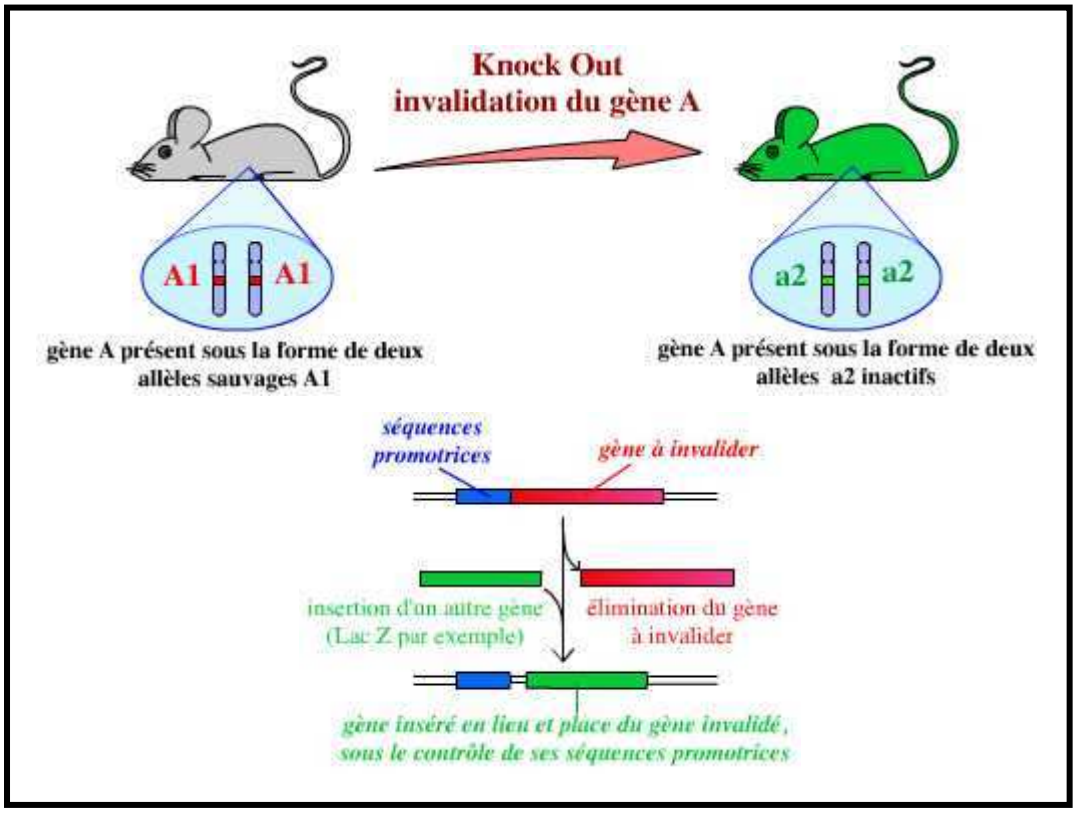

Figure37: Méthode d'invalidation d'un gène.
Il est nécessaire de connaitre la localisation du gène à invalider et des séquences le bordant dans le génome avant de pouvoir procéder à son invalidation. Il doit être remplacé par un autre gène, par exemple un gène "rapporteur" tel que le gène lac Z (qui code pour la ß-galactosidase). Adapté de *www.snv.jussieu.fr*

2.2.2.14. Mesure de la libération de la sérotonine

La libération de sérotonine marquée (5HT-[^{3}H]) a été mesurée d'après le protocole de Khan et al. (1996). Les cellules CD36-positives ont été chargées avec 5HT-[^{3}H] (2 mCi/3x10^8 cellules) pendant 1 heure dans un tampon d'incubation contenant (en mM): 40, Tris-HCl (pH 7,4), 25 de glucose ; 5 de KCl; 150 de NaCl; 1,5 de $CaC1_2$; 1,4 de $MgSO_4$; 1,2 d'ascorbate et 0,1 d'acide amino-oxyacétique à 37 ° C. À la fin de l'incubation, les cellules ont été lavées, centrifugées (2000 g, 5 minutes) dans un tampon de lavage (en mM): 150 de NaC1, 5 de KCl, 1.2 de $MgSO_4$, 1 d'ascorbate, 10 de glucose, et 1.3 d'EGTA. Puis, les cellules ont été remises en suspension dans un tampon de sortie contenant de la chlorgyline (100 µM) et de la pargyline (100 µM) afin d'éviter métabolisme de la sérotonine. La composition du tampon était identique à celle de la solution de lavage sauf que le $CaC1_2$ à 2mM a été remplacé par $MgSO_4$, EGTA a été retiré, la concentration de NaCl a été réduite à 75 mM, et divisé en de

nouveaux tubes, puis les cellules ont été traitées avec l'acide linoléique en présence ou en absence de SSO pendant 30 minutes. Après centrifugation, la radioactivité dans le surnageant et le culot a été comptée. La libération de 5HT-[^{3}H] est calculée en pourcentage de cellules non stimulées, en divisant la radioactivité du surnageant par la radioactivité du culot pour chaque essai. La sérotonine non radioactive a aussi été détectée par HPLC (El Yassimi *et al*., 2008)) et les valeurs ont été corrigées pour la libération de sérotonine radioactive.

2.2.2.15. Induction de la splénomégalie

Ayant observé en plus du retard de croissance, un développement de splénomégalie chez les souris ayant le gène de STIM1 invalidé, nous avons injecté par voie intrapéritonéale à des souris une dose unique de chlorure de cadmium ($CdCl_2$) (1,8 poids corporel mg / kg) selon le protocole de Pathak et Khandelwal (2009). Les souris témoins ont été injectées avec le solvant, du tampon physiologique (NaCl à 9g/l). Les animaux ont été pesés avant et après l'injection. 72 heures après l'administration, les animaux ont été sacrifiés et leurs rates ont été immédiatement prélevées, pesées et examinées au microscope. Nous avons observé que l'augmentation du poids de la rate chez les souris injectées au cadmium, est de 93% par rapport aux témoins.

2.2.2.16. Test de préférence lipidique

Des expériences sur la préférence spontanée pour des solutions enrichies en lipides ont été faites avec un test de préférence de deux bouteilles (Figure38).

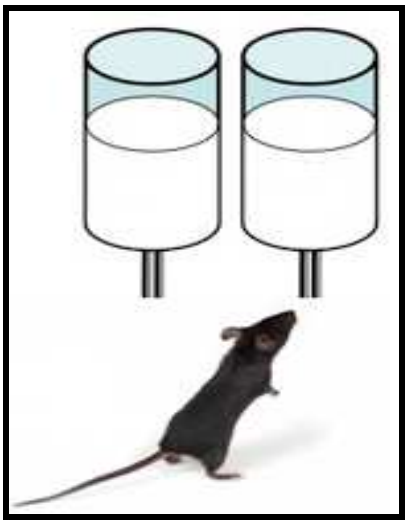

Figure38: Représentation du test à double choix

Les souris sauvages, Stim1$^{-/-}$ ou celles ayant reçu une injection de $CdCl_2$ ont été d'abord accoutumées à l'eau potable dans deux bouteilles pour une période de 24 heures. Ensuite, les

souris en cage individuelle ont été autorisées à choisir entre l'huile de colza 0,1% émulsionnée dans la gomme de xanthane 0,3% le tout dissout dans de l'eau ou l'eau avec la gomme de xanthane à 0,3% seule. La période de choix a duré 12 heures. La consommation d'eau a été déterminée en pesant les biberons.

2.2.3. Résultats

2.2.3.1. L'acide linoléique induit une augmentation de [Ca]i et active les PLA_2

Il semblerait que les cellules réceptrices du goût soient très bien équipées pour la régulation des mécanismes déclenchés lors de l'ingestion des aliments gras. L'un des évènements précoces de cette signalisation est l'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire. Nous avons montré que la fixation de l'acide linoléique, un acide gras à longue chaîne (nombre de carbone supérieur ou égal à 14) entraîne une augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules CD36 positives purifiées à partir de la papille caliciforme de souris (Figure39). Nous avons aussi utilisé la thapsigargine, (extraite de *Thapsia garganica*), un inhibiteur de la pompe Ca^{2+} ATPase respomsable de la réentrée du calcium dans le réticulum endoplasmique. Son inhibition mobilise le calcium dans le milieu intracellulaire.

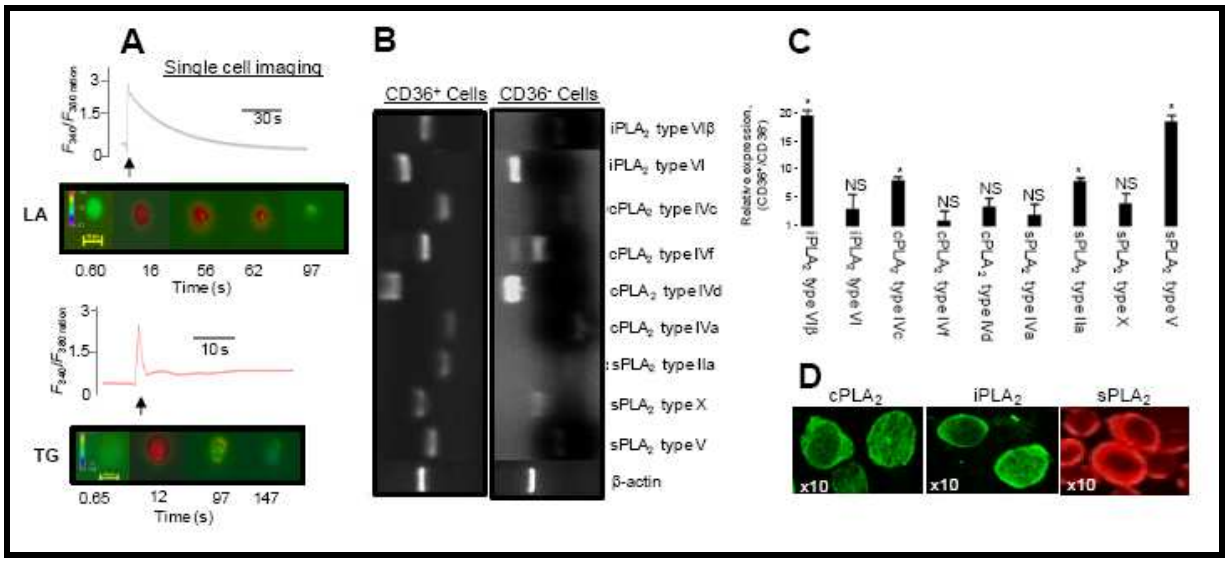

Figure39: Signalisation calcique et expression des différents isotypes de PLA_2 des cellules CD36-positives. Les cellules CD36 positives et négatives sont isolées suivant des digestions enzymatiques puis purifiées sur une colonne Miltenyi en présence d'anticorps couplés à des billes magnétiques. **A** : Action de l'acide linoléique et de la thapsigargine. Les cellules ont été incubées en présence de la sonde Fura-2/AM. Une imagerie calcique a été ensuite réalisée sous microscope. Le graphe présente l'évolution du ratio des émissions à 340 et 380 nm et l'image, des photographies d'une cellule montrant l'augmentation du calcium intracellulaire. **C :** L'ARN total extrait a été analysé par RT-qPCR, **B :** les échantillons ont ensuite été déposés sur gel d'agarose et observés sous UV. **D :** Les différents types de PLA2 ont aussi été visualisés sous microscope confocal en présence des anticorps adéquats.

Dans le but de rechercher les enzymes impliquées dans la détection des acides gras, nous avons recherché l'expression des phospholipases A_2. Les phospholipases A_2 (PLA_2) peuvent avoir une action calcium dépendante ou calcium indépendante ($iPLA_2$). Lorsque l'action des PLA_2 est dépendante du calcium, on distingue les cytosoliques ($cPLA_2$) et les PLA_2 secrétés ($sPLA_2$).Nous avons observé sous microscope confocal, puis montré par RT-qPCR que les cellules CD36 positives expriment tous les trois types de PLA_2 (Figure40).

Nous avons étudié l'activité enzymatique des différents types de PLA_2 dans les cellules CD36 positives de bourgeons du goût (Figure40). La mesure de l'activité des PLA_2 à l'aide du kit CAYMAN a montré que l'augmentation d'activité en présence d'acide linoléique est inhibée par le SSO (sulfo-succynidyl-oléate), un inhibiteur de CD36, pour $cPLA_2$, $sPLA_2$ et $iPLA_2$. L'acide linoléique induit donc l'activation des PLA_2 via le CD36.

Nous avons tenté de mettre en évidence la fonctionnalité des PLA_2. Nous avons mesuré la libération de l'acide arachidonique tritié (Figure43). L'addition d'acide linoléique potentialise la libération d'acide arachidonique de manière similaire à la thapsigargine. La thapsigargine (TG), induit une augmentation du calcium intracellulaire par inhibition de la ‘‘pompe ATPasique’’ du réticulum endoplasmique.

La libération d'acide arachidonique est effectuée par l'augmentation du calcium intracellulaire. L'addition des inhibiteurs des différents isoformes de PLA_2 atténue cette libération.

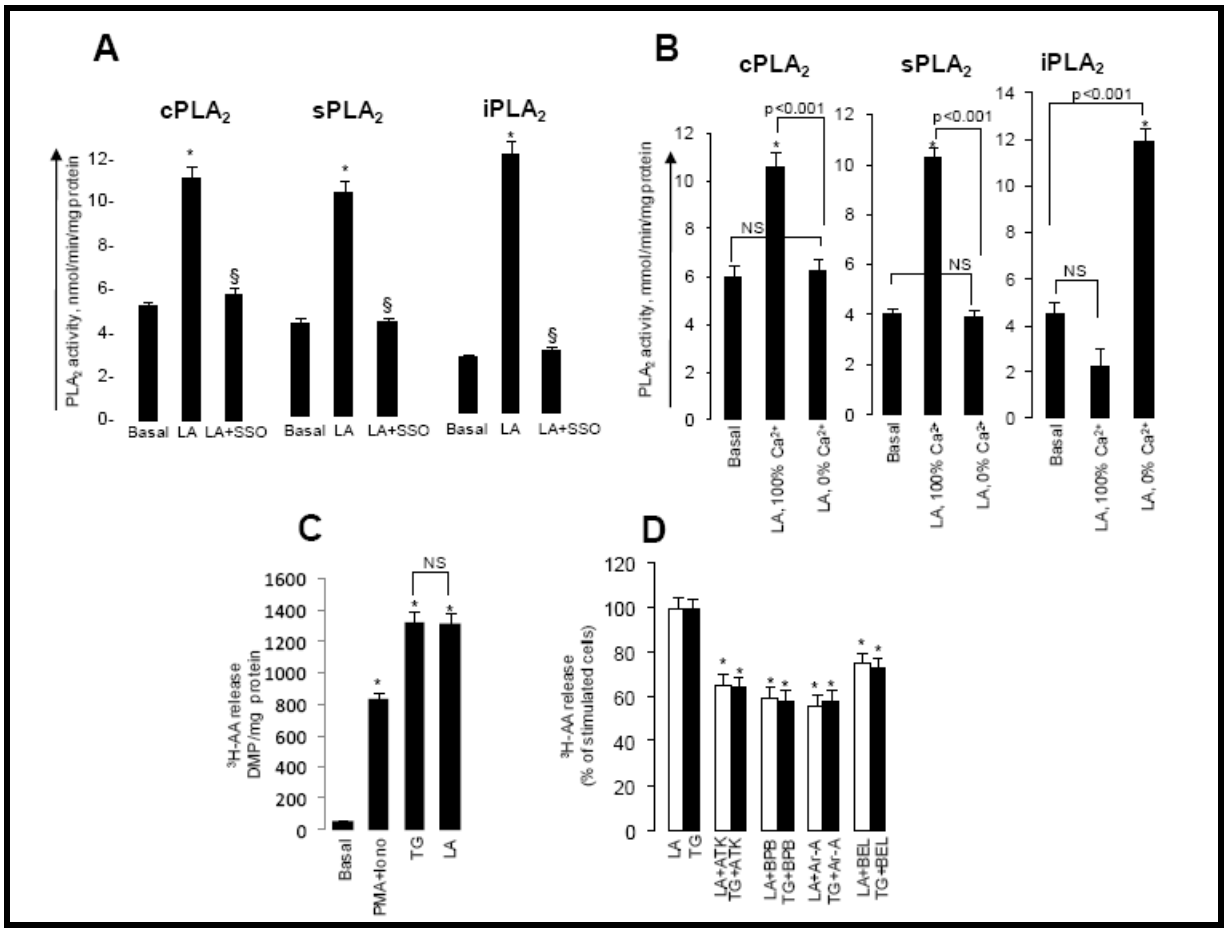

Figure40: Activité enzymatique des différents types de PLA_2 et mesure de la libération d'acide arachidonique tritié. A,B :L'activité des différents types de PLA2 a été mesurée suivant le protocole du kit. L'activité est exprimée en µmol/min/ml. C : Les cellules CD36 positives ont été marquées avec l'acide arachidonique tritié puis traitées par les différents substrats avant lecture. D : La mesure de la libération d'[AA]-^3H a été faite en présence d'au moins un inhibiteur des deux autres types de PLA2. Les résultats sont exprimés en pourcentage de stimulation par TG (100%) (* $p< 0.001$).

2.2.3.2. L'acide arachidonique (AA) libéré par les PLA_2 induit l'influx SOC (Stored Operated Calcium Channel)

Etant donné que l'inhibition des PLA_2 atténue l'augmentation induite par les deux agents LA et TG, nous avons utilisé par la suite la thapsigargine pour mobiliser le calcium du RE et étudier l'influx calcique suivant un protocole CFCR. Ainsi, en absence de calcium, l'adition de Thapsigargine induit une petite augmentation de calcium. L'augmentation du calcium intracellulaire est potentialisée par l'Acide arachidonique de façon dose dépendante après addition de calcium dans la cuve de mesure (Figure41A).

Il s'agit de l'influx calcique appelé SOC qui permet le remplissage des réserves du réticulum endoplasmique (RE). Il est à noter que cette augmentation est indépendante de la voie des cyclo-oxygénases et celle des lipido-oxygénases. L'addition des inhibiteurs de ces deux voies ne modifie pas l'induction de calcium.

Nous avons cherché à savoir si l'acide arachidonique endogène est libéré par la TG. Nous avons utilisé les différents inhibiteurs de PLA_2 dans la phase d'ouverture des canaux calciques et montré qu'ils atténuent l'augmentation du calcium intracellulaire induite par la TG (Figure41B).

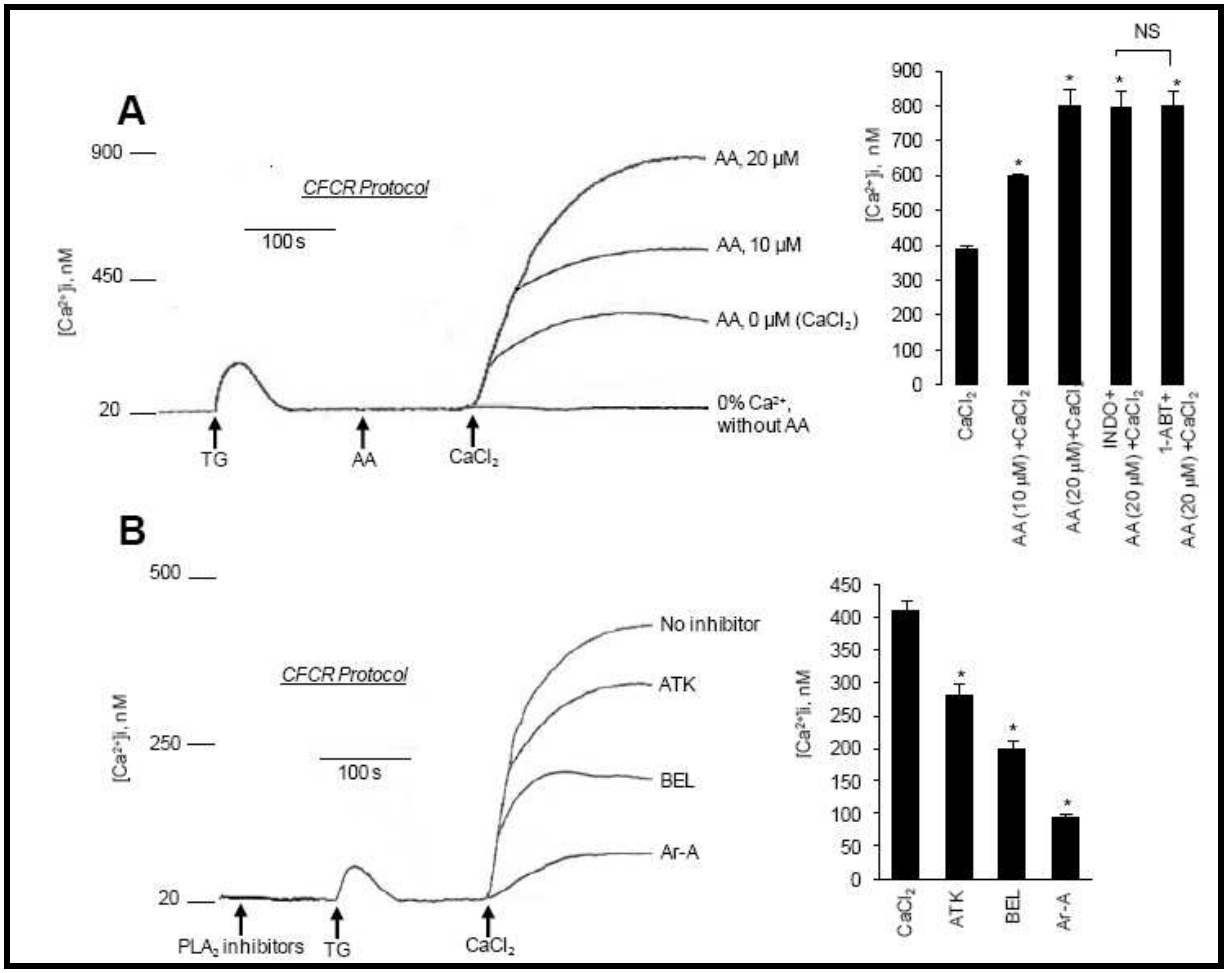

Figure41: Action des inhibiteurs de PLA_2 sur le calcium intracellulaire.
Les cellules ont été traitées par la sonde Fura-2/AM. Puis à l'aide d'un spectrofluoromètre, le ratio des émissions à 240 et 280 nm a été mesuré après traitement des cellules par Indomethacin et 1-aminobenzotriazole (1-ABT) à 10 µM avec AA.

2.2.3.3. L'acide arachidonique et la Lyso Phosphatidyl-choline ont un effet additif sur l'influx calcique

Dans un milieu pauvre en calcium (0% calcium) l'addition de Lyso-PC ne provoque aucune augmentation de calcium intracellulaire. Toutefois, l'addition de calcium ($CaCL_2$) induit un influx calcique dans les cellules CD36 positives de bourgeons du goût (Figure42A). L'addition de Lyso PC et d'acide arachidonique l'un après l'autre, évoque une réponse additive quant à l'induction du calcium intracellulaire (Figure42B). L'utilisation de PLAP (PLA2-activating peptide) pour enrichir la membrane plasmique des cellules gustatives en

lyso-phospholipides, a induit une augmentation du calcium intracellulaire. Par ailleurs le 2APB (2-aminoethoxy-diphenyl-borate), un inhibiteur des canaux SOC a significativement diminué les réponses obtenues par lyso-PC et PLAP (Figure42D).

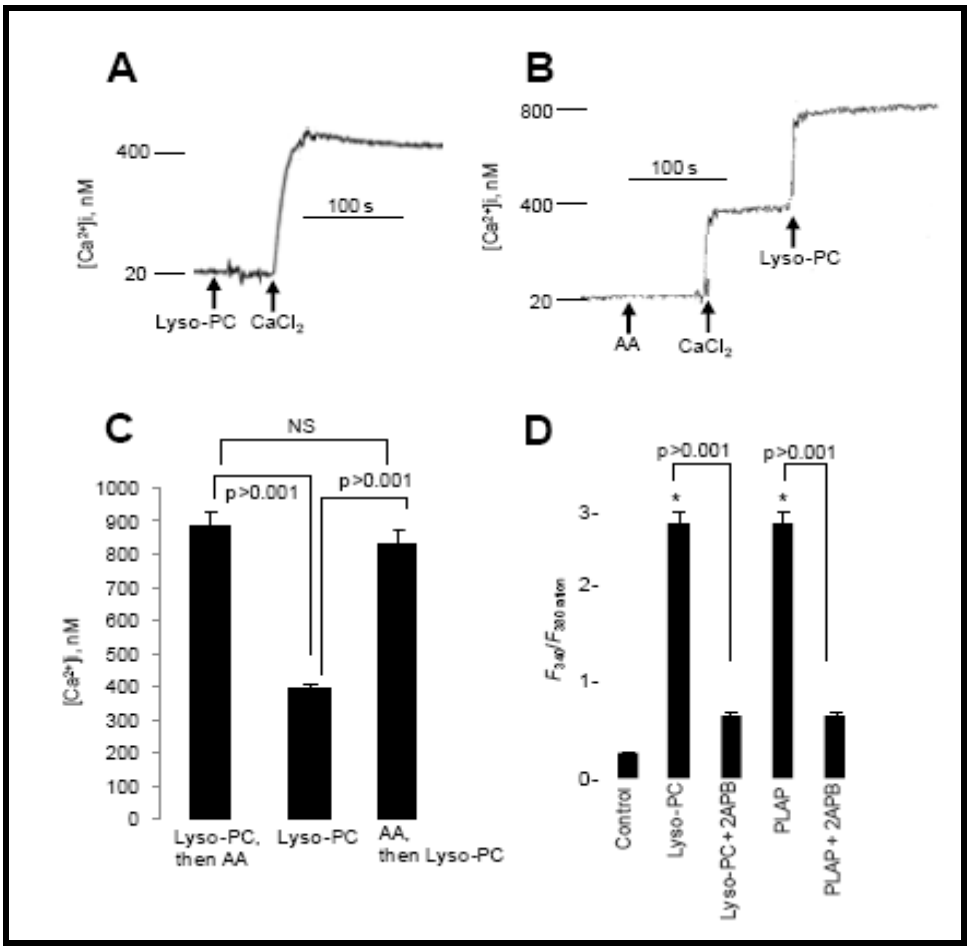

Figure42: Action de Lyso-PC, PLAP et AA sur la signalisation calcique des cellules CD36-positives
Les cellules gustatives CD36 positives (2.106) ont été incubées dans la sonde FURA 2/AM. **A,B :** Les expériences ont été réalisées dans un milieu 0% calcium. Les flèches indiquent l'addition de CaCl2 (1.5 mM) et de Lyso-PC (5 µM), **D** : en présence ou en absence de 2-APB (30 µM), de PLAP (5 µg/ml).

2.2.3.4. L'acide linoléique induit la production de CIF (Calcium Influx factor)

Le CIF a été extrait à partir des cellules gustatives CD36 positives traitées avec l'acide linoléique. Le CIF extrait a induit autant que TG une augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules CD36 positives de bourgeon du goût (Figure43A).

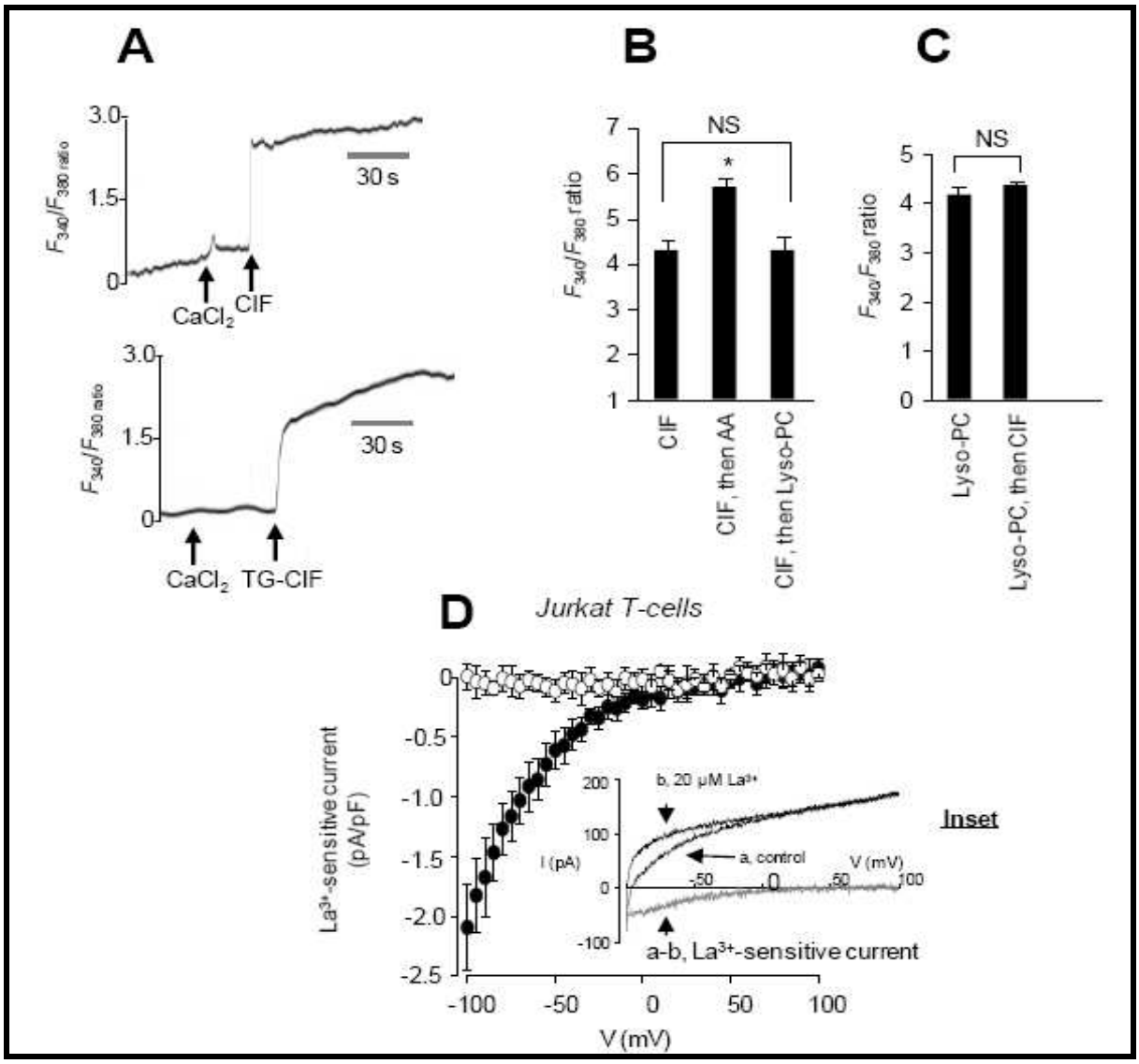

Figure43: Action de CIF, AA et Lyso-PC sur le calcium intracellulaire des cellules CD36-positives

A : CIF a été purifiée à partir de traitée par LA (CIF) ou TG (TG-CIF). Les flèches indiquent lorsque les molécules de test, $CaCl_2$ (1,5 mM) et CIF (50 µl) ou CIF-TG (50 µl), ont été ajoutés. L'action additive de CIF a été étudiée en présence d'AA (**B**) et lyso-PC (C). **D**: activation de courant sensible à La^{3+} par CIF dans Jurkat T-cellules. Moyenne La^{3+} sensibles à la densité de courant-tension des relations enregistrées en l'absence (○, n = 7) ou la présence (●, n = 9) de CIF inclus dans la solution de pipette (dilution 1:15). Les courants appliqués de -100 à 100 mV, dans des cellules T Jurkat avec CIF dialysée en pipette contenant en l'absence (a) ou de la présence (b) de 20 µM de La^{3+}.

2.2.3.5. Les canaux Orai1 et orai3 sont impliqués dans la signalisation calcique des cellules gustatives lipidiques

La technique de RT-PCR a permis de montrer que les cellules gustatives CD36 positives expriment les ARNm des canaux SOC Orai1 et Orai3 (Figure14A). Ces cellules expriment aussi l'ARNm de STIM1, impliqué dans la déplétion des réserves calciques. La transfection de ces cellules par siRNA réduit l'expression de ces protéines, comme le montrent les résultats de western blot (Figure 44A/B).

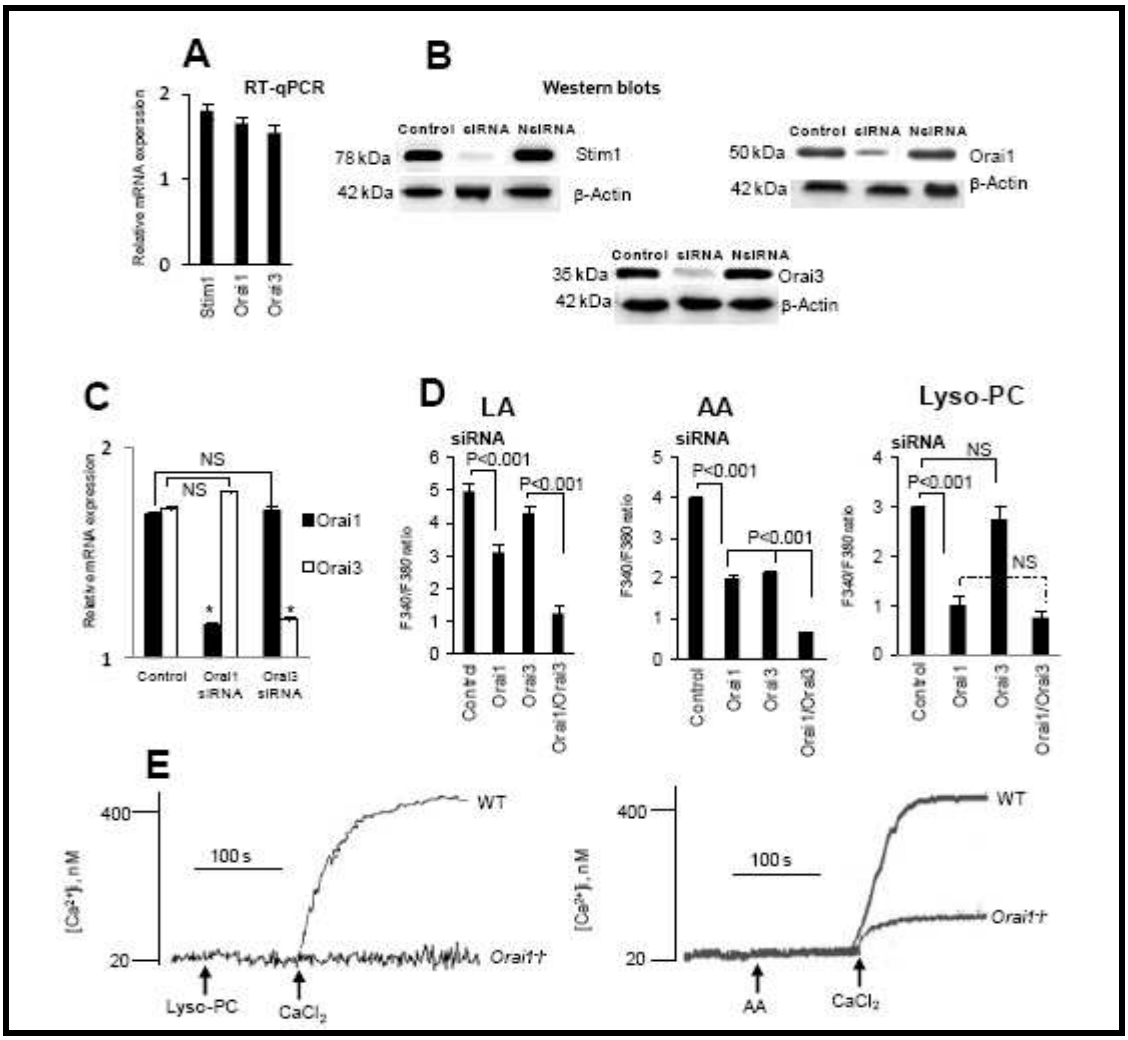

Figure44: Expression et implication de STIM1 dans la signalisation calcique des cellules CD36-positives
A: représente l'expression de l'ARNm de STIM1, Orai1 et Orai3. **B**: montre la détection de protéines STIM1, Orai1 ou Orai3 par Western blot dans les cellules transfectées par soit l'ARN (contrôle) ou par les siRNA de STIM1, Orai1 ou Orai3. **C:** représente l'expression de l'ARNm d'Orai1 et Orai3 dans les cellules CD36-positives transfectées avec siARN Orai1 ou Orai3. NsiRNA = non-ciblage siRNA **D**: Imagerie calcique effectuée sur une cellule CD36-positive, transfectées soit avec Orai1 siRNA ou siARN Orai3 ou par les deux. Les changements du calcium intracellulaire ont été suivis sous le microscope Nikon (TIU) à l'aide d'objectifs S-fluor 40x à immersion d'huile. Les histogrammes montrent les résultats, obtenus à partir des traces, en moyenne ± SEM (n = 7). **E :** Effet de lyso-PC, (5 uM) et AA (10 uM) sur les augmentations de $[Ca^{2+}]i$ dans CD36-positives, de souris sauvages (WT) ou $Orai1^{-/-}$. Les expériences ont été réalisées dans le spectrofluorimètre PTI.

L'augmentation de calcium induite par l'acide linoléique dans les cellules gustatives CD36 positives est réduite dans les cellules transfectées par les siRNA de STIM1, Orai1 et Orai3. Cette réponse est davantage réduite lorsque les cellules sont transfectées avec à la fois les siRNA d'Orai1 et Orai3 La réponse de Lyso-PC sur le calcium intracellulaire est seulement diminuée dans les cellules tranfectées avec Orai1 (Figure 44D).

Des expériences effectuées sur des cellules gustatives CD36 positives issues de souris *Orai1*$^{-/-}$ ont montré que l'augmentation de calcium provoquée par Lyso-PC a été supprimée. L'augmentation provoquée par l'acide arachidonique a quant a elle été réduite (Figure44E).

2.2.3.6. CIF régule l'activité des iPLA$_2$

Nous avons étudié le rôle de CIF dans l'activation de l'influx ca lcique dans les cellules gustatives CD36 positives. Smani et ses collaborateurs (Smani *et al.* 2004) ont montré que CIF active l'activité d'iPLA2. Nous avons observé que CIF extrait après stimulation avec l'acide linoléique n'a aucun effet sur l'activité enzymatique de sPLA$_2$ et c PLA$_2$, alors qu'il augmente significativement l'activité de iPLA$_2$ (Figure45A).

D'après le modèle de Smani *et al.* (2004), la calmidazalium (CMZ), un antagoniste de la calmoduline se fixe de façon spécifique à la calmoduline et dissocie iPLA$_2$ pour permettre l'activation enzymatique. CMZ et BAPTA (chélateur du calcium intracellulaire) augmentent l'activité d'iPLA2 dans les cellules de bourgeon du goût CD36 positives (Figure45B).

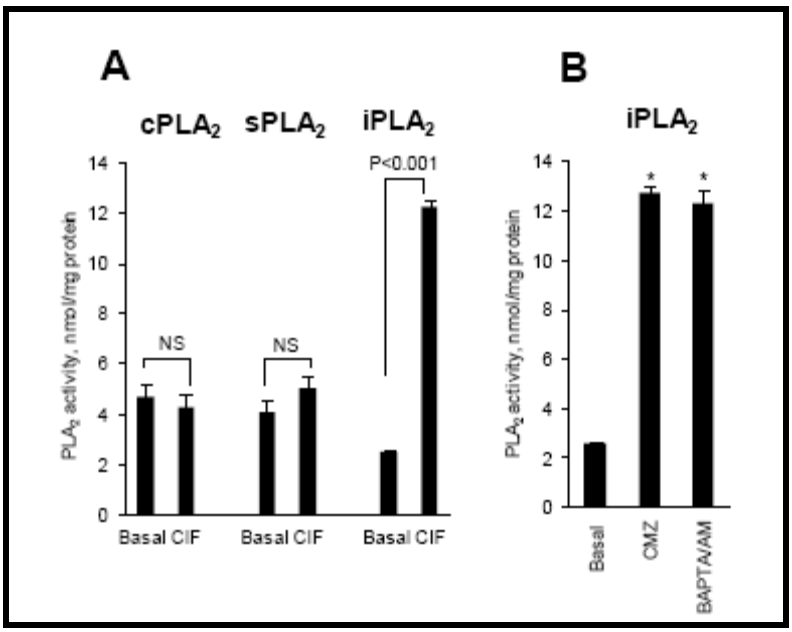

Figure45: Effet de CIF, CMZ et BAPTA sur l'activité enzymatique des PLA2 dans les cellules gustatives CD36 positives. A: Les cellules CD36-positives (3x10^6) ont été traitées. Les extraits de CIF ont été purifiées et été utilisés à 50 µl. B: montre des cellules qui ont été pré-incubées pendant 15 min dans la présence ou l'absence des agents suivants: CMZ (3 µM) ou BAPTA/AM (10 µM). Les histogrammes montrent les résultats en moyenne ± SEM (n = 7). * indique les différences significatives par rapport aux valeurs initiales (p <0,001).

2.2.3.7. STIM1 est indispensable pour la signalisation calcique

STIM1 joue un rôle primordial dans la régulation de la signalisation calcique (Lewis *et al.* 2007). Pour explorer le rôle de STIM1 dans la signalisation calcique induite par les acides gras polyinsaturés, des cellules CD36 positives de bourgeon du goût ont été purifiées chez des

souris de type sauvage (WT) et des souris STIM1$^{-/-}$. L'acide linoléique et la thapsigargine ont provoqué des augmentations transitoires de calcium intracellulaire chez les souris WT, mais ces augmentations étaient significativement diminuées chez les souris STIM1$^{-/-}$ (Figure46A). Nous avons aussi observé que les augmentations de calcium intracellulaire induites par CIF étaient significativement faibles dans les cellules gustatives CD36 positives extraites chez les souris STIM1$^{-/-}$ comparativement aux souris WT (Figure46B). CIF extrait chez les souris STIM1$^{-/-}$ n'a produit aucune augmentation du signal calcique sur les mêmes cellules (Figure46A). Sans surprise, les augmentations de calcium intracellulaire induites par l'acide arachidonique (Figure46C) et LysoPC (Figure46D) étaient aussi plus faibles dans les cellules de bourgeons du goût extraites chez les souris STIM1$^{-/-}$ comparativement aux souris WT.

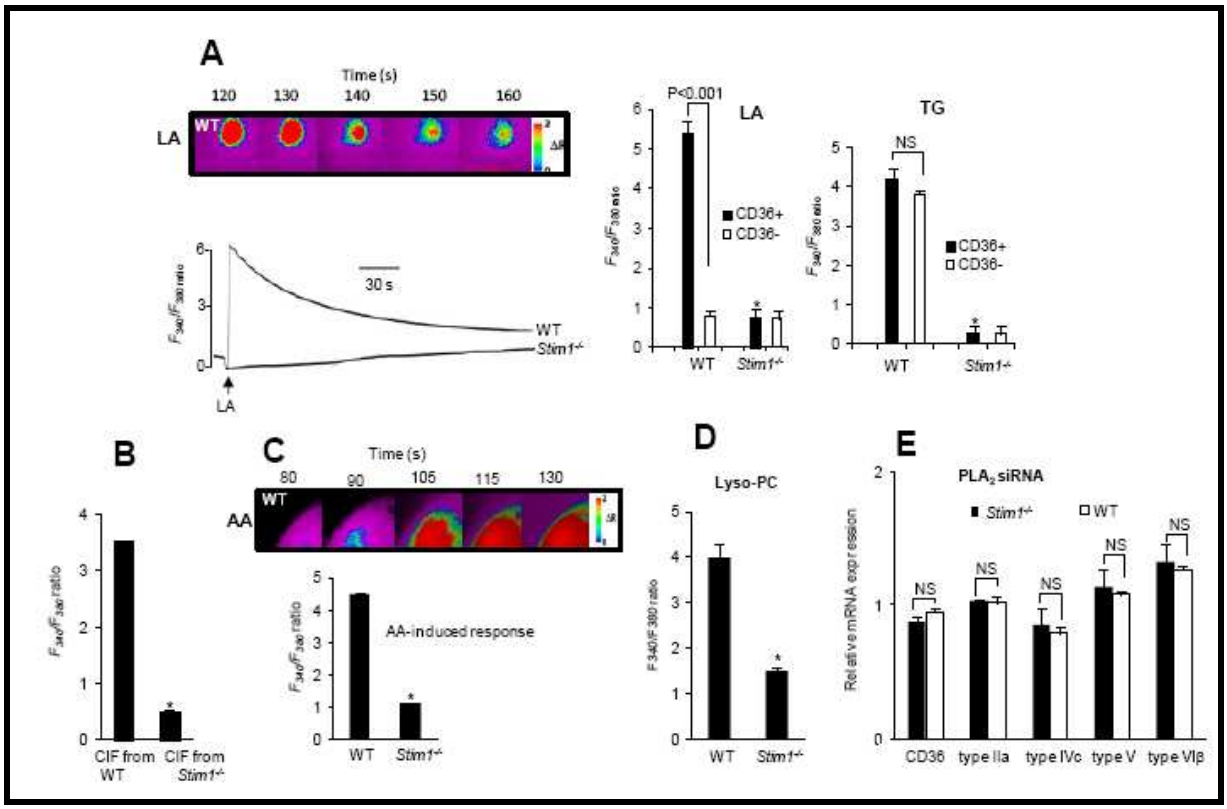

Figure46: Effet de la déficience de STIM1 sur la signalisation calcique

Des études d'imagerie calcique ont été effectuées sur les cellules CD36-positives, isolé de type sauvage (WT) ou Stim1$^{-/-}$ souris. Les changements de Fura340/Fura380 ont été suivis sous le microscope Nikon (TIU) à l'aide d'objectifs S-fluor 40x à immersion d'huile. **A**: montre les effets de LA (20 µM) et TG (5 µM) dans cellules CD36-positive ou négative CD36-. **B**: indique l'effet de CIF, extrait de LA stimulée par TBC, isolé de type sauvage ou Stim1-/ - souris (donc, qualifié de CIF / Stim1-/ -), le Ca 2 + de signalisation. **C et D**: montreent les effets de AA (10 µM) et lyso-PC (5 µM), respectivement, sur les augmentations de [Ca $^{2+}$]i. Les données de A à D représentent la moyenne ± SEM (n = 7). * indique des différences significatives par rapport à TBC, isolé à partir de souris de type sauvage (WT) (p <0,001). **E:** représente l'expression de l'ARNm codant pour CD36 et différents isotypes de PLA2 chez les souris WT et Stim1$^{-/-}$ CD36-positives. Les données représentent la moyenne ± SEM (n = 6). En **A** et **C**, le « time-lapse » des augmentations de [Ca 2 +] i ont été enregistrés dans les cellules CD36-positivesde type sauvage (WT).

2.2.3.8. Diminution de la préférence spontanée des lipides chez les souris Stim1$^{-/-}$

A partir des résultats précédents, on peut supposer que STIM1 joue un rôle primordial dans la perception gustative des lipides. Pour vérifier cette hypothèse, des souris *STIM1*$^{-/-}$ et WT ont été soumises à un test de préférence à double choix. Comme prévu, les souris WT ont montré une forte préférence pour la solution enrichie en huile de colza (0,1%), plutôt qu'une solution de Xantahane (0,3%) (Figure47A). Par contre, cette préférence a été significativement plus faible chez les souris *STIM1*$^{-/-}$ (Figure47A). Nous avons observé que les souris STIM1$^{-/-}$ développaient une splénomégalie. Nous avons alors induit la splénomégalie chez des souris sauvage par injection intrapéritonéale de chlorure de cadmium (Pathak et Khandelwal, 2009). Puis nous avons réalisé le test de préférence lipidique chez ces souris (Figure47B). Nous avons aussi mesuré la libération de sérotonine dans des cellules CD26-positives extraites chez des souris STIM1 $^{-/-}$ comparativement à des souris normales (Figure 47C).

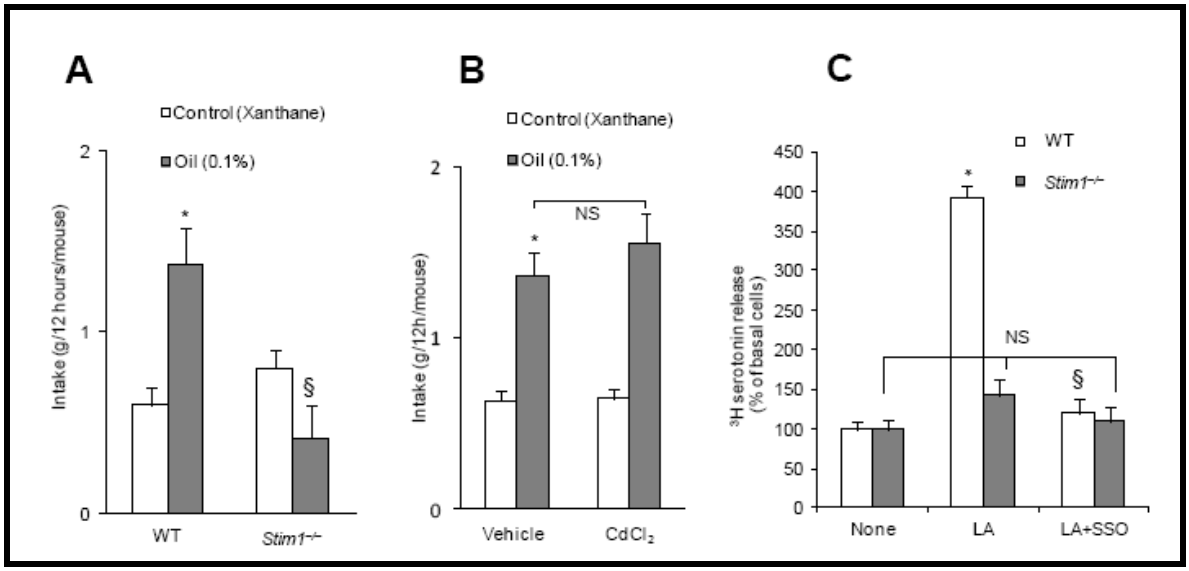

Figure47: Effet de l'invalidation du gène STIM1 et une splénomégalie sur la préférence gustative pour les lipides. A: les souris de type sauvage et Stim1$^{-/-}$ ont été soumises à 12 heures test de préférence à 2 bouteilles. La gomme de xanthane (0,3%) a été utilisée pour émulsionner l'huile de colza (0,1%) dans l'eau et à imiter la texture des lipides. * indique les différences significatives par rapport à la solution de contrôle ($p < 0,001$) chez les animaux WT. § montre des différences importantes entre l'huile et l'huile nourri WT-nourris Stim1-/ - souris ($p < 0,001$). B: splénomégalie a été induite par l'administration intrapéritonéale de CdCl2 aux souris soumises à 12 heures de test de préférence de 2 bouteilles. * indique les différences significatives par rapport à la solution de contrôle ($p < 0,001$) dans le véhicule-administrés animaux. Les données représentent la moyenne ± SEM (n = 6). C: montre la libération de ^{3}H-sérotonine dans le milieu extracellulaire en présence de LA avec ou sans SSO de cellules CD36-positive, isolées chez des souris de type sauvage (WT) ou des souris Stim1$^{-/-}$. * indique les différences significatives par rapport au contrôle ($p < 0,001$) chez les animaux WT. § montre des différences importantes entre LA et LA plus **des** cellules traitées par SSO ($p < 0,001$) dans les cellules CD36-positives isolées chez les animaux WT. Les données représentent la moyenne ± SEM (n = 7).

3. <u>Travaux non publiés</u> : L'acide docosahexaenoique (DHA) induit-il la signalisation calcique dans les cellules gustatives indépendamment de CD36 ?

Nous avons observé que le DHA induit une augmentation de calcium intracellulaire dans les cellules gustatives extraites de papilles caliciformes de souris. Nous avons cherché à savoir si l'action de DHA était via une voie similaire à celle de l'acide linoléique.

Après avoir observé l'augmentation de calcium dans les cellules gustatives, nous avons vérifié si cette augmentation sollicite la voie des PLC comme dans l'activation induite par l'acide linoléique (El Yassimi *et al*., 2008). Ensuite, nous avons recherché les phospholipases A2 qui seraient impliquée dans ce mécanisme, après avoir testé le rôle du lipido-récepteur CD36. Toutes les expériences de cette étude ont été conduites sur des cellules gustatives extraites de papilles caliciformes de souris. Le matériel et les méthodes utilisés sont comme décrits dans les travaux publiés (Dramane *et al*. 2012)

3.1. DHA induit une augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules gustatives:

Nous avons étudié le calcium intracellulaire à l'aide d'une technique d'imagerie caclique. Sachant que les acides gras polyinsaturés sont impliqués dans la signalisation des cellules gustatives, nous avons recherché et observé que le DHA, et de façon moins significative, l'EPA induisent une augmentation rapide du calcium intracellulaire dans les cellules CD36 positives extraites des papilles caliciformes (Figure48). Ayant observé que le DHA a une action plus significative que l'EPA, nous avons choisi d'étudier l'action du DHA sur la signalisation des cellules gustatives lipidiques.

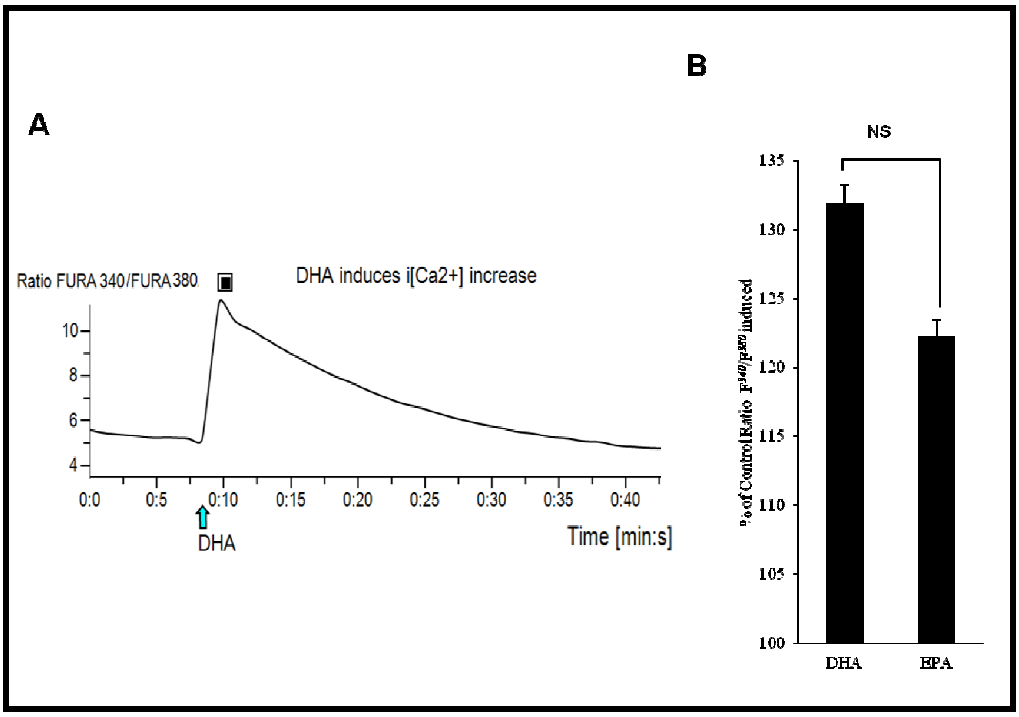

Figure48: DHA augmente le calcium intracellulaire dans les cellules gustatives. Les AGPI de la famille *n*-3, DHA et EPA, induisent une augmentation du calcium intracellulaire dans un milieu extracellulaire riche en calcium (1200±50 nM dans un milieu riche en Ca^{2+} buffer contre 300±20 nM dans un milieu contenant 0% Ca^{2+}, p>0.001). La flèche indique le moment ou DHA (ou EPA) est additionné dans le milieu extracellulaire.

3.2. DHA n'induit pas l'augmentation du calcium intracellulaire via CD36

Nous avons observé une augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules gustatives CD36-positives. Nous avons néanmoins cherché à nous assurer que cette activation était bien CD36 dépendante. Alors nous avons utilisé l'inhibiteur de CD36, le sulfo-N-succinimidyl-oleate (SSO). Les cellules CD36 positives ont été pré incubées avec SSO à 50µM pendant 10 minutes. Nous avons observé que l'inhibition par SSO n'affecte pas l'augmentation du calcium intracellulaire par DHA (Figure49).

L'absence de l'implication de CD36 dans l'induction du calcium intracellulaire par le DHA devra être confirmée par l'utilisation d'outils siRNA, notamment les siRNACD36.

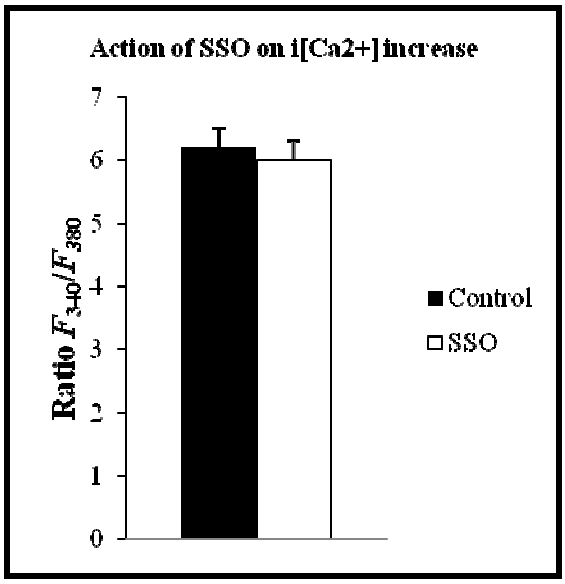

Figure49: L'action de SSO sur l'augmentation [Ca2+]i par DHA. Les cellules CD36 positives ont été pré incubées avec 50µM de SSO pendant 10 minutes. L'addition de DHA pendant l'imagerie calcique a induit indifféremment l'augmentation du $[Ca^{2+}]i$ dans les cellules inhibées par SSO et les cellules non traitées.

3.3. DHA recrute le calcium intracellulaire via l'activation de la voie des PLC et via l'influx SOC.

Pour montrer l'implication des canaux SOC dans cette signalisation calcique, nous avons utilisé 2-aminoethoxy-diphenyl-borate (2-APB), un inhibiteur des canaux SOC. Après l'addition de 2-APB, l'augmentation de calcium intracellulaire induite par DHA est significativement réduite (Figure50A). La pré incubation des cellules CD26 positives par un inhibiteur de la phospholipase C, U73122,a significativement réduit aussi l'augmentation du calcium intracellulaire (Figure50B). Nous avons aussi utilisé un kit pour mesurer la production d'inositol triphosphate induite par l'addition de DHA sur les cellules gustatives lipidiques (Figure50C). Ces résultats indiquent clairement que le DHA augmente le calcium intracellulaire dans les cellules gustatives en mobilisant les réserves calciques grâce à la PLC, mais sollicite aussi les canaux SOC.

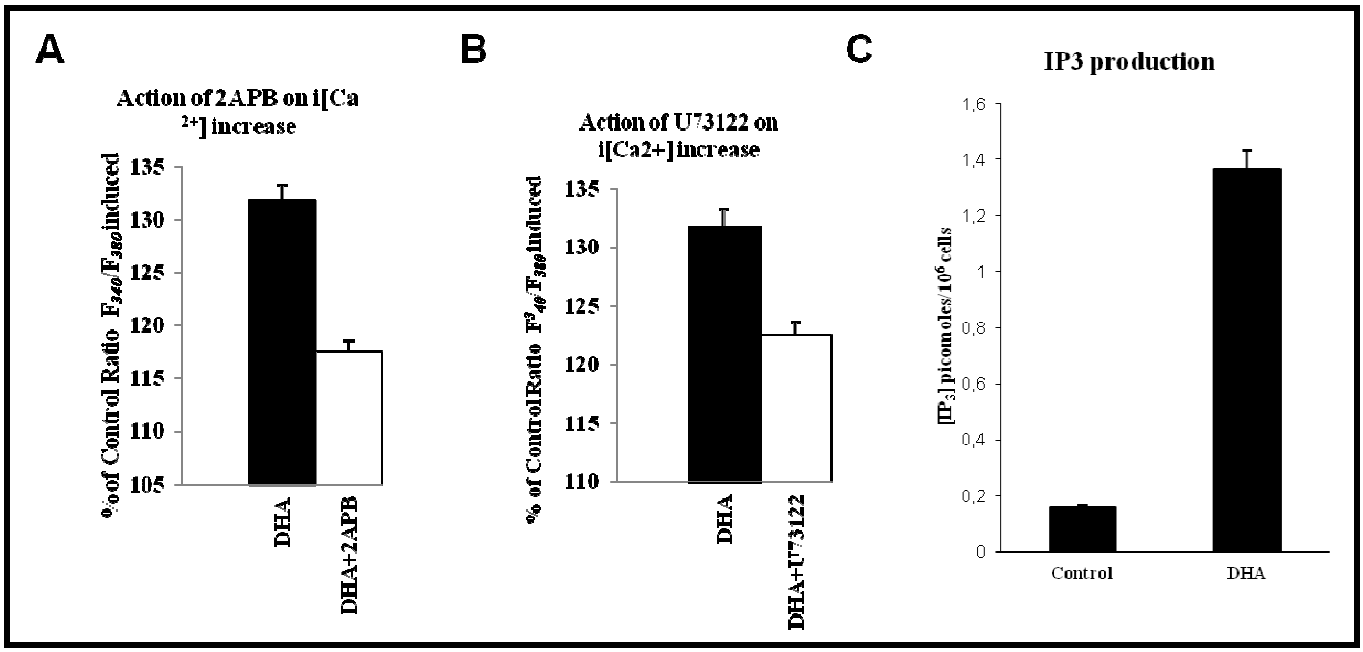

Figure50: L'action de 2-APB et d'U73122 sur l'augmentation de calcium intracellulaire induite par DHA. Les cellules gustatives ont été pré incubées avec 30µM de 2-APB (A) et 3µM d'U73122 (B) avant l'addition de DHA au cours de l'imagerie calcique. Ces deux molécules ont significativement diminué le calcium induit par l'addition de DHA. La production d'IP_3 par les cellules traitées avec DHA a été mesurée à l'aide du kit [^{3}H]-Biotrak Assay (C). *n*=3 et p>0.001.

3.4. PLA_2 GIVc est impliquée dans le calcium induit par le DHA :

Nous avions observé que les cellules gustatives CD36 positives expriment les différents types de PLA_2, les $sPLA_2$, $cPLA_2$ and $iPLA_2$. Les cellules ont été incubées par [^{3}H]-DHA, pour mesurer la libération de cet acide gras (Figure51A). Pour étudier les isoformes de PLA_2 impliquées dans, nous avons utilisé des inhibiteurs. L'acide aristolochic (Ara-A) inhibe $sPLA_2$ (type IIa/type V) et l'arachidonyl trifluoromethyl ketone (ATK) et le bromoenol lactone (BEL) sont respectivement des inhibiteurs des types IV $cPLA_2$ and type VI $iPLA_2$ (Kudo *et al*. 2002).

L'ordre de l'action inhibitrice des inhibiteurs a été *ATK* > *Ar-A* > BEL avec l'addition de DHA. L'utilisation des siRNA PLA_2 a confirmé l'implication du type IV de $cPLA_2$, précisément, la PLA_2 GIVC (Figure51B). En effét l'ordre d'inhibition des *si*RNA PLA_2 a été le suivant après l'addition de DHA: Type IVc>typeVI>typeV>typeIIa.

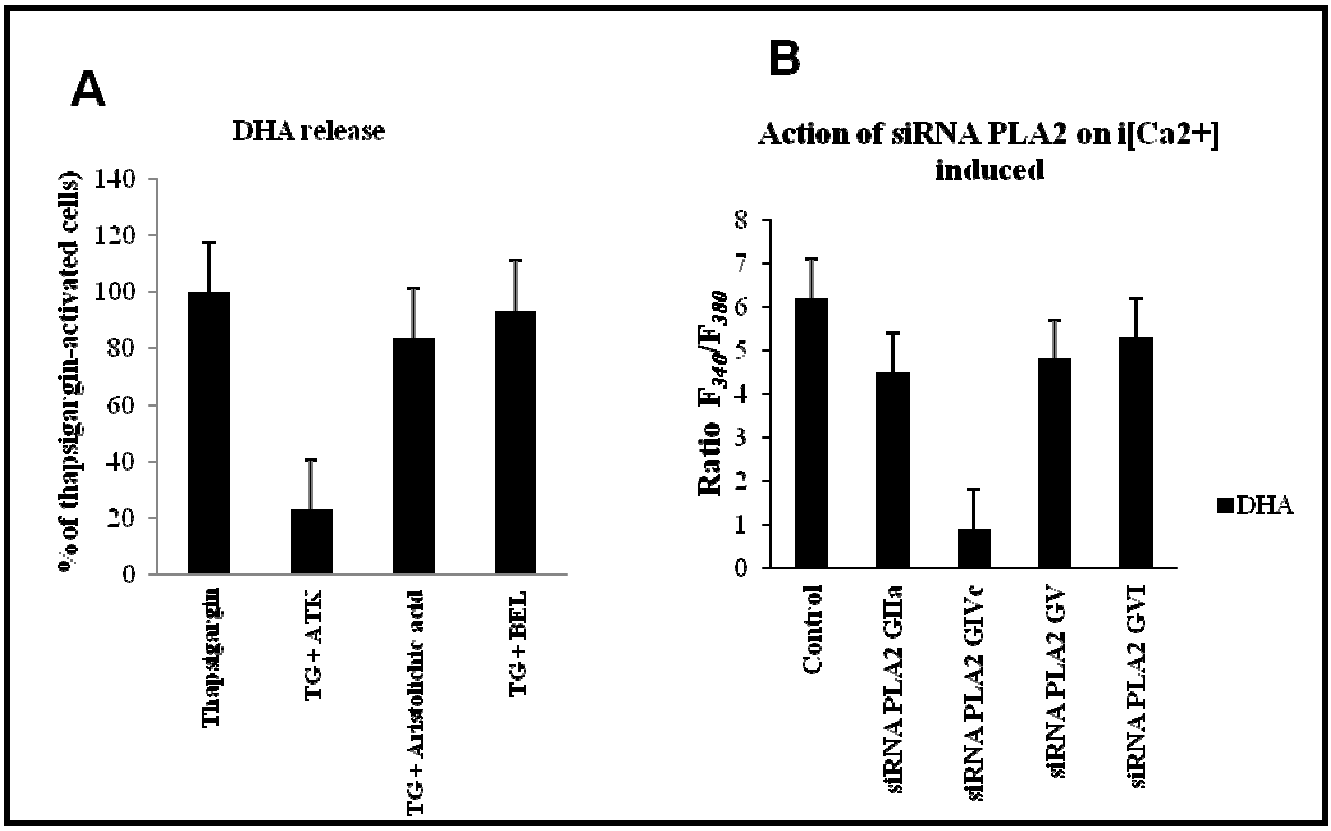

Figure51: La libération de [3H]-DHA par les cellules gustatives et l'action des siRNA PLA2 sur le calcium induit. Les cellules ont été incubées par [^{3}H]-DHA (A) pour mesurer la libération de DHA. Des inhibiteurs respectifs ont été utilisés avant la mesure. Le type IV des $cPLA_2$ est le plus significativement impliqué dans cette libération.

3.5. STIM1 joue un rôle dans l'influx calcique induit par le DHA

Pour explorer l'implication de STIM1 dans le calcium induit par l'addition de DHA sur les cellules CD36 positives, nous avons utilisé des cellules de souris Stim1$^{-/-}$. Dans ces cellules, le calcium induit est significativement diminué par rapport aux cellules normales (Figure52).

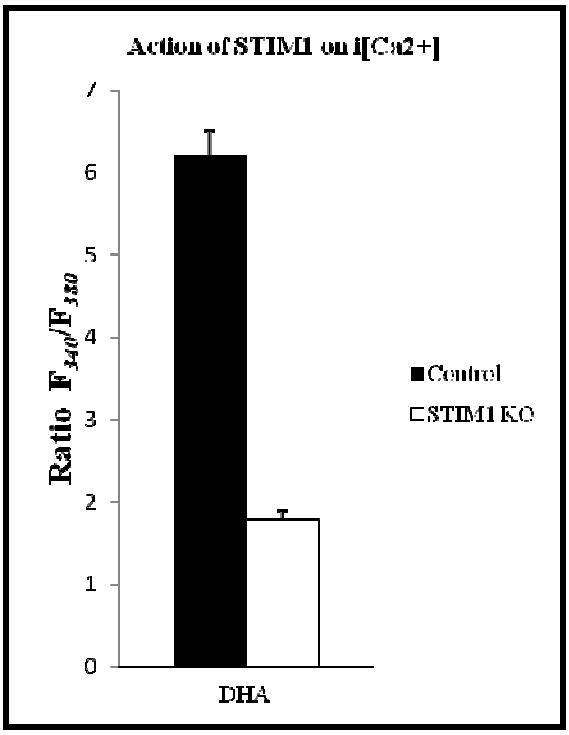

Figure52: Le rôle de STIM1 dans la signalization calcique induite par DHA. Dans les cellules gustatives isolées chez des souris Stim1$^{-/-}$, nous avons observé un baisse du calcium induit par le DHA.

3.6. La signalisation calcique des cellules gustatives induite par le DHA

Nos résultats ont montré que le DHA induit une augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules gustatives de souris. Nous avons observé que la signalisation induite est différente de celle induite par l'acide linoléique via le FAT/CD36. Le DHA est libéré à partir des phospholipases membranaires par PLA_2 GIVC. Notre hypothèse est que le DHA active des récepteurs couplés à la protéine G afin d'impliquer la voie des PLC. Cette voie permet l'activation des récepteurs à l'IP_3 de la membrane du réticulum endoplasmique, par la production d'IP_3. L'influx calcique induit par l'activation des canaux SOC permettrait une libération des neuromédiateurs excitateurs des fibres nerveuses afférentes.

4. Liste des communications :

4.1. G. Dramane, N. A. Khan, K. Moutairou, S. Akpona ; *Acides gras et Obésité* ; Congrès « Santé et Société » ; Septembre 2010 ; Dar Es Salaam, Tanzanie.

Résumé : La surconsommation d'aliments gras est responsable de nombreuses pathologies telle que l'obésité. Les aliments gras sont détectés par glycoprotéine CD36. Nous avons isolé et purifié des cellules gustatives lipidiques exprimant le CD36. Dans ces cellules, nous avons étudié la transduction du signal déclenché par un acide gras alimentaire (acide linoléique). L'acide linoléique activerait le CD36, responsable de la phosphorylation de protéines tyrosine-kinase qui est couplée à une signalisation calcique et une libération de neuromédiateurs responsables de la perception nerveuse des aliments gras. Ces travaux qui s'inscrivent dans une lutte contre les maladies métaboliques, nous permettent d'envisager la baisse des incidences liées à la consommation excessive des acides gras.

4.2. G. Dramane, N. A. Khan ; *Identification of isoforms of PLA_2 in mouse cd36 positive lipid gustatory cells: implication in calcium signaling*; 9th Congress of the International Society for the Study of Fatty Acids and lipids ; Juin 2010; Maastricht, the Netherlands.

Background / Objective: We have previously demonstrated that the cells expressing CD36, localized apically on the taste buds of mouse lingual circumvallate papillae (CVP), act as lipid gustatory cells. We have also shown that long chain fatty acids (LCFA) induce increases in [Ca2+]i by recruiting calcium from endoplasmic reticulum, followed by calcium influx via opening of store operated calcium (SOC) channels. However, the mechanisms, implicated in the opening of SOC channels are not well-understood.

Procedures: The experiments were performed on CD36-positive cells, isolated from the lingual CVP of the mouse. We detected different isoformes of PLA2 by RT-qPCR. The increases in [Ca2+]i were determined by using Fura-2/AM.

Results: We observed that CD36-positive and CD36-negative cells express different isoforms of sPLA2 (secretory), cPLA2 (calcium-dependent) and iPLA2 (calcium-independent). However, the CD36-positive cells expressed, in high quantities, two isoformes of sPLA2, i.e., type V and type IIa, and one isoforme of iPLA2, i.e., type IV. We incubated cells with [3H]-arachidonate and assessed its release towards the extracellular medium in the presence of a LCFA or other activators like thapsigargin (TG). We observed that TG induced the release of

[3H]-arachidonate in both CD36-negative and CD36-positive cells though the action of these agents was more efficient in the latters. Furthermore, LCFA induced the release of this fatty acid only in CD36-positive cells. By using PLA2 inhibitors in the calcium-free calcium-reintroduction (CFCR), we observed that SOC influx, triggered by TG and LCFA, is inhibited by sPLA2 and iPLA2.

Conclusion: Our results show that lingual CD36-positive cells possess different isoformes of PLA2 which may catalyse the release of free fatty acids into the mouth cavity. Later on, the released free fatty acids acid may be implicated in the modulation of calcium signalling, involved in gustatory perception of lipids, and also in the regulation of other taste modalities.

4.3. Gado Dramane, Anne-Marie Simonin, Aziz Hichami, Simon Akpona, Naim A. Khan; *Three isoforms of PLA_2 modulate calcium signaling in mouse CD36-positive lipid gustatory cells*; VI^{ième} congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique ; Mars 2011, Grenoble, France.

Introduction: We have previously demonstrated that the cells expressing CD36, localized apically on the taste buds of mouse lingual circumvallate papillae (CVP), act as lipid gustatory cells. We have also shown that long chain fatty acids (LCFA) induce increases in [Ca2+]i by recruiting calcium from endoplasmic reticulum, followed by calcium influx via opening of store operated calcium (SOC) channels. However, the mechanisms, implicated in the opening of SOC channels are not well-understood.

Methods: The experiments were performed on CD36-positive cells, isolated from the lingual CVP of the mouse. We detected different isoformes of PLA_2 by RT-qPCR. The increases in $[Ca^{2+}]$i were determined by using Fura-2/AM.

Results: We observed that CD36-positive and CD36-negative cells express different isoformes of $sPLA_2$ (secretory), $cPLA_2$ (calcium-dependent) and $iPLA_2$ (calcium-independent). However, the CD36-positive cells expressed, in high quantities, two isoformes of $sPLA_2$, i.e., type V and type IIa, and one isoforme of $iPLA_2$, i.e., type IV. We incubated cells with [3H]-arachidonate and assessed its release towards the extracellular medium in the presence of a LCFA or other activators like thapsigargin (TG). We observed that TG induced the release of [^{3}H]-arachidonate in both CD36-negative and CD36-positive cells though the action of these agents was more efficient in the latters. Furthermore, LCFA induced the release of this fatty acid only in CD36-positive cells. By using PLA_2 inhibitors in the calcium-

free calcium-reintroduction (CFCR), we observed that SOC influx, triggered by TG and LCFA, is inhibited by $sPLA_2$ and $iPLA_2$.

Conclusion: Our results show that lingual CD36-positive cells possess different isoformes of PLA2 which may catalyse the release of free fatty acids into the mouth cavity. Later on, the released free fatty acids acid may be implicated in the modulation of calcium signalling, involved in gustatory perception of lipids, and also in the regulation of other taste modalities.

4.4. ABDOUL-AZIZE Souleymane, DRAMANE Gado, VÖGTLE Timo, SADOU Hassimi, AKPONA Simon, NIESWANDT Bernhard, BESNARD Philippe and KHAN Akhtar Naim. ***Role of CIF, STIM1 and Orai1 in calcium signaling in mouse CD36+ lipid gustatory cells*****. XVII^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs-BIOTechno *;* Juin 2011, Dijon, France.**

Linoleic acid, a long chain fatty acid (LCFA), induced increases in free intracellular calcium concentrations, $[Ca^{2+}]i$, in CD36+ cells isolated from mouse lingual circumvallate papillae. The LCFA-induced increases in $[Ca^{2+}]i$ were contributed by an initial increase from endoplasmic reticulum (ER), followed by calcium influx *via* opening of store operated calcium (SOC) channels, as per capacitative model of calcium homeostasis. During the recruitment of calcium from ER pool, LCFA evoked the release of calcium-influx factor (CIF) which, in turn, activated $iPLA_2$ by displacing calmodulin (CaM) from this enzyme. The $iPLA_2$ was responsible for the production of lyso-phosphatidylcholine (Lyso-PC). Indeed, CIF and Lyso-PC did not exert additive responses on calcium influx, indicating that both the agents open the same calcium channels. The SOC channels are constituted of four transmembrane channel-pore forming units called Orai proteins whose functions are regulated by Stim1, a sensor of calcium depletion in the ER. We used siRNA technology and transgenic mice models of Orai1 and Stim1. We observed that CIF and Lyso-PC opened Orai1 channels. Stim1 was found to regulate the opening of SOC channels as in *Stim1*$^{-/-}$ CD36-positive cells, the CIF and Lyo-PC failed to induce calcium influx. Our results suggest that, during lipid taste perception in the mouse CVP, LCFA-activated $iPLA_2$ *via* CD36 will be implicated in cell signaling, responsible for the transmission of gustatory information to afferent nerve fibers.

Key-words: calcium, taste buds, lipids, CD36, gustation

4.5. <u>DRAMANE Gado,</u> ABDOUL-AZIZE Souleymane, VÖGTLE Timo, SADOU Hassimi, AKPONA Simon, NIESWANDT Bernhard, BESNARD Philippe and KHAN. *Role of CIF, STIM1 and Orai1 in calcium signaling in mouse CD36 taste bud cells*. 21th LBP-workshop Dijon, 26-27 January 2012.

4.6. <u>Gado Dramane</u>, Abdoul-azize Souleymane, Aziz Hichami, Simon Akpona, Naim A. Khan; *Stim1 is essential for the regulation of orai1/3 calcium channels, and fat preference in mice*; VII^{ième} congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique ; Avril 2012, Dijon, France.

« <u>Prix de la meilleure communication orale 2012</u> »

Introduction:

In addition to the basic taste modalities, sweet, sour, bitter, salty and *umami*, recent convincing evidences raise the possibility for an additional sixth taste modality devoted to the perception of lipids. A number of studies have suggested that lingual CD36, a glycoprotein, mainly expressed by circumvallate papillae (CVP) on the tongue, might be implicated in oro-gustatory of dietary lipids in rodents.

Aim of the study:

We highlight the cell activation mechanisms, responsible for the downstream cell signaling which might help understand the lipid-mediated regulation of feeding behavior, critically involved in the development of several diseases like obesity and other metabolic disorders.

Materials and methods:

CD36-positive cells were isolated from C57BL/6J mice according to the published procedure [*JBC*, 2008; 283:12949-59]. The presence of PLA_2 isoforms was detected by confocal microscopy; and the enzymes activity was determined as protocol furnished with *Cayman* kit. The PLA_2 activation was measured by the release of [^{3}H]-arachidonic acid. The presence of Orai1/3 and Stim1 mRNA was sought by Real Time- PCR in CD36-positive, cells calcium signaling was measured with a designed Calcium free/calcium reintroduction (CFCR) protocol. Experiments on the spontaneous preference for lipid-enriched solutions were investigated in wild type or *Stim1*$^{-/-}$ mice by means of the two-bottle preference test [*FASEB J*. 2008; 22:1458-68].

Results/Discussion:

We demonstrate that linoleic acid (LA), a long-chain fatty acid (LCFA), by activating different isoforms of $sPLA_2$, $cPLA_2$ and $iPLA_2$ via CD36, produced free arachidonic acid (AA) and lyso-phosphatidylcholine (Lyso-PC) which triggered calcium influx in CD36-positive cells. The LCFA induced the production of calcium-influx factor (CIF). CIF, AA and Lyso-PC exerted different actions on the opening of store operated calcium (SOC) channels, constituted of Orai proteins and regulated by Stim1, a sensor of calcium depletion in the endoplasmic reticulum. Wild-type mice exhibited a stronger preference than *Stim1*$^{-/-}$ animals for an oil-enriched solution, suggesting that Stim1 plays a key role in the oral detection of lipids.

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

1. Discussion générale :

Plusieurs facteurs, sociaux, culturels et physiologiques déterminent l'acte alimentaire. De nombreuses maladies sont apparues suite aux grandes mutations de notre ère qui ont permis à une grande partie de la population mondiale de ne plus faire une course aux calories. L'un des grands changements apparus dans l'alimentation, est l'augmentation de la part d'acides gras. Les travaux sur le rapport des acides gras polyinsaturés *n*-6/*n*-3, ont permis de définir des quantités maximales de consommation de graisses, les types d'aliments meilleurs pour la santé et la notion de « bon » et de « mauvais cholestérol ».

1.1. Activation des récepteurs du goût par les AGLC

Les acides gras activent de manières différentes les cellules réceptrices de bourgeons du goût de la papille caliciforme qui expriment la protéine CD36. Cette activation dépend de la structure, de la longueur de la chaîne carbonée, et du degré de saturation. El Yassimi *et al.* (2008) ont étudié les interactions de différents acides gras avec le CD36 dans des cellules fraîchement purifiées dans des papilles caliciformes de souris. Ils ont testé deux acides gras saturés, l'acide caprylique (CA, 10 :0) et l'acide palmitique (PA, 16 :0) ; deux acides gras polyinsaturés à longue chaine carbonée, l'acide docosahéxaénoïque (DHA, 22 :6 *n*-3) et l'acide linoléique (LA, 18 :3*n*-6). Il a été observé que, les AGLC saturés et insaturés induisent des réponses rapides, en augmentant différemment le calcium intracellulaire. C'est l'acide linoléique qui induit l'augmentation la plus importante de calcium intracellulaire. Partant du mécanisme de signalisation précédemment décrit suite à l'activation de CD36 par l'acide linoléique, nous avons cherché à comprendre les phénomènes qui avaient lieu en amont du déclenchement de cette signalisation, pendant cette signalisation et en aval de la signalisation.

1.2. PLA_2 et perception des AGLC

En amont de la signalisation, il faudrait que l'AGLC soit rendu perceptible aux récepteurs. Les PLA_2 se sont imposées comme candidats parfaits dans ce mécanisme. Chemin faisant, nous avons observé qu'ils jouaient un rôle à divers niveaux de la signalisation. Très peu d'études ont utilisé l'acide linoléique comme activateur de PLA_2. Toutefois, Suh *et al.*, (2008) ont montré que l'acide linoléique induit la libération de glucose à partir d'hépatocytes via l'activation de PLA_2.

Les PLA_2 catalysent l'hydrolyse en position *sn*-2 des phospholipides générant des acides gras polyinsaturés et des lyso-phospholipides.

Les PLA_2 peuvent être divisés en trois familles différentes. La famille des PLA_2 sécrétées ($sPLA_2$) utilisent une histidine catalytique et Ca^{2+} comme cofacteur essentiel. Elles contiennent aussi un site de reconnaissance interfaciale, composé de résidus hydrophobes qui entourent le site actif et permettent la fixation de l'enzyme à la membrane plasmique (Kudo et Murakami, 2002). Les PLA_2 sécrétées et cytosoliques ($cPLA_2$,) sont des enzymes dépendantes du calcium et possèdent un domaine de liaison C2. En règle générale, la plupart des $cPLA_2$ est transporté sur des membranes péri nucléaires ou de Golgi, là où la concentration intracellulaire de calcium augmente de l'ordre du micro molaire. La troisième catégorie, celle des $iPLA_2$, s'active indépendamment du calcium. Une isoforme particulière, $iPLA_2\beta$ (groupe VI), possède une structure complexe. La particularité de $iPLA_2\beta$ est qu'elle contient un domaine CaM à extrémité C-terminale, qui, avec le motif IQ, forme une poche permettant de se lier à CaM pour inhiber l'activité de $iPLA_2\beta$ (Jenkins *et al* ., 2001).

Dans notre étude, nous avons observé qu'à la fois les cellules CD36-positives et CD36-négatives possèdent les trois classes d'enzymes. Toutefois, les PLA_2 des groupes IIa et V n'étaient présents que dans les cellules CD36-positives. Cette observation est intéressante car ces deux types de PLA_2 sont impliqués dans la libération de l'acide arachidonique (AA) à partir de phospholipides dans les cellules endothéliales et les macrophages (Six et Dennis, 2000). Les cellules CD36-positives, mais pas les CD36-négatives, expriment aussi la $cPLA_2$ type IVc qui appartient à une famille d'enzymes qui sont constitutivement associées à la membrane plasmique, et, par conséquent, sont prêtes à catalyser la libération d'un acide gras de la position *sn*-2. Murakami *et al.* (2003) ont montré que $cPLA_2$ type IVc induit une libération rapide d'AA dans les cellules HEK293. Les cellules CD36-positives ont aussi abondamment exprimé $iPLA_2$ type VIβ. $iPLA_2\beta$, est déjà connue pour être impliquée dans la signalisation calcique (Smani *et al*, 2004). Cette isoforme est conservée chez l'homme, le rat, la souris, le hamster et chez la drosophile (Mancuso *et al*, 2000;.. Jenkins *et al*, 2001). La présence d'un certain nombre d'isotypes de PLA_2 dans les cellules CD36-positives suggère que lors de l'activation de ces cellules, AA est libéré des phospholipides. En étudiant l'incorporation des acides gras dans les cellules CD36 positives, nous avons constaté que l'AA exogène est présent principalement dans la phosphatidylcholine (PC). En fait, les PLA_2 peuvent présenter une spécificité en ce qui concerne la libération d'un acide gras de la position *sn*-2 des phospholipides (Denys *et al.*, 2005). C'est pourquoi l'AA est libéré sous l'action de ces PLA_2, en particulier par les groupes V et X des $sPLA_2$. Ces derniers effectuent une hydrolyse préférentielle de la phosphatidylcholine (Singer *et al*., 2002).

C'est bien pour la première fois que l'expression constitutive des isoformes différentes de PLA_2 dans les cellules de souris gustatives est démontrée. Bien que Oike *et al*. (2006b) aient montré que seule $sPLA_2$ de type IIa est présent dans les cellules gustatives de rat. Nous avons observé que par LA induit l'activation des $sPLA_2$ et $cPLA_2$ en se liant à CD36, et que SSO, bloque cette action. SSO a aussi diminué l'activité d'$iPLA_2$ dans les cellules CD36-positives.
Peu d'études étaient disponibles sur l'activation des PLA_2 via CD36, sauf un rapport récent qui a démontré que le flux laminaire induit à la fois l'expression et l'activation d'$iPLA_2$ via CD36 dans les cellules endothéliales vasculaires (Liu *et al*., 2004).

En ce qui concerne $iPLA_2$, nous pouvons émettre l'hypothèse que cette enzyme est activée via le récepteur de couplage, par le déplacement de la calmoduline, indépendamment des augmentations de $[Ca^{2+}]i$, comme le suggère d'ailleurs Shuttleworth *et al*. (2009).

1.3. LA active les PLA_2 et la signalisation calcique via CD36

Nous avons observé que LA induit une augmentation significative de $[Ca^{2+}]i$, ce qui n'a pas été le cas à moyen terme, dans un milieu extracellulaire pauvre en calcium. Sachant que LA induit une augmentation de $[Ca^{2+}]i$, par la production d'IP_3, suivi par l'influx de calcium dans les cellules CD36-positives (El-Yassimi *et al*., 2008), nous avons cherché à élucider l'effet de l'activation des PLA_2 par LA, en présence ou en l'absence de calcium dans le milieu de dosage. Nous avons observé que l'activité induite par LA, des $sPLA_2$ et $cPLA_2$ est plus importante en présence de calcium dans le milieu extracellulaire, comme indiqué dans les cellules HepG2 (Caro et Cederbaum, 2007). Comme prévu, l'activité induite par LA des $iPLA_2$ a aussi été accrue lorsque le calcium a été chélaté par EGTA dans le milieu extracellulaire comme l'ont d'ailleurs démontré Smani *et al,*. (2004) Plusieurs auteurs rapportent que la production de $[Ca^{2+}]i$, par certains agonistes est contrôlée par les PLA_2 et la libération d'AA (Tsumoda et Owayng, 1993; Tornquist *et al*, 1994). Nos résultats sont en accord avec les observations de Suh *et al*. (2008) qui ont montré que LA induit des augmentations de $[Ca^{2+}]i$, et l'activation des $cPLA_2$ dans les hépatocytes de poulet.
Comme la thapsigargine (TG), LA recrute aussi du calcium à partir du pool du réticulum endoplasmique (El-Yassimi *et al*., 2008). Nous avons observé que TG et LA, induisent de la même manière la libération d'AA-[^{3}H] dans les cellules CD36-positives mais pas plus que les activateurs PMA/ionomycine. De même, l'acide aristolochique et BPB, les inhibiteurs des types Ib et V des PLA_2, bromoenol lactone (BEL), un inhibiteur de type VI des PLA_2, et ATK, un inhibiteur de cPLA2 type V, inhibent de manière significative la libération d'AA-

[^{3}H] induite par LA et TG dans les cellules CD36-positives. De même, TG induit l'activation des trois isoformes de PLA_2 dans les cellules T Jurkat (Hichami *et al*., 2002).
Par ailleurs, LA exerce son action en se liant à CD36, une liaison qui est diminuée par SSO. La libération d'AA-[^{3}H] est aussi diminuée par SSO.

1.4. Les produits des PLA_2 activent la signalisation calcique

En résumé, ces observations suggèrent que les cellules CD36-positives possèdent les trois isoformes de PLA_2, et qu'elles sont activement impliquées dans la catalyse de l'AA. Il est à noter que LA n'a pas exercé son action sur la libération de d'AA-[^{3}H] via ses métabolites, car l'indométacine, un inhibiteur de la voie de la cyclo-oxygénase, NGDA, un inhibiteur de la voie de la lipoxygénase, et 1-aminobenzotriazole (ABT), un inhibiteur de la cytochrome P450 (CYP450 epoxygenases), n'ont pas réussi à influencer l'action de cet acide gras. Partant du fait que LA et TG induisent la libération d'AA-[^{3}H] de façon similaire, et que cette libération est inhibée par divers inhibiteurs de PLA_2, nous avons utilisé uniquement TG pour évaluer le rôle des AA libres sur l'influx de calcium capacitif afin d'éviter l'interférence de différentes seconds messagers qui pourraient être activés en plus par LA. En effet, LA peut induire la phosphorylation de la kinase Src protéine tyrosine (El-Yassimi *et al*., 2008).
Nous avons donc fait des expériences dans un tampon ne contenant aucun ion Ca^{2+}. Dans ces expériences, le calcium a été remplacé par EGTA. Dans tampon 0% Ca^{2+}, AA seul n'a pas induit une augmentation de [Ca^{2+}]i. En appliquant un protocole CFCR, en présence de TG, AA exogène a une action dose-dépendante sur les augmentations de [Ca^{2+}] i dans les cellules CD36-positives. Dans un tampon contenant du Ca^{2+}, les inhibiteurs des trois isoformes de PLA_2 réduisent l'influx de calcium induit par TG dans les cellules CD36-positives. Ces observations suggèrent que l'AA est responsable de l'influx de calcium dans ces cellules. Nos résultats corroborent les conclusions de plusieurs chercheurs qui ont montré que cet acide gras induit l'influx de calcium dans différentes lignées cellulaires (Hichami *et al*. 2002). Rappelons que l'influx de calcium provoqué par AA n'a pas été influencé par ses métabolites, ce qui a été confirmé par par Mignen *et al*. (2003). Puisque l'action des PLA_2 est associée à l'apparition d'AA libres dans le milieu extracellulaire et à la production de lyso-phospholipides dans les membranes plasmiques, nous nous sommes intéressés au rôle de lyso-PC, dont nous avons observé la production dans les cellules CD36-positives. Lyso-PC induit un influx de calcium dans ces cellules, mais aussi, Lyso-PE et Lyso-PI, dans une moindre proportion par rapport à lyso-PC. Ces résultats corroborent les conclusions de Smani *et al*. (2004) qui ont montré que les lysophospholipides, y compris lyso-PC induiraient l'ouverture de canaux calciques dans

les cellules musculaires lisses de souris. Boittin *et al*. (2010) ont récemment démontré que Lyo-PC a déclenché l'entrée du calcium via les canaux SOC (*stored operated calcium channel*) dans les fibres dystrophiques.

Nous avons observé que l'addition d'AA après lyso-PC et vice-versa a induit une réponse additive sur l'influx de calcium. Ceci suggère que les canaux ouverts par ces deux agents ne se chevauchent pas. L'influx de calcium stimulé par l'AA n'est pas contrôlé par des mécanismes classiques. Des inhibiteurs comme le diltiazem et ω-conotoxine, inhibiteurs respectifs les canaux calciques de type L et de type N, n'ont pas pu bloquer l'influx de calcium induit par l'AA dans nos cellules.

De nombreux travaux récemment publiés sont en accord avec notre hypothèse (Mignen *et al*, 2001; Mignen *et al*, 2009). Ils ont montré l'existence d'un courant ARC spécifique à l'acide arachidonique, dans les cellules HEK293.

1.5. CIF est un activateur du calcium intracellulaire

Le courant ARC, induit par 8 à 10 μM d'AA dans des expériences de patch-clamp, peut être bloqué par 50 μM de lanthanum (La^{3+}) dans ces cellules (Shuttleworth, 2009). De même, dans notre étude, nous avons observé que par l'influx de calcium capacitif induit l'AA a été inhibé par une addition préalable de (La^{3+}).

Le facteur d'induction calcique CIF a été identifié dans les cellules T Jurkat comme un agent qui libéré du réticulum endoplasmique durant la déplétion calcique et qui, par conséquent, favorise l'influx de calcium afin de remplir les réserves intracellulaires (Ramdriamampita et Tsien, 1993). Bien que l'identité moléculaire de CIF démeure jusqu'à présent un mystère, sa présence et son activité biologique ont été démontrées de nombreuses fois, dans une grande variété de types de cellules allant de la levure à l'homme (Bolotina et Csutora, 2005). L'activité de CIF peut être détectée très tôt, dès 20 à 25 s après l'épuisement des réserves calciques par la TG (Mercer *et al*., 2006).

Nous avons purifié CIF, en stimulant des CD36 cellules positives par l'acide linoléique et observé qu'il induit l'influx calcique, non seulement dans les cellules CD36-positives, mais aussi les cellules Jurkat, les lymphocytes T et les cellules HEK 293. De même, le facteur CIF a été purifié en stimulant les cellules avec la TG. Ce CIF induit par TG provoque aussi l'influx calcique. Ces observations suggèrent que CIF est un facteur universel (Ramdriamampita et Tsien, 1993). Cependant, l'addition d'AA après CIF induit une réponse additive sur l'influx calcique. Les canaux calciques ouverts par CIF et AA pourraient appartenir à deux catégories différentes. Toutefois, pas d'action additive suite à l'addition de

CIF et lyso-PC sur l'influx calcique dans les cellules CD36-positives. Lyso-PC et CIF ont, sans doute, une action sur la même catégorie de canaux calciques dans ces cellules.

1.6. Quelle est la nature des canaux calciques impliqués ?

Intéressons nous à présent à la nature des canaux calciques qui pourraient être spécifiquement ouverts par AA et Lyo-PC. Les canaux SOC se composent de quatre unités codées par des gènes Orai (Baryshnikov *et al*., 2009). Les canaux calciques Orai1 sont des constituants moléculaires de l'activation de courants I_{CRAC}. En effet, l'invalidation du gène d'Orai1 produit une inhibition spectaculaire de I_{CRAC} et l'activation de l'influx SOC (Bolotina, 2008). Dans un premier temps, nous avons cherché à savoir si nos cellules CD36-positives possèdent ces canaux. Nous avons observé que ces cellules expriment à la fois l'ARNm et la protéine des canaux Orai1 et Orai3. Nous avons aussi provoqué la diminution de l'expression des canaux Orai1 et Orai3 grâce à la technologie *si*RNA. Sans surprise, la réponse de lyso-PC sur l'entrée du calcium a été significativement réduite dans les cellules dans lesquelles Orai1 est diminué, mais l'influx calcique induit par l'AA n'a été que faiblement diminué dans ces cellules. Précisons que l'influx calcique induit par l'AA a été considérablement réduit dans les cellules CD36-positives transfectées à la fois avec les protéines Orai1 et Orai3. Parallèlement, l'influx de calcium induit par Lyo-PC ou CIF a été complètement réduit dans les $Orai1^{-/-}$ ou le gène a été invalidé. En ce qui concerne l'influx de calcium induit par l'AA, il a été aussi très réduit dans ces cellules.

Nos observations sur l'ouverture de canaux Orai1 par Lyo-PC sont étayées par les conclusions de Shuttleworth (2009) qui a montré que l'assemblage homotétramérique d'Orai1 forme les canaux SOC. De même, les canaux ARC seraient formés par un ensemble heteropentameric d'Orai1 et Orai3, dans une proportion trois sous-unités Orai1 et deux sous-unités Orai3 (Mignen *et al*., 2009). Les canaux SOC et ARC, sont totalement distincts et peuvent coexister dans les mêmes cellules (Shuttleworth *et al*., 2004). L'AA peut ouvrir divers canaux calciques en particulier les canaux ARC (Shuttleworth *et al*. 2004).

1.7. STIM1 est un activateur mécanique des canaux calciques

STIM1 (*stromal interaction molécule* 1) est une protéine transmembranaire de 77 kDa, récemment identifiée comme capteur de calcium dans la membrane du réticulum endoplasmique. Suite à la déplétion calcique, STIM1 active l'influx SOC (Liou *et al*, 2005). La production CIF induite par LA est significativement réduite dans les cellules CD36-positives isolées chez des souris $Stim1^{-/-}$. Les extraits de CIF chez ces souris n'induisent bien

évidemment aucune augmentation du calcium intracellulaire. Ces observations sont en accord avec les conclusions de Csutora *et al*. (2008), qui ont montré que la production CIF est étroitement associée à l'expression de STIM1 et exige l'intégrité fonctionnelle de son -motif SAM, dans les cellules musculaires lisses d'aorte de lapin. Ces chercheurs ont aussi démontré que la surexpression de STIM1 induit une plus grande production de CIF. Chez les cellules NG115 qui n'expriment pas de protéine fonctionnelle STIM1, on retrouve une déficience intrinsèque de la production de CIF et de l'influx SOC. Il est possible que l'augmentation de calcium intracellulaire induite par LA via la production d'IP_3 pourrait être responsable de l'activation de STIM1 et, par conséquent, la production CIF. Notons que la surexpression combinée de STIM1 et Orai1 amplifie de façon significative l'influx SOC, suggérant que l'activation de cet influx a lieu grâce à un couplage conformationnel et une transduction du signal direct de STIM1 à Orai1 (Soboloff *et al*., 2006).

Mignen *et al*. (2007) ont montré dans des cellules HEK 293, que l'influx de Ca^{2+} dépendant de l'acide arachidonique est réglementé par STIM1. Dans notre modèle, l'AA n'a pas induit de l'influx de Ca^{2+} dans les cellules CD36-positives, isolées chez des souris $Stim1^{-/-}$. En effet, STIM1 semble être un régulateur universel des voies d'entrée de calcium.

Il est possible que suite à l'activation de LA, STIM1 et Orai1 ou Orai1/ Orai3 agissent de concert pour produire des augmentations de Ca^{2+} dans les cellules CD36-positives.

Cependant, une grande question démeurre.

1.8. Les PLA_2 agissent-elles en amont ou en aval de la production CIF ?

Nous faisons l'hypothèse, lors de l'activation des cellules CD36-positives, LA va induire l'épuisement des réserves intracellulaires de calcium par la voie de l'IP_3 (El-Yassimi *et al*., 2008) et, par conséquent, la production de CIF. CIF activerait iPLA2 Type VI en déplaçant la calmoduline comme le décrivent Smani *et al*. (2004). Nous avons observé que l'action de l'inhibiteur la calmoduline, CMZ et la déplétion du calcium libre intracellulaire par activation de BAPTA, induit l'activité d'$iPLA_2$ dans ces cellules.

$iPLA_2$ libérera donc AA et Lyo-PC, et ce dernier ouvrira les canaux SOC formés par Orai1 (Smani *et al*, 2004;. Bolotina, 2008). L'influx de Ca^{2+} *via* les canaux SOC (Orai1) entraînera une forte augmentation de $[Ca^{2+}]i$ qui participera à l'activation de $sPLA_2$ et $cPLA_2$ tel que cela a été proposé par Bolotina (2008). En effet, ces chercheurs s'accordent avec le fait que l'influx de Ca^{2+} est fortement impliqué dans l'activation de ces isoformes de PLA2.

Notre hypothèse est étayée par les observations de Chang et Parekh (2004) qui ont montré que, dans cellules les RBL-1, entrée de Ca^{2+} par la voie SOC, induit l'épuisement des réserves

intracellulaires de Ca^{2+}, et l'activation de cPLA2. Alors, on se demanderait si les réserves intracellulaires étaient capables d'activer ces enzymes. La réponse est non, même si il y avait un fort signal intracellulaire de Ca^{2+}.

En résumé (Figure53), seule une forte augmentation de $[Ca^{2+}]$ i, peut induire l'influx de Ca^{2+}, nécessaire à l'activation des PLA_2 Ca^{2+} dépendants (Chang et Parekh, 2004). On observe donc une importante diminution du Ca^{2+} induit par LA lors de l'activation des $sPLA_2$ et $cPLA_2$ à 0% de Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire. Un influx de Ca^{2+} est donc bien nécessaire à l'activation de ces deux d'enzymes.

La production massive de lyso-PC via l'activation de $sPLA_2$ et $cPLA_2$ ouvre elle aussi les canaux Orai1 tandis que AA ouvre les canaux ARC formés par Orai1 et Orai3 (Shuttleworth *et al*., 2004).

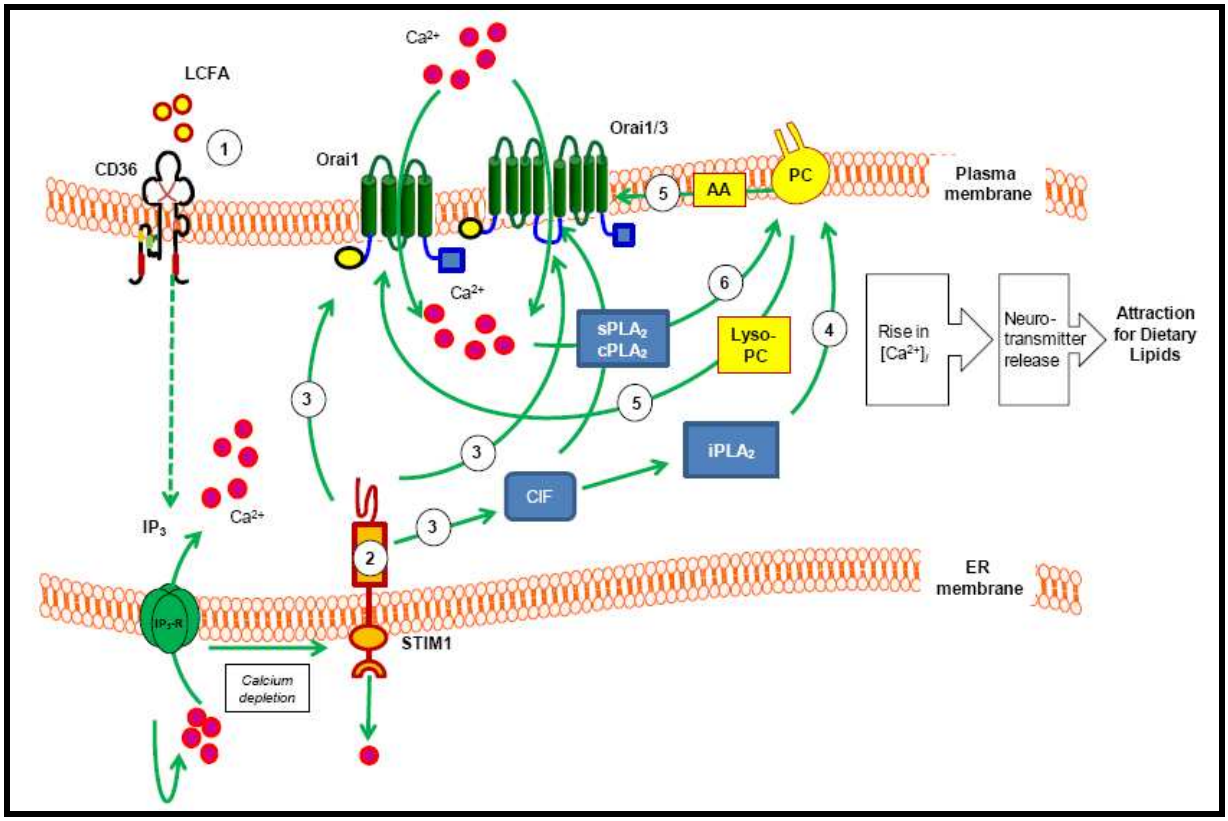

Figure53: Représentation schématique de la signalisation calcique induite par LA dans les cellules CD36-positives.

LA se lie à CD36 (1) et conduit à la production d'IP_3, et épuise les réserves calciques intracellulaires. Suite à appauvrissement en Ca^{2+}, STIM1 sera relocalisé dans les structures membranaires du RE, à proximité de la membrane plasmique (2). STIM1 déclenche la production de CIF (3) qui déplace l'inhibition de la calmoduline liée à $iPLA_2$ (4). Ceci produit lyso-PC et AA. Lyso-PC active les canaux SOC/Orai qui sont responsables de l'influx SOC (5). Un influx massif de Ca^{2+} via ces canaux active $sPLA_2$ et $cPLA_2$ (6) et donnera lieu à une production massive de lyso-PC et AA qui va ouvrir à nouveau les canaux Orai1 et Orai1/Orai3, respectivement, et là, a lieu une augmentation massive de la $[Ca^{2+}]$ i qui pourrait être impliquée dans l'exocytose de neurotransmetteurs comme la sérotonine, et donc, responsable de la perception gustative des lipides alimentaires.

Par ailleurs, une augmentation massive de [Ca^{2+}] intracellulaire pourrait être impliquée dans différents mécanismes tels que l'ouverture des canaux TRPM5 et l'exocytose de neuromédiateurs. En effet, les canaux TRPM5 sont impliqués dans la perception gustative des lipides (Sclafani *et al.,* 2007), et sont perméables à Na^{+}. Ils peuvent être activés par le Ca^{2+}, et, par conséquent, induire des modifications du potentiel de membrane conduisant à l'exocytose des neuromédiateurs vers les fibres nerveuses (Liu et Liman, 2003).

1.9. Stim1 est impliquée dans la préférence gustative lipidique

Sachant que Stim1 est l'acteur clé de la régulation de l'homéostasie du calcium (nous avons mené une étude sur la préférence spontanée de la solution lipidique sur $Stim1^{-/-}$ souris. Nous avons observé que, sur une période de 12 heures, l'ingestion préférentielle de liquide additionné d'huile par les souris $Stim1^{-/-}$, était complètement abolie par rapport à celle des souris de type sauvage. Nous avons également observé que cette perte de la perception gustative des lipides pourrait être due à l'absence de l'exocytose de sérotonine dans les cellules gustatives lipidiques de souris $Stim1^{-/-}$.

Nous nous sommes demandé si l'invalidation du gène STIM1 n'avait pas un effet sur le comportement des souris transgéniques. Alors, sachant que les souris $Stim1^{-/-}$ développent une splénomégalie, nous avons induit la splénomégalie chez des souris saines en leur injectant du chlorure de cadmium. Bien évidemment, ces souris ne perdent pas leur préférence gustative lipidique. Ceci est la preuve que c'est bel et bien le gène STIM1 qui détermine le comportement alimentaire, vis-à-vis des aliments gras.

Notre étude montre que les augmentations de [Ca^{2+}] i provoquées par la déplétion du calcium intracellulaire et l'influx de Ca^{2}+, induite par un acide gras, sont sous le contrôle de Stim1, et sont directement impliqués dans la perception gustative des lipides alimentaires. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour explorer en profondeur les molécules intermédiaires entre Stim1 et la production CIF. Nous ignorons encore comment lyso-PC (ou de ses produits dérivés) ouvre les canaux calciques membranaires. L'implication des étapes intermédiaires et de composants supplémentaires responsables de la transduction du signal de Stim1 depuis la membrane du RE, pour canaliser les protéines dans la membrane plasmique reste à être explorée.

1.10. La protéine GPR120 a-t-elle un rôle dans la perception gustative lipidique ?

L'implication de la protéine CD36 n'est plus à démontrer dans la perception des acides gras alimentaires. Récemment, le récepteur GPR120 est devenu une molécule candidate dans cette perception. D'après Hirasawa *et al*., (2005), GPR120 pourrait jouer un rôle de senseur lipidique.en effet l'activation de GPR120 au niveau intestinal déclenche un signalisation cellulaire impliquant la secrétion de GLP-1. D'après Cartoni *et al.*, (2010), GPR120 jouerait aussi un rôle de lipido-récepteur. En effet, les souris $GPR120^{-/-}$ perdraient la reconnaissance des acides gras alimentaires.

Ces résultats nous confortent dans nos résultats préliminaires concernant la signalisation des cellules gustatives déclenchée par le DHA. Nous avons trouvé que le DHA induit une augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules gustatives de souris. L'application de SSO, un inhibiteur de FAT/CD36 n'a aucun effet sur ce calcium induit. Ces résultats nous aident à préciser que le DHA induit une augmentation de calcium intracellulaire par un autre transporteur que FAT/CD36. Nous avons récemment indiqué que le FAT/CD36 et les récepteurs couplés à la protéine G (RCPG) sont des protéines candidates de la perception du goût des lipides (Dramane *et al*., 2011). Dexuan *et al*. (2010) ont corroboré notre suggestion en révélant que le DHA induit une signalisation par l'intermédiaire de la voie de la PLC/IP_3. Dans ce cas, c'est GPR40, un récepteur couplé à la protéine G, qui est modulé pour permettre la mobilisation de Ca^{2+} intracellulaire.

En plus de GPR40, Hirasawa *et al*. (2005) ont montré que GPR120 agit comme un récepteur des acides gras polyinsaturés (AGPI) et Martin *et al*. (2011) ont montré que les cellules réceptrices du goût (papilles caliciformes) expriment GPR120. Tous ces résultats nous suggèrent fortement que le calcium induuit par DHA, pourrait l'être par l'intermédiaire d'une protéine GPR.

Toutefois, aucune description du mécanisme n'a été proposée jusqu'à ce jour mais, nous pouvons imaginer que GPR120 s'associerait à CD36 pour détecter les acides gras alimentaires.

1.11. GPR120 et CD36 sont elle des protéines associées ?

Pour étayer l'hypothèse d'une association CD36 et GPR120, Hirasawa *et al*., (2005) et Baillie *et al*., (1996) ont relevé des spécificités de liaisons similaires entre les deux protéines. Toutefois, il est très improbable que les deux protéines aient des mécanismes propres de

détecttion. Alors nous imaginons un système dans lequel CD36 reconnaitrait les AGLC et les transmettrait au GPR120 pour déclencher la signalisation, ceci peut être via les radeaux lipidiques (*lipids raft*).

2. Conclusions et Perspectives :

La compréhension de tous les mécanismes impliqués dans perception du « goût du gras » est un vaste programme. Nous avons tenté d'améliorer la compréhension de la signalisation calcique impliquée dans cette signalisation.

Il avait été approuvé précédemment que la glycoprotéine CD36, exprimée par papilles caliciformes (CVP) de souris, est impliquée dans la perception oro-gustative des lipides alimentaires. Nous avons démontré que l'acide linoléique (LA) en activant les $sPLA_2$, $cPLA_2$ et $iPLA_2$ via CD36, produit de l'acide arachidonique (AA) et lyso-phosphatidylcholine (lyso-PC) et déclenche un influx calcique, dans les cellules CD36-positives purifiées à partir de papilles caliciformes de souris. LA induit la production du facteur CIF. CIF, AA et lyso-PC exercent différentes actions sur l'ouverture canaux SOC, constitués de protéines Orai et réglementées par STIM1, un senseur calcique de la membrane du réticulum endoplasmique, qui répond à la déplétion calcique. Nous avons utilisé la technologie *si*RNA et des modèles de souris transgéniques et avons observé que le CIF et lyso-PC ont ouvert les canaux Orai1 tandis que AA ouvre les canaux calciques composés de Orai1/Orai3. Nous avons trouvé que STIM1 régule la production de CIF dans les cellules stimulées par la thapsigargine et l'acide linoléique ; mais aussi l'ouverture de deux types de canaux calciques.

Par ailleurs, les souris au phénotype $Stim1^{-/-}$ ont perdu la préférence spontanée pour les lipides, observée chez les animaux de type sauvage. De même, les cellules CD36-positive de souris $Stim1^{-/-}$ n'ont pas pu libérer la sérotonine dans l'environnement extracellulaire.

Nos résultats suggèrent que des acides gras à longue chaîne induisent la signalisation calcique régie par STIM1 via CD36. La perception oro-gustative des lipides alimentaires détermine la préférence spontanée pour les lipides observée chez les mammifères.

Compte tenu des rôles bénéfiques attribués à d'autres acides gras polyinsaturé, notamment le DHA, il était opportun d'étudier plus complètement son action sur cette signalisation. Des travaux sont en cours et laissent penser qu'il y aurait une signalisation calcique induite, mais

via des voies un peu différentes. En effet, le DHA a induit une augmentation rapide du calcium intracellulaire dans les cellules gustatives lipidiques. Cette augmentation est semblable à celle de induite par l'acide linoléique et la thapsigargine. Parce que l'acide linoléique induit le recrutement du calcium intracellulaire à partir du réticulum endoplasmique via la voie de la PLC (El Yassimi *et al*. 2008), nous avons étudié l'action d'un inhibiteur des canaux SOC (2-APB), et un inhibiteur de la phospholipase C (U-73122). Nous avons constaté que le DHA active égalemement la PLC, et recrute le calcium à partir du pool du réticulum endoplasmique. Cependant, le mécanisme d'action de DHA pour activer la PLC reste à déterminée. Nous avons observé que le DHA n'a pas induit de calcium intracellulaire dans les cellules gustatives de souris Stim1$^{-/-}$. En étudiant la libération du DHA par ces cellules, nous avons constaté qu'il était libéré à partir des phospholipides membranaires grâce à la PLA_2 GIVC, ceci en utilisant des inhibiteurs de PLA_2 et des *si*RNA PLA_2. Ces résulats sont à confirmer avec l'utilisation de siRNA CD36, notamment pour montrer que l'atténuation du CD36 ne modifierait pas la signalisation induite par DHA. Ceci confirmerait l'implication d'un autre récepteur, un récepteur GPR.

Du fait de l'implication de la voie des MAPK dans de nombreuses signalisations, nous avons recherché si cette voie joue un rôle dans la signalisation des cellules CD36-positives. Des travaux préliminaires ont permis de montrer que la stimulation des cellules CD36 positives par LA déclenche la phosphorylation de plusieurs protéines de la famille des MAP Kinases. Ces premiers résultats nous laissent croire que ces phosphorylations seraient dépendantes du récepteur CD36. De plus, la stimulation par LA déclencherait la synthèse et la libération de la sérotonine grâce à l'activation de la voie des ERK. Il serait interressant de rechercher les protéines en amont de la cascade des MAPK.

Enfin, la connaissance de la perception des acides gras alimentaires aura un impact certain sur la santé publique. Nous pouvons imaginer des molécules pharmacologiques qui permettraient de consommer des aliments gras sans courir le risque d'avoir des incidences sur la santé. On peut penser à une sorte d'aspartame du gras. On consommerait du gras sans apport calorique exédentaire. Il serait possible de désensibiliser les sujets aux aliments gras, en créant chez eux une répugnance.

C'est pour cela que des études similaires à celle effectuées chez les souris sont en cours sur des papilles gustatives humaines. Ces travaux seraient limités certes par des considérations éthiques mais, chez l'homme l'avantage est que les tests de préférences gustatives seraient

plus complets. En effet, on pourrait facilement faire une étude sur le choix des aliments et leur appréciation. A ce sujet précisément, des études très récentes menées chez l'homme, rapportent les effets d'un polymorphisme nucléotidique (rs1761667) du gène de CD36 (Pepino *et al*., 2012). Chez les sujets porteurs de ce polymorphisme, il apparait non seulement une réduction de l'expression de CD36 mais aussi une baisse du seuil de détection des AG chez des personnes obèses. Il n'y a donc plus de doute que CD36 jouerait un rôle majeur dans le comportement alimentaire lié à la consommation d'aliments gras.

Il va sans dire que la « piste du goût du gras » reste encore longue à explorer.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **A**be A, Hiraoka M, Shayman JA, (2006). Positional specificity of lysosomal phospholipase A2. *J Lipid Res*. **47** (10):2268-79.
- Abe A, Hiraoka M, Wild S, Wilcoxen SE, Paine R 3rd, Shayman JA, (2004). Lysosomal phospholipase A2 is selectively expressed in alveolar macrophages. *J Biol Chem*. **279** (41):42605-11.
- Abe A, Shayman JA, (1998). Purification and characterization of 1-O-acylceramide synthase, a novel phospholipase A2 with transacylase activity. *J Biol Chem*. **273** (14): 8467-74.
- Abumrad NA, el-Maghrabi MR, Amri EZ, Lopez E, Grimaldi PA, (1993). Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem*. **268** (24): 17665-68.
- Ackermann EJ, Conde-Frieboes K, Dennis EA, (1995). Inhibition of macrophage Ca(2+)-independent phospholipase A2 by bromoenol lactone and trifluoromethyl ketones. *J Biol Chem*. **270** (1): 445-50.
- Alonso F, Henson PM, Leslie CC, (1986). A cytosolic phospholipase in human neutrophils that hydrolyzes arachidonoyl-containing phosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta*. **878** (2): 273-80.
- Amandi-Burgermeister E, Tibes U, Kaiser BM, Friebe WG, Scheuer WV, (1997). Suppression of cytokine synthesis, integrin expression and chronic inflammation by inhibitors of cytosolic phospholipase A2. *Eur J Pharmacol*. **326** (2-3): 237-20.
- Arai H, Koizumi H, Aoki J, Inoue K, (2002). Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH). *J Biochem*. **131** (5): 635-40.
- Assogba L, Ahamada-Himidi A, Habich NM, Aoun D, Boukli L, Massicot F, Mounier CM, Huet J, Lamouri A, Ombetta JE, Godfroid JJ, Dong CZ, Heymans F, (2005). Inhibition of secretory phospholipase A2. 1-design, synthesis and structure-activity relationship studies starting from 4-tetradecyloxybenzamidine to obtain specific inhibitors of group II sPLA2s. *Eur J Med Chem*. **40** (9): 850-61.
- Atsumi G, Tajima M, Hadano A, Nakatani Y, Murakami M, Kudo I, (1998). Fas-induced arachidonic acid release is mediated by Ca2+-independent phospholipase A2 but not cytosolic phospholipase A2, which undergoes proteolytic inactivation. *J Biol Chem*. **273** (22): 13870-77.
- **B**alestrieri B, Hsu VW, Gilbert H, Leslie CC, Han WK, Bonventre JV, Arm JP, (2006). Group V secretory phospholipase A2 translocates to the phagosome after zymosan stimulation of mouse peritoneal macrophages and regulates phagocytosis. *J Biol Chem*. **281** (10): 6691-98.

- Balsinde J, Balboa MA, Li WH, Llopis J, Dennis EA, (2000). Cellular regulation of cytosolic group IV phospholipase A2 by phosphatidylinositol bisphosphate levels. *J Immunol.* **164** (10): 5398-02.

- Baranova IN, Bocharov AV, Vishnyakova TG, Kurlander R, Chen F, Fu D, Arias IM, Csako G, Patterson AP, Eggerman TL (2010). CD36 Is a Novel Serum Amyloid A (SAA) Receptor Mediating SAA Binding and SAA-induced Signaling in Human and Rodent Cells. *J. Biol. Chem*. **285** (11): 8492-06

- Barrowman JA, Darnton SJ, (1970). The lipase of rat gastric mucosa. A histochemical demonstration of the enzymatic activity against a medium chain triglyceride. *Gastroenterology*. **59**: 13-21.

- Baryshnikov SG, Pulina MV, Zulian A, Linde CI, Golovina VA, (2009).Orai1, a critical component of store-operated Ca2+ entry, is functionally associated with Na+/Ca2+ exchanger and plasma membrane Ca2+ pump in proliferating human arterial myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. **297** (5): C1103-12.

- Baulande S, Lasnier F, Lucas M, Pairault J, (2001). Adiponutrin, a transmembrane protein corresponding to a novel dietary- and obesity-linked mRNA specifically expressed in the adipose lineage. *J Biol Chem*. **276** (36): 33336-44.

- Béaslas O, Cueille C, Delers F, Chateau D, Chambaz J, Rousset M, Carriére V, (2009). Sensing of Dietary Lipids by Enterocytes: A New Role for SR-BI/CLA-1. *PLoS ONE*. **4**(1): e4278

- Benítez S, Sánchez-Quesada JL, Ribas V, Jorba O, Blanco-Vaca F, González-Sastre F, Ordóñez-Llanos J, (2003). Platelet-activating factor acetylhydrolase is mainly associated with electronegative low-density lipoprotein subfraction. *Circulation*. **108** (1): 92-96.

- Benoit SC, Clegg DJ, Seeley RJ, Woods SC, (2004). Insulin and leptin as adiposity signals. *Recent Prog Horm Res*. **59**: 267-85. Review.

- Benton R, Vannice KS, Vosshall LB, (2007). An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in Drosophila. *Nature*. **450**: 289-93.

- Bernhardt SJ, Naim M, Zehavi U, Lindemann B, (1996). Changes in IP3 and cytosolic Ca2+ in response to sugars and non-sugar sweeteners in transduction of sweet taste in the rat. *J Physiol*. **490**: 325-36.

- Berridge MJ, (1984). Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J*. **220**: 345-60. Review.

- Bloch-Shilderman E, Jiang H, Abu-Raya S, Linial M, Lazarovici L, (2001). Involvement of Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) in Pardaxin-Induced Dopamine Release from PC12 Cells. *JPET*. **296** (3): 704–11

- Boittin FX, Gribi F, Serir K, Bény JL, (2008). Ca2+-independent PLA2 controls endothelial store-operated Ca2+ entry and vascular tone in intact aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **295** (6): H2466-74.

- Boittin FX, Petermann O, Hirn C, Mittaud P, Dorchies OM, Roulet E, Ruegg UT, (2006). Ca2+-independent phospholipase A2 enhances store-operated Ca2+ entry in dystrophic skeletal muscle fibers. *J Cell Sci*. **119** (Pt 18):3733-42.

- Boittin FX, Shapovalov G, Hirn C, Ruegg UT, (2010). Phospholipase A2-derived lysophosphatidylcholine triggers Ca2+ entry in dystrophic skeletal muscle fibers. *Biochem Biophys Res Commun*. **391** (1): 401-06.

- Bolotina VM, (2008). Orai, STIM1 and iPLA2 β: a view from a different perspective. *J Physiol*. **586** (13): 3035-42.

- Bolotina VM, Csutora P, (2005). CIF and other mysteries of the store-operated Ca2+-entry pathway. *Trends Biochem Sci*. **30** (7): 378-87.

- Boughter JD, Pumplin DW, Yu C, Christy RC, Smith DV, (1997). Differential expression of alpha-gustducin in taste bud populations of the rat and hamster. *J Neurosci*. **17**: 2852-58.

- Boulay G, Brown DM, Qin N, Jiang M, Dietrich A, Zhu MX, Chen Z, Birnbaumer M, Mikoshiba K, Birnbaumer L, (1999). Modulation of Ca(2+) entry by polypeptides of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca(2+) entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**: 14669-71.

- Boyanovsky BB, Li X, Shridas P, Sunkara M, Morris AJ, Webb NR, (2010). Bioactive products generated by group V sPLA (2) hydrolysis of LDL activate macrophages to secrete pro-inflammatory cytokines. *Cytokine*. **50** (1): 50-57.

- Boyanovsky BB, van der Westhuyzen DR, Webb NR, (2005). Group V secretory phospholipase A2-modified low density lipoprotein promotes foam cell formation by a SR-A- and CD36-independent process that involves cellular proteoglycans. *J Biol Chem.* **280** (38): 32746-52.

- Braun A, Varga-Szabo D, Kleinschnitz C, Pleines I, Bender M, Austinat M, Bösl M, Stoll G, Nieswandt B, (2009). Orai1 (CRACM1) is the platelet SOC channel and essential for pathological thrombus formation. *Blood*. **113** (9): 2056-63.

- Bridonneau P, Chang YF, O'Connell D, Gill SC, Snyder DW, Johnson L, Goodson T Jr, Herron DK, Parma DH, (1998). High-affinity aptamers selectively inhibit human nonpancreatic secretory phospholipase A2 (hnps-PLA2). *J Med Chem*. **41** (6): 778-86.

- Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS, (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*. **287** (4): C817-33.

- Bruinsma KA, Taren DL, (2000). Dieting, essential fatty acid intake and depression. *Nutr Rev*. **58** (4): 98-108.
- Burgess R, Kosaner J, Pwee P, Yiap KH, Low WK, Teoh CK, (2000). The Canossian School for the Hearing Impaired-Singapore General Hospital (CSHI-SGH) Cochlear Implant Program: children's auditory speech perception scores pre- and postimplant. *Adv Otorhinolaryngol*. **57**: 243-46.
- Burke JE, Karbarz MJ, Deems RA, Li S, Woods VL Jr, Dennis EA, (2008). Interaction of group IA phospholipase A2 with metal ions and phospholipid vesicles probed with deuterium exchange mass spectrometry. *Biochemistry*. **47** (24): 6451-59.
- **C**aiazza F, Harvey BJ, Thomas W, (2010). Cytosolic phospholipase A2 activation correlates with HER2 overexpression and mediates estrogen-dependent breast cancer cell growth. *Mol Endocrinol*. **24** (5): 953-68.
- Calviello G, Palozza P, Piccioni E, Maggiano N, Frattucci A, Franceschelli P, Bartoli GM, (1998). Dietary supplementation with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid inhibits growth of Morris hepatocarcinoma 3924A in rats: effects on proliferation and apoptosis. *Int J Cancer*. **75** (5): 699-705
- Caplan M, Hsueh W, Kelly A, Donovan M, (1990). Serum PAF acetylhydrolase increases during neonatal maturation. *Prostaglandins*. **39** (6): 705-14.
- Carman GM, Deems RA, Dennis EA, (1995). Lipid signaling enzymes and surface dilution kinetics. *J Biol Chem.* **270** (32): 18711-14.
- Caro AA, Cederbaum AI, (2007). Role of intracellular calcium and phospholipase A2 in arachidonic acid-induced toxicity in liver cells overexpressing CYP2E1 Arch Biochem Biophys. **457** (2): 252-63.
- Carpenter KL, Dennis IF, Challis IR, Osborn DP, Macphee CH, Leake DS, Arends MJ, Mitchinson MJ, (2001). Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 diminishes the death-inducing effects of oxidised LDL on human monocyte-macrophages. *FEBS Lett*. **505** (3): 357-63.
- Carroll JM, Taichman LB, (1992). Characterization of the human involucrin promoter using a transient beta-galactosidase assay. *J Cell Sci*. **103**: Pt 4, 925-30.
- Cartoni C, Yasumatsu K, Ohkuri T, Shigemura N, Yoshida R, Godinot N, le Coutre J, Ninomiya Y, Damak S, (2010). Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. *J Neurosci*. **30** (25): 8376-82.
- Cen B, Xiong Y, Ma L, Pei G, (2001). Direct and differential interaction of beta-arrestins with the intracellular domains of different opioid receptors. *Mol. Pharmacol*. **59**: 758-64.
- Cha SS, Lee D, Adams J, Kurdyla JT, Jones CS, Marshall LA, Bolognese B, Abdel-Meguid SS, Oh BH, (1996). High-resolution X-ray crystallography reveals precise binding

interactions between human nonpancreatic secreted phospholipase A2 and a highly potent inhibitor (FPL67047XX). *J Med Chem*. **39** (20): 3878-81.

- Chale-Rush A, Burgess JR, Mattes RD, (2007). Evidence for human orosensory (taste?) sensitivity to free fatty acids. *Chem. Senses*. **32**:423-31.
- Chalfant CE, Spiegel S, (2005). Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling *J Cell Sci*. **118** (Pt 20): 4605-12.
- Chalon S, Vancassel S, Zimmer L, Guilloteau D, Durand G, (2001). Polyunsaturated fatty acids and cerebral function: focus on monoaminergic neurotransmission. *Lipids*. **36** (9): 937-44. Review.
- Chandrashekar J, Hoon MA, Ryba NJP, Zuker CS, (2006). *Nature* 444:288-94
- Chandrashekar J, Mueller KL, Hoon MA, Adler E, Feng L, Guo W, Zuker CS, Ryba NJ, (2000). T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell*. **100**:703-11.
- Chang GQ, Karatayev O, Ahsan R, Gaysinskaya V, Marwil Z, Leibowitz SF, (2007). Dietary fat stimulates endogenous enkephalin and dynorphin in the paraventricular nucleus: role of circulating triglycerides. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **292** (2): E561-70.
- Chang WC, Parekh AB, (2004). Close functional coupling between Ca2+ release-activated Ca2+ channels, arachidonic acid release, and leukotriene C4 secretion. *J Biol Chem*. **279** (29): 29994-99.
- Chaudhari N, Landin AM, Roper SD, (2000). A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor. *Nat Neurosci*. **3** (2): 113-19.
- Cheal M, Oakley B, (1977). Regeneration of fungiform taste buds: temporal and spatial characteristics. *J Comp Neurol*. **172**: 609-26.
- Chen K, Febbraio M, Li2 W, Silverstein RL, (2008). A specific CD36-dependent signaling pathway is required for platelet activation by oxLDL. *Circ Res*., **102** (12): 1512–19
- Chin D, Means AR, (2000). Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol*. **10** (8): 322-28.
- Chioato L, Aragão EA, Lopes Ferreira T, Medeiros AI, Faccioli LH, Ward RJ, (2007). Mapping of the structural determinants of artificial and biological membrane damaging activities of a Lys49 phospholipase A2 by scanning alanine mutagenesis. *Biochim Biophys Acta*. **1768** (5): 1247-57.
- Chouabe C, Espinosa L, Megas P, Chakir A, Rougier O, Freminet A, Bonvallet R, 1997). Reduction of I(Ca,L) and I(to1) density in hypertrophied right ventricular cells by simulated high altitude in adult rats. *J Mol Cell Cardiol*. **29** (1): 193-06.
- Clapham DE, (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature*. **426**: 517-24. Review

- Clapp TR, Stone LM, Margolskee RF and Kinnamon SC, (2001). Immunocytochemichal evidence for co-expression of type III Ip3 receptor with a signaling component of bitter –taste transduction. *BMC Neurosci*.**2**: 6.

- Clark JD, Lin LL, Kriz RW, Ramesha CS, Sultzman LA, Lin AY, Milona N, Knopf JL, (1991). A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca (2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell*. **65** (6): 1043-51.

- Colley WC, Sung TC, Roll R, Jenco J, Hammond SM, Altshuller Y, Bar-Sagi D, Morris AJ, Frohman MA, (1997). Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr Biol.* **7**: 191-01.

- Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med.* **334** (5): 292-95.

- Csutora P, Peter K, Kilic H, Park KM, Zarayskiy V, Gwozdz T, Bolotina VM, (2008). Novel role for STIM1 as a trigger for calcium influx factor production. *J Biol Chem*. **283** (21): 14524-31.

- **D**as S, Cho W, (2002). Roles of catalytic domain residues in interfacial binding and activation of group IV cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem*. **277** (26): 23838-46.

- Das S, Rafter JD, Kim KP, Gygi SP, Cho W, (2003). Mechanism of group IVA cytosolic phospholipase A (2) activation by phosphorylation. *J Biol Chem*. **278** (42): 41431-42.

- Das, S., Traynor-Kaplan, A., Reiner, D.S., Meng, T.C., and Gillin, F.D, (1991). A surface antigen of Giardia lamblia with a glycosylphosphatidylinositol anchor. *J Biol Chem* **266**: 21318–25.

- De Caterina R, Basta G, Madonna R, Statile D, Zimarino M, Gallina S, Procopio AD, (2000). Endothelial cell transfections: a way for studying promoter activity of genes involved in atherogenesis. *Ital Heart J*. Suppl **3**: S55-58.

- De Matteis MA, Luini A, (2008). Exiting the Golgi complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9 **(**4): 273-84.

- DeNigris SJ, Hamosh M, Kasbekar DK, Lee TC, Hamosh P, (1988). Lingual and gastric lipases: species differences in the origin of prepancreatic digestive lipases and in the localization of gastric lipase. *Biochim Biophys Acta*. **959**: 38-45.

- Dennis EA, (1994). Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J Biol Chem.* **269** (18): 13057-60.

- Dennis EA, (2000). Phospholipase A2 in eicosanoid generation. *Am J Respir Crit Care Med*. **161** (2 Pt 2): S32-35.

- Dennis EA, Cao J, Hsu YH, Magrioti V, Kokotos G, (2011). Phospholipase A2 Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. *Chem. Rev*. **111**: 6130–85.

- Denys A, Hichami A, Khan NA, (2005). n-3 PUFAs modulate T-cell activation via protein kinase C-alpha and -epsilon and the NF kappa B signaling pathway. *J Lipid Res*. **46:** 752-58.

- Dessen A, Tang J, Schmidt H, Stahl M, Clark JD, Seehra J, Somers WS, (1999). Crystal structure of human cytosolic phospholipase A2 reveals a novel topology and catalytic mechanism. *Cell*. **97** (3): 349-60.

- Dexuan Ma, Minmin Z, Christian PL, Feng X, Wei H, Tetsumori Y, Ying M, Liangfu Z, (2010). DHA promotes the neuronal differentiation of rat neural stem cells transfected with GPR40 gene. *Brain Research*. **1330**: 1-8

- Dong Z, Liu Y, Scott KF, Levin L, Gaitonde K, Bracken RB, Burke B, Zhai QJ, Wang J, Oleksowicz L, Lu S, (2010). Secretory phospholipase A2-IIa is involved in prostate cancer progression and may potentially serve as a biomarker for prostate cancer. *Carcinogenesis*. **31** (11): 1948-55.

- Drewnowski A, Brunzell JD, Sande K, Iverius PH, Greenwood MR, (1985). Sweet tooth reconsidered: taste responsiveness in human obesity. *Physiol. Behav.* **35**: 617-22.

- Dreyer C, Keller H, Mahflmdi A, Laudet V, Krey G, Wahli W, (1993) Positive regulation of the peroxisomal β oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator activated receptors (PPAR). *Biol Cell* **77**: 67-76.

- **E**ndemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA, (1993). CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*. **268**: 11811-16.

- Esakov AI, Golubtsov KV, Solov'eva NA, (1983). Significance of serotonin in the activity of the taste receptor apparatus of the frog Rana temporaria (in Russian). *Zh Evol Biokhim Fiziol.* **19**: 62-67.

- **F**enard D, Lambeau G, Maurin T, Lefebvre JC, Doglio A, (2001). A peptide derived from bee venom-secreted phospholipase A2 inhibits replication of T-cell tropic HIV-1 strains via interaction with the CXCR4 chemokine receptor. *Mol Pharmacol*. **60** (2): 341-47.

- Feng DD, Luo Z, Roh SG, Hernandez M, Tawadros N, Keating DJ, Chen C, (2006). Reduction in voltage-gated K+ currents in primary cultured rat pancreatic beta-cells by linoleic acids. *Endocrinology*. **147**: 674-82.

- Feske S, (2009). ORAI1 and STIM1 deficiency in human and mice: roles of store-operated Ca2+ entry in the immune system and beyond *Immunol Rev*. **231** (1): 189-209.

- Feske S, (2010). CRAC channelopathies. *Pflugers Arch*. **460** (2): 417-35.

- Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao A, (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*. **441** (7090): 179-85.

- Finger TE, (2005). Cell types and lineages in taste buds. *Chem Senses*. **l 1**: i54-i55

- Flood C, Gustafsson M, Pitas RE, Arnaboldi L, Walzem RL, Borén J, (2004). Molecular mechanism for changes in proteoglycan binding on compositional changes of the core and the surface of low-density lipoprotein-containing human apolipoprotein B100. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **24** (3): 564-70.

- Foreman-Wykert AK, Weinrauch Y, Elsbach P, Weiss J, (1999). Cell-wall determinants of the bactericidal action of group IIA phospholipase A2 against Gram-positive bacteria. *J Clin Invest*. **103** (5): 715-21.

- Fredriksson R, Hoglund PJ, Gloriam DE, Lagerstrom MC, and Schioth HB, (2003). Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. *FEBS Lett.* **554**: 381–88

- Friedman JM, Halaas J, (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. **395** (6704): 763-70. Review.

- Frohman MA, Sung TC, Morris AJ, (1999). Mammalian phospholipase D structure and regulation. *Biochim Biophys Acta*. **1439**: 175-86. Review.

- Fukuwatari T, Kawada T, Tsuruta M, Hiraoka T, Iwanaga T, Sugimoto E, Fushiki T, **(**1997). Expression of the putative membrane fatty acid transporter (FAT) in taste buds of the circumvallate papillae in rats. *FEBS Lett.* **414**: 461-64.

- Fumeron F, Brigant L, Ollivier V, de Prost D, Driss F, Darcet P, Bard JM, Parra HJ, Fruchart JC, Apfelbaum M, (1991). *n*-3 polyunsaturated fatty acids raise low-density lipoproteins, high-density lipoprotein 2, and plasminogen-activator inhibitor in healthy young men. *Am J Clin Nutr*. **54** (1): 118-22.

- **G**aillard D, Laugerette F, Darcel N, El-Yassimi A, Passilly-Degrace P, Hichami A, Khan NA, Montmayeur JP, Besnard P,(2008). The gustatory pathway is involved in CD36-mediated orosensory perception of long-chain fatty acids in the mouse. *FASEB J.* **22**: 1458-68.

- Ganchrow JR, Ganchrow D, (1989). Long-term effects of gustatory neurectomy on fungiform papillae in the young rat. *Anat Rec*. **225**: 224-31.

- Gesquiere L, Cho W, Subbaiah PV, (2002). Role of group IIa and group V secretory phospholipases A (2) in the metabolism of lipoproteins. Substrate specificities of the enzymes and the regulation of their activities by sphingomyelin. *Biochemistry*. **41** (15): 4911-20.

- Ghosh M, Tucker DE, Burchett SA, Leslie CC, (2006). Properties of the Group IV phospholipase A2 family. *Prog Lipid Res.* **45** (6): 487-10.
- Gilbertson TA, (1998). Gustatory mechanisms for the detection of fat. *Curr Opin Neurobiol*. **8**: 447-52.
- Gilbertson TA, Damak S, Margolskee RF, (2000). The molecular physiology of taste transduction. *Curr Opin Neurobiol*. **10**: 519-27.
- Gilbertson TA, Fontenot DT, Liu L, Zhang H, Monroe WT, (1997). Fatty acid modulation of K^+ channels in taste receptor cells: gustatory cues for dietary fat. *Am J Physiol.* **272** (4Pt 1): C1203–10.
- Gora S, Lambeau G, Bollinger JG, Gelb M, Ninio E, Karabina SA, (2006). The proinflammatory mediator Platelet Activating Factor is an effective substrate for human group X secreted phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta*. **1761** (9): 1093-99.
- Granata F, Nardicchi V, Loffredo S, Frattini A, Ilaria Staiano R, Agostini C, Triggiani M, (2009). Secreted phospholipases A(2): A proinflammatory connection between macrophages and mast cells in the human lung. *Immunobiology*. **214** (9-10): 811-21.
- Greenwalt DE, Tandon NN, (1994). Platelet shape change and Ca2+ mobilization induced by collagen, but not thrombin or ADP, are inhibited by phenylarsine oxide. *Br J Haematol*. **88**: 830-38.
- Greenwalt, DE, Lipsky RH, Ockenhouse, CF Ikeda H, Tandon NN, Jamieso, GA, (1992). Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood*. **80**: 1105-15.
- Gregory A, Westaway SK, Holm IE, Kotzbauer PT, Hogarth P, Sonek S, Coryell JC, Nguyen TM, Nardocci N, Zorzi G, Rodriguez D, Desguerre I, Bertini E, Simonati A, Levinson B, Dias C, Barbot C, Carrilho I, Santos M, Malik I, Gitschier J, Hayflick SJ, (2008). Neurodegeneration associated with genetic defects in phospholipase A (2). *Neurology*. **71** (18): 1402-09.
- Grönroos JO, Laine VJ, Nevalainen TJ, (2002). Bactericidal group IIA phospholipase A2 in serum of patients with bacterial infections. *J Infect Dis*.**185** (12): 1767-72.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. (1985) A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. **260**: 3440-50.
- Guth L, (1957). The effects of glossopharyngeal nerve transection on the circumvallate papilla of the rat. Anat Rec **128**: 715-31.
- Guy JE, Ståhl U, Lindqvist Y, (2009). Crystal structure of a class XIB phospholipase A2 (PLA2): rice (oryza sativa) isoform-2 pla2 and an octanoate complex. *J Biol Chem.* **284** (29): 19371-79.

- Gwack Y, Srikanth S, Feske S, Cruz-Guilloty F, Oh-hora M, Neems DS, Hogan PG, Rao A, (2007). Biochemical and functional characterization of Orai proteins. *J Biol Chem*. **282** (22): 16232-43.

- **H**ajnal A, Klemenz R, Schäfer R, (1994). Subtraction cloning of H-rev107, a gene specifically expressed in H-ras resistant fibroblasts. *Oncogene*. **9** (2): 479-90.

- Hallstrand TS, Lai Y, Ni Z, Oslund RC, Henderson WR Jr, Gelb MH, Wenzel SE, (2011). Relationship between levels of secreted phospholipase A2 groups IIA and X in the airways and asthma severity. *Clin Exp Allergy*. **41** (6): 801-10.

- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ, (1981). Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membranes patches. *Pflugers Arch*. **391** (2): 85-100.

- Hamilton CL, (1964). Rat's preference for high fat diets. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **58** (3): 459-67.

- Hammond SM, Altshuller YM, Sung TC, Rudge SA, Rose K, Engebrecht J, Morris AJ, Frohman MA., (1995). Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. *J Biol Chem*. **270**: 29640-43.

- Hamosh M, Burns WA. (1977) Lipolytic activity of human lingual glands (Ebner). *Lab Invest*. **37**: 603-08

- Hamosh M, Scow RO. (1973, a) Lingual lipase and its role in the digestion of dietary lipid. *J Clin Invest*. **52**: 88-95.

- Hamosh M, Scow RO. (1973, b) Lingual lipase. *Symp Oral Sens Percept*. **4**: 311-22. Review.

- Hanasaki K, Ono T, Saiga A, Morioka Y, Ikeda M, Kawamoto K, Higashino K, Nakano K, Yamada K, Ishizaki J, Arita H, (1999). Purified group X secretory phospholipase A (2) induced prominent release of arachidonic acid from human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem*. **274** (48): 34203-11.

- Harmon CM, Luce P, Beth AH, Abumrad NA, (1991). Labeling of adipocyte membranes by sulfo-N-succinimidyl derivatives of long-chain fatty acids: inhibition of fatty acid transport. *J Membr Biol*, **121**: 261-68.

- Hattori K, Adachi H, Matsuzawa A, Yamamoto K, Tsujimoto M, Aoki J, Hattori M, Arai H, Inoue K, (1996). cDNA cloning and expression of intracellular platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase II. Its homology with plasma PAF acetylhydrolase. *J Biol Chem*. **271** (51): 33032-38.

- Hattori M, Adachi H, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K, (1994). Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase [corrected]. *Nature*. **370** (6486): 216-18.

- Hefner Y, Borsch-Haubold AG, Murakami M, Wilde JI, Pasquet S, Schieltz D, Ghomashchi F, Yates JR 3rd, Armstrong CG, Paterson A, Cohen P, Fukunaga R, Hunter T, Kudo I, Watson SP, Gelb MH, (2000). Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 by MNK1-related protein kinases. *J Biol Chem*. **275** (48): 37542-51.

- Henderson WR Jr, Chi EY, Bollinger JG, Tien YT, Ye X, Castelli L, Rubtsov YP, Singer AG, Chiang GK, Nevalainen T, Rudensky AY, Gelb MH, (2007). Importance of group X-secreted phospholipase A2 in allergen-induced airway inflammation and remodeling in a mouse asthma model. *J Exp Med*. **204**(4): 865-77.

- Hennen G, (1995). Les matériaux biologiques de base. *In: Hennen G., Biochimie 1er cycle*. Dunod (Paris) : **8**-35.

- Herness MS et Gilbertson TA, (1999). Cellular mechanisms of taste transduction. *Annu Rev Physiol*. **61**: 873-900.

- Hichami A, Joshi B, Simonin AM, Khan NA, (2002). Role of three isoforms of phospholipase A2 in capacitative calcium influx in human T-cells. *Eur J Biochem*. **269**(22):5557-63.

- Hiraoka M, Abe A, Lu Y, Yang K, Han X, Gross RW, Shayman JA, (2006). Lysosomal phospholipase A2 and phospholipidosis. *Mol Cell Biol*. **26** (16): 6139-48.

- Hiraoka M, Abe A, Shayman JA, (2002). Cloning and characterization of a lysosomal phospholipase A2, 1-O-acylceramide synthase. *J Biol Chem*. **277** (12): 10090-99.

- Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S, and Tsujimoto G, (2005). Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120, *Nat. Med*. **11**:90–94

- Ho YS, Swenson L, Derewenda U, Serre L, Wei Y, Dauter Z, Hattori M, Adachi T, Aoki J, Arai H, Inoue K, Derewenda ZS, (1997). Brain acetylhydrolase that inactivates platelet-activating factor is a G-protein-like trimer. *Nature*. **385** (6611): 89-93.

- Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Shamel L, Hartung T, Zahringer U, Beutler B, (2005). CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature*. **433**: 523-27.

- Hoon MA, Adler E, Lindemeier J, Battey JF, Ryba NJ and Zuker CS, (1999). Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific gpcrs with distinct topographic selectivity. *Cell*, **96**: 541–551.

- Horrobin DF, (1998). Schizophrenia: the illness that made us human. *Med Hypotheses*. **50** (4): 269-88.

- Hoth M, Penner R, (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*. **355** (6358): 353-56.

- Houtkooper RH, Turkenburg M, Poll-The BT, Karall D, Pérez-Cerdá C, Morrone A, Malvagia S, Wanders RJ, Kulik W, Vaz FM, (2009). The enigmatic role of tafazzin in cardiolipin metabolism. *Biochim Biophys Acta*. **1788** (10): 2003-14.

- Hovath TL, (2005). The hardship of obesity: a soft-wired hypothalamus. *Nat. Neurosc.* **8**: 561-65.

- Hsu YH, Burke JE, Li S, Woods VL Jr, Dennis EA, (2009). Localizing the membrane binding region of Group VIA Ca2+-independent phospholipase A2 using peptide amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *J Biol Chem.* **284** (35): 23652-61.

- Hsu YH, Burke JE, Stephens DL, Deems RA, Li S, Asmus KM, Woods VL Jr, Dennis EA, (2008). Calcium binding rigidifies the C2 domain and the intradomain interaction of GIVA phospholipase A2 as revealed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *J Biol Chem*. **283** (15): 9820-27.

- Huang MM, Bolen JB, Barnwell JW, Shattil SJ, Brugge JS, (1991). Membrane glycoprotein IV (CD36) is physically associated with the Fyn, Lyn, and Yes protein-tyrosine kinases in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**:7844-48.

- Huang YJ, Maruyama Y, Lu KS, Pereira E, Plonsky I, Baur JE, Wu D, Roper SD, (2005). Mouse taste buds use serotonin as a neurotransmitter. *J Neurosci*. **25**: 843-47.

- Huggins KW, Boileau AC, Hui DY, (2002). Protection against diet-induced obesity and obesity- related insulin resistance in Group 1B PLA2-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **283** (5): E994-E1001.

- Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, Ogi K, Hosoya M, Tanaka Y, Uejima H, Tanaka H, Maruyama M, Satoh R, Okubo S, Kizawa H, Komatsu H, Matsumura F, Noguchi Y, Shinohara T, Hinuma S, (2003). Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* **422**: 173–76

- **I**vandic B, Castellani LW, Wang XP, Qiao JH, Mehrabian M, Navab M, Fogelman AM, Grass DS, Swanson ME, de Beer MC, de Beer F, Lusis AJ, (1999). Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis: 1. Increased atherogenesis and altered lipoproteins in transgenic mice expressing group IIa phospholipase A2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **19** (5): 1284-90.

- **J**aworski K, Ahmadian M, Duncan RE, Sarkadi-Nagy E, Varady KA, Hellerstein MK, Lee HY, Samuel VT, Shulman GI, Kim KH, de Val S, Kang C, Sul HS, (2009). AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high-fat feeding or leptin deficiency. *Nat Med*. **15** (2): 159-68.

- Jayaraman T, Ondriasova E, Ondrias K, Harnick DJ, Marks AR, (1995). The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is essential for T-cell receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**: 6007-11

- Jenkins CM, Han X, Yang J, Mancuso DJ, Sims HF, Muslin AJ, Gross RW, (2003). Purification of recombinant human cPLA2 gamma and identification of C-terminal farnesylation, proteolytic processing, and carboxymethylation by MALDI-TOF-TOF analysis. *Biochemistry*. **42** (40): 11798-07.

- Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, Sims HF, Gibson B, Gross RW, (2004). Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem*. **279** (47): 4896875-.

- Jenkins CM, Wolf MJ, Mancuso DJ, Gross RW, (2001). Identification of the calmodulin-binding domain of recombinant calcium-independent phospholipase A2 beta implications for structure and function. *J Biol Chem*. **276** (10): 7129-35.

- Ji W, Xu P, Li Z, Lu J, Liu L, Zhan Y, Chen Y, Hille B, Xu T, Chen L, (2008). Functional stoichiometry of the unitary calcium-release-activated calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105** (36):13668-73.

- Jiang J, Neubauer BL, Graff JR, Chedid M, Thomas JE, Roehm NW, Zhang S, Eckert GJ, Koch MO, Eble JN, Cheng L, (2002). Expression of group IIA secretory phospholipase A2 is elevated in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma. *Am J Pathol*. **160** (2):667-71.

- Jin XH, Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N, (2007). Discovery and characterization of a Ca2+-independent phosphatidylethanolamine N-acyltransferase generating the anandamide precursor and its congeners. *J Biol Chem*. **282** (6):3614-23.

- Johansson LE, Lindblad U, Larsson CA, Råstam L, Ridderstråle M, (2008). Polymorphisms in the adiponutrin gene are associated with increased insulin secretion and obesity. *Eur J Endocrinol*. **159** (5):577-83.

- Jones PM, Turner KM, Djordjevic JT, Sorrell TC, Wright LC, George AM, (2007). Biochemistry. Role of conserved active site residues in catalysis by phospholipase B1 from Cryptococcus neoformans. **46** (35):10024-32.

- June CH, Fletcher MC, Ledbetter JA, Schieven GL, Siegel JN, Phillips AF, Samelson LE, (1990). Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents T-cell receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **87**:7722-26.

- **K**alyvas A, Baskakis C, Magrioti V, Constantinou-Kokotou V, Stephens D, López-Vales R, Lu JQ, Yong VW, Dennis EA, Kokotos G, David S, (2009). Differing roles for members of the phospholipase A2 superfamily in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain*. **132** (Pt 5):1221-35.

- Kalyvas A, David S, (2004). Cytosolic phospholipase A2 plays a key role in the pathogenesis of multiple sclerosis-like disease. *Neuron*. **41** (3): 323-35.

- Karabina SA, Brochériou I, Le Naour G, Agrapart M, Durand H, Gelb M, Lambeau G, Ninio E, (2006). Atherogenic properties of LDL particles modified by human group X secreted phospholipase A2 on human endothelial cell function. *FASEB J*. **20** (14):2547-49.

- Kataoka S, Yang R, Ishimaru Y, Matsunami H, Sévigny J, Kinnamon JC, Finger TE, (2008). The candidate sour taste receptor, PKD2L1, is expressed by type III taste cells in the mouse. *Chem Senses*. **33** (3):243-54.

- Kawai T, Fushiki T. (2003) Importance of lipolysis in oral cavity for orosensory detection of fat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. **285**: R447-54

- Kaya N, Shen T, Lu SG, Zhao FL, Herness S, (2004). A paracrine signaling role for serotonin in rat taste buds: expression and localization of serotonin receptor subtypes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. **286**: R649-58.

- Khan NA, Besnard P, (2009). Oro-sensory perception of dietary lipids: New insights into the fat taste transduction. *Biochimica Biophys. Acta* **1791** (3): 149-55.

- Khan NA, Gaillard D, El-Yassimi A, Passilly-Degrace P, Hichami A, Besnard P, (2008). Unraveling the downstream signalling of gustatory perception of lipids. *Med. Sci.* **24**: 692-93.

- Khan NA, Moulinoux JP, Deschaux P, (1996). Putrescine modulation of depolarization-induced [^{3}H]-serotonin release from fish brain synaptosomes. *Neurosci Lett*. **212**(1):45-48.

- Kienesberger PC, Oberer M, Lass A, Zechner R, (2009). Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *J Lipid Res*. **50 Suppl**: S63-68.

- Kim DJ, Roper SD, (1995). Localization of serotonin in taste buds: a comparative study in four vertebrates. *J Comp Neurol*. **35**:364-70.

- Kim JO, Chakrabarti BK, Guha-Niyogi A, Louder MK, Mascola JR, Ganesh L, Nabel GJ, (2007). Lysis of human immunodeficiency virus type 1 by a specific secreted human phospholipase A2. *J Virol*. **81**(3):1444-50.

- Kim SJ, Gershov D, Ma X, Brot N, Elkon KB, (2002). I-PLA (2) activation during apoptosis promotes the exposure of membrane lysophosphatidylcholine leading to binding by natural immunoglobulin M antibodies and complement activation. *J Exp Med*. **196** (5):655-65.

- Kim TS, Sundaresh CS, Feinstein SI, Dodia C, Skach WR, Jain MK, Nagase T, Seki N, Ishikawa K, Nomura N, Fisher AB, (1997). Identification of a human cDNA clone for lysosomal type Ca2+-independent phospholipase A2 and properties of the expressed protein. *J Biol Chem*. **272** (4):2542-50.

- Kim YJ, Kim KP, Han SK, Munoz NM, Zhu X, Sano H, Leff AR, Cho W, (2002). Group V phospholipase A2 induces leukotriene biosynthesis in human neutrophils through the activation of group IVA phospholipase A2. *J Biol Chem*. **277** (39):36479-88.

- Kodaki T, Yamashita S, (1997). Cloning, expression, and characterization of a novel phospholipase D complementary DNA from rat brain. *J Biol Chem*. **272**:11408-13

- Koduri RS, Grönroos JO, Laine VJ, Le Calvez C, Lambeau G, Nevalainen TJ, Gelb MH, (2002). Bactericidal properties of human and murine groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A(2). *J Biol Chem*. **277**(8):5849-57.

- Koizumi H, Yamaguchi N, Hattori M, Ishikawa TO, Aoki J, Taketo MM, Inoue K, Arai H, (2003). Targeted disruption of intracellular type I platelet activating factor-acetylhydrolase catalytic subunits causes severe impairment in spermatogenesis. *J Biol Chem*. **278**(14):12489-94.

- Kokotos G, Six DA, Loukas V, Smith T, Constantinou-Kokotou V, Hadjipavlou-Litina D, Kotsovolou S, Chiou A, Beltzner CC, Dennis EA, (2004). Inhibition of group IVA cytosolic phospholipase A2 by novel 2-oxoamides in vitro, in cells, and in vivo. *J Med Chem*. **47**(14):3615-28.

- Kono N, Inoue T, Yoshida Y, Sato H, Matsusue T, Itabe H, Niki E, Aoki J, Arai H, (2008). Protection against oxidative stress-induced hepatic injury by intracellular type II platelet-activating factor acetylhydrolase by metabolism of oxidized phospholipids in vivo. *J Biol Chem*. **283**(3):1628-36.

- Kramer RM, Checani GC, Deykin A, Pritzker CR, Deykin D (1986). Solubilization and properties of Ca2+-dependent human platelet phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta*. **878**(3):394-403.

- Kramer RM, Hession C, Johansen B, Hayes G, McGray P, Chow EP, Tizard Pepinsky RB, (1989). Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A2. *J Biol Chem*. **264**(10):5768-75.

- Kramer RM, Roberts EF, Manetta J, Putnam JE, (1991). The Ca2(+)-sensitive cytosolic phospholipase A2 is a 100-kDa protein in human monoblast U937 cells. J Biol Chem. **266**(8):5268-72.

- Kromann N, Green A, (1980). Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland Incidence of some chronic diseases 1950-1974. *Acta Med Scand*. **208** (5): 401-06.

- Kromhout D, (1989). Food consumption patterns in the Seven Countries Study. Seven Countries Study Research Group. *Ann Med*. **21** (3): 237-38.

- Kuda O, Jenkins CM, Skinner JR, Moon SH, Su X, Gross RW, Abumrad NA, (2011). CD36 Protein Is Involved in Store-operated Calcium Flux, Phospholipase A2 Activation, and Production of Prostaglandin E2. *J. Biol. Chem*. **286** (20): 17785–95.

- Kudo I, Murakami M, (2002). Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **68-69**:3-58. Review.

- Kurian MA, Morgan NV, MacPherson L, Foster K, Peake D, Gupta R, Philip SG, Hendriksz C, Morton JE, Kingston HM, Rosser EM, Wassmer E, Gissen P, Maher ER, (2008). Phenotypic spectrum of neurodegeneration associated with mutations in the PLA2G6 gene (PLAN). *Neurology*. **70** (18):1623-29.

- **L**aine VJ, Grass DS, Nevalainen TJ, (1999). Protection by group II phospholipase A2 against Staphylococcus aureus. *J Immunol*. **162** (12):7402-08.

- Lamour NF, Chalfant CE, (2005). Ceramide-1-phosphate: the "missing" link in eicosanoid biosynthesis and inflammation. *Mol Interv*. **5** (6):358-67.

- Lander ES *et al*. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. **409**: 860-21.

- Laugerette F, Passilly-Degrace P, Patris B, Niot I, Febbraio M, Montmayeur JP, Besnard P, (2005). CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J. Clin. Investig.* **115***:* 3177-84.

- Lauritzen L, Hansen HS, Jørgensen MH, Michaelsen KF, (2001). The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res*. **40** (1-2): 1-94. Review.

- Lee WC, Salido E, Yen PH, (1994). Isolation of a new gene GS2 (DXS1283E) from a CpG island between STS and KAL1 on Xp22.3. *Genomics*. **22** (2):372-76.

- Lehr M, (1996). 3-(3,5-Dimethyl-4-octadecanoylpyrrol-2-yl)propionic acids as inhibitors of 85 kDa cytosolic phospholipase A2. *Arch Pharm* (Weinheim). **329** (11):483-8.

- Lei X, Barbour SE, Ramanadham S, (2010). Group VIA Ca2+-independent phospholipase A2 (iPLA2beta) and its role in beta-cell programmed cell death. *Biochimie*. **92** (6):627-37.

- LeMahieu RA, Carson M, Han RJ, Madison VS, Hope WC, Chen T, Morgan DW, Hendrickson HS, (1993). N-(carboxymethyl)-N-[3,5-bis(decyloxy)-phenyl]glycine (Ro 23-9358): a potent inhibitor of secretory phospholipases A2 with antiinflammatory activity. *J Med Chem*. **36** (20): 3029-31.

- Leslie CC, Channon JY, (1990). Anionic phospholipids stimulate an arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A2 from macrophages and reduce the calcium requirement for activity. *Biochim Biophys Acta*. **1045** (3):261-70.

- Leslie CC, Voelker DR, Channon JY, Wall MM, Zelarney PT, (1988). Properties and purification of an arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A2 from a macrophage cell line, RAW 264.7. *Biochim Biophys Acta*. **963** (3):476-92.

- Leung LL, Li WX, McGregor JL, Albrecht G, Howard RJ, (1992). CD36 peptides enhance or inhibit CD36-thrombospondin binding. A two-step process of ligand-receptor interaction. *J Biol Chem*. **267**:18244-50.

- Levy R, (2006).. The role of cytosolic phospholipase A2-alfa in regulation of phagocytic functions. *Biochim Biophys Acta*. **1761** (11):1323-34.

- Li Q, Cathcart MK, (1997). Selective inhibition of cytosolic phospholipase A2 in activated human monocytes. Regulation of superoxide anion production and low density lipoprotein oxidation. *J Biol Chem*. **272** (4):2404-11.

- Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ, (1993). cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell*. **72** (2):269-28.

- Lindemann B, (2001). Receptors and transduction in taste. *Nature*. **413**: 219-25.

- Lio YC, Dennis EA, (1998). Interfacial activation, lysophospholipase and transacylase activity of group VI Ca2+-independent phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta*. **1392** (2-3):320-32.

- Lio YC, Dennis EA, (1998). Interfacial activation, lysophospholipase and transacylase activity of group VI Ca2+-independent phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta.* **1392** (2-3):320-32.

- Lio YC, Reynolds LJ, Balsinde J, Dennis EA, (1996). Irreversible inhibition of Ca(2+)-independent phospholipase A2 by methyl arachidonyl fluorophosphonate. *Biochim Biophys Acta*. **1302** (1):55-60.

- Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE Jr, Meyer T,(2005). STIM is a Ca2+ sensor essential for Ca2+-store-depletion-triggered Ca2+ influx. *Curr Biol*. **15** (13):1235-41.

- Lishko PV, Procko E, Jin X, Phelps CB, Gaudet R, (2007). The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron*. **54** (6):905-18.

- Liu D, Liman ER, (2003). Intracellular Ca2+ and the phospholipid PIP2 regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**: 15160-65.

- Liu Y, Zhu Y, Rannou F, Lee TS, Formentin K, Zeng L, Yuan X, Wang N, Chien S, Forman BM, Shyy JY, (2004). Laminar flow activates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in vascular endothelial cells. Circulation. **110** (9):1128-33.

- Lombardo D, Dennis EA, (1985). Cobra venom phospholipase A2 inhibition by manoalide. A novel type of phospholipase inhibitor. *J Biol Chem*. **260** (12):7234-40.

- Lopez I, Arnold RS, Lambeth JD, (1998). Cloning and initial characterization of a human phospholipase D2 (hPLD2). ADP-ribosylation factor regulates hPLD2. *J Biol Chem*. **273**:12846-52.

- Luquet S, (2008). What's new in the regulation of eating? *Med Sci* (Paris). **24** (8-9): 680-82.
- Luttrell LM, Lefkowitz RJ, (2002). The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J. Cell Sci*. **115**: 455–65
- **M**a Z, Wang X, Nowatzke W, Ramanadham S, Turk J, (1999). Human pancreatic islets express mRNA species encoding two distinct catalytically active isoforms of group VI phospholipase A2 (iPLA2) that arise from an exon-skipping mechanism of alternative splicing of the transcript from the iPLA2 gene on chromosome 22q13.1. *J Biol Chem*. **274** (14):9607-16.
- MacPhee CH, Moores KE, Boyd HF, Dhanak D, Ife RJ, Leach CA, Leake DS, Milliner KJ, Patterson RA, Suckling KE, Tew DG, Hickey DM, (1999). Lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: use of a novel inhibitor. *Biochem J.* **338** (Pt 2):479-87.
- Makiyama T, Nagasaka N, Houjyo Y, Yamaura E, Nakamura H, Koide Y, Nishida A, Murayama T, (2010). Newly synthetic ceramide-1-phosphate analogs; their uptake, intracellular localization, and roles as an inhibitor of cytosolic phospholipase A(2)α and inducer of cell toxicity. *Biochem Pharmacol*. **80** (9):1396-06.
- Malhotra A, Edelman-Novemsky I, Xu Y, Plesken H, Ma J, Schlame M, Ren M, (2009). Role of calcium-independent phospholipase A2 in the pathogenesis of Barth syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **106** (7):2337-41.
- Mancuso DJ, Han X, Jenkins CM, Lehman JJ, Sambandam N, Sims HF, Yang J, Yan W, Yang K, Green K, Abendschein DR, Saffitz JE, Gross RW, (2007). Dramatic accumulation of triglycerides and precipitation of cardiac hemodynamic dysfunction during brief caloric restriction in transgenic myocardium expressing human calcium-independent phospholipase A2gamma. *J Biol Chem.* **282** (12): 9216-27.
- Mancuso DJ, Jenkins CM, Gross RW, (2000). The genomic organization, complete mRNA sequence, cloning, and expression of a novel human intracellular membrane-associated calcium-independent phospholipase A (2). *J Biol Chem*. **275** (14):9937-45.
- Mancuso DJ, Jenkins CM, Gross RW, (2010). The Genomic Organization, Complete mRNA Sequence, Cloning, and Expression of a Novel Human Intracellular Membrane-associated Calcium-independent Phospholipase A2. *The J of Biol Chem.* **275**:9937-45.
- Manji SS, Parker NJ, Williams RT, van Stekelenburg L, Pearson RB, Dziadek M, Smith PJ, (2000). STIM1: a novel phosphoprotein located at the cell surface. *Biochim Biophys Acta.* **1481**(1):147-55.
- Martin A, (2001). Apports nutritionnels conseillés pour la population française, *Tec & Doc Lavoisier* **(**Paris), **3e éd**.

- Martin C, Passilly-Degrace P, Gaillard D, Merlin JF, Chevrot M, Besnard P, (2011). The lipid-sensor candidates CD36 and GPR120 are differentially regulated by dietary lipids in mouse taste buds: impact on spontaneous fat preference. *PLoS One*. **6** (8):e24014.

- Matoba Y, Katsube Y, Sugiyama M, (2002). The crystal structure of prokaryotic phospholipase A2. *J Biol Chem*. **277** (22):20059-69.

- Matsumura S., Mizushige T., Yoneda T., Iwanaga T., Tsuzuki S., Inoue K. and Fushiki T, (2007). GPR expression in the rat taste bud relating to fatty acid sensing. *Biomed. Res*. **28**:49–55

- Matsuzawa A, Hattori K, Aoki J, Arai H, Inoue K, (1997). Protection against oxidative stress-induced cell death by intracellular platelet-activating factor-acetylhydrolase II. *J Biol Chem*. **272**(51):32315-20.

- Mattes RD, (2009) Is There a Fatty Acid Taste? *Annu. Rev. Nutr*. **29**: 305-27.

- Mattsson N, Magnussen CG, Rönnemaa T, Mallat Z, Benessiano J, Jula A, Taittonen L, Kähönen M, Juonala M, Viikari JS, Raitakari OT, (2010). Metabolic syndrome and carotid intima-media thickness in young adults: roles of apolipoprotein B, apolipoprotein A-I, C-reactive protein, and secretory phospholipase A2: the cardiovascular risk in young Finns study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **30** (9):1861-66.

- Max M, Margolskee RF, (1999). Ggamma13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP3 responses to bitter denatonium. *Nat Neurosci*. **2**:1055–62

- McDermott M, Wakelam MJ, Morris AJ, (2004). Phospholipase D. *Biochem Cell Biol.* **82**:225-53.

- Mela DJ, (1988). Sensory assessment of fat content in fluid dairy products. *Appetite*. **10**: 37-44.

- Mela DJ, Sacchetti DA, (1991). Sensory preferences for fats: relationships with diet and body composition. Am. J. Clin. Nutr. **53**: 908-15.

- Menschikowski M, Hagelgans A, Siegert G, (2006). Secretory phospholipase A2 of group IIA: is it an offensive or a defensive player during atherosclerosis and other inflammatory diseases? *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. **79** (1-2):1-33.

- Mercer JC, Dehaven WI, Smyth JT, Wedel B, Boyles RR, Bird GS, Putney JW Jr, (2006). Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. *J Biol Chem*. **281** (34):24979-90.

- Meyer AM, Dwyer-Nield LD, Hurteau GJ, Keith RL, O'Leary E, You M, Bonventre JV, Nemenoff RA, Malkinson AM, (2004). Decreased lung tumorigenesis in mice genetically deficient in cytosolic phospholipase A2. *Carcinogenesis*. **25** (8):1517-24.

- Mignen O, Thompson JL, Shuttleworth TJ, (2003). Ca2+ selectivity and fatty acid specificity of the noncapacitative, arachidonate-regulated Ca2+ (ARC) channels. *J Biol Chem*. **278** (12):10174-81.

- Mignen O, Thompson JL, Shuttleworth TJ, (2009). The molecular architecture of the arachidonate-regulated Ca2+-selective ARC channel is a pentameric assembly of Orai1 and Orai3 subunits. *J Physiol*. **587** (Pt.17):4181-97.

- Miller IJ, (1971). Peripheral interactions among single papilla inputs to gustatory nerve fibers. *J Gen Physiol*. **57**:1-25

- Miller WE, Lefkowitz RJ, (2001). Expanding roles for beta-arrestins as scaffolds and adapters in GPCR signaling and trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol*. **13**: 139-45.

- Mira JP, Dubois T, Oudinet JP, Lukowski S, Russo-Marie F, Geny B, (1997). Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin V in differentiated permeabilized HL-60 cells. Evidence of crucial importance of domain I type II Ca2+-binding site in the mechanism of inhibition. *J Biol Chem*. **272** (16):10474-82.

- Mitsuishi M, Masuda S, Kudo I, Murakami M, (2006). Group V and X secretory phospholipase A2 prevents adenoviral infection in mammalian cells. *Biochem J.* **393** (Pt 1): 97-106.

- Mitsuishi M, Masuda S, Kudo I, Murakami M, (2007). Human group III phospholipase A2 suppresses adenovirus infection into host cells. Evidence that group III, V and X phospholipase A2s act on distinct cellular phospholipid molecular species. *Biochim Biophys Acta*. **1771** (11):1389-96.

- Miyamoto T, Miyazaki T, Okada Y, Sato T, (1996). Whole-cell recording from non-dissociated taste cells in mouse taste bud. *J Neurosci Methods*. **64**:245-52.

- Miyoshi MA, Abe K, and Emori Y, (2001). Ip (3) receptor type 3 and Plcbeta2 Are co-expressed with taste receptors T1r and T2r in rat taste bud cells. *Chem. Senses*. **26**: 259–65.

- Mizushige T, Kawai T, Matsumura S, Yoneda T, Kawada T, Tsuzuki S, Inoue K, Fushiki T, (2006). POMC and orexin mRNA expressions induced by anticipation of a corn-oil emulsion feeding are maintained at the high levels until oil ingestion. Biomed Res. **27**(5):227-32.

- Montell C, (1997). New light on TRP and TRPL. *Mol.Pharmacol*. **52** (5): 755-763.

- Moreau H, Gargouri Y, Lecat D, Junien JL & Verger R, (1988). Screening of preduodenal lipases in several mammals. *Biochim Biophys Acta.* **959:** 247-52.

- Mori TA, Beilin LJ, (2004). Omega-3 fatty acids and inflammation. *Curr Atheroscler Rep*. **6** (6):461-67.

- Mosior M, Six DA, Dennis EA, (1998). Group IV cytosolic phospholipase A2 binds with high affinity and specificity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate resulting in dramatic increases in activity. *J Biol Chem*. **273** (4): 2184-91.

- Murakami M, Masuda S, Kudo I, (2003). Arachidonate release and prostaglandin production by group IVC phospholipase A2 (cytosolic phospholipase A2gamma). *Biochem J*. **372** (Pt 3):695-702.

- Murphy RC, Hammarström S, Samuelsson B, (1979). Leukotriene C: a slow-reacting substance from murine mastocytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **76** (9):4275-79.

- Murray RG, (1973). The ultrastructure of taste buds. The ultrastructure of the sensory organs. In: *Friedmann I*. (North Holland, Amsterdam): **1**:88.

- Murray RG, (1986). The mammalian taste bud type III cell: a critical analysis. *Eur Heart J*. **7** (3):217-22.

- **N**agai T, Delay RJ, Welton J, Roper SD, (1998). Uptake and release of neurotransmitter candidates, [^{3}H] serotonin, [^{3}H] glutamate, and [^{3}H] gamma-aminobutyric acid, in taste buds of the mudpuppy, Necturus maculosus. *J Comp Neurol*. **392**: 199-208.

- Nagai T, Kim DJ, Delay RJ, Roper SD, (1996). Neuromodulation of transduction and signal processing in the end organs of taste. *Chem Senses*. **21**: 353-65.

- Nakamura H, Hirabayashi T, Shimizu M, Murayama T, (2006). Ceramide-1-phosphate activates cytosolic phospholipase A2alpha directly and by PKC pathway. *Biochem Pharmacol*. **71**(6):850-57.

- Nelson GM, Finger TE, (1993). Immunolocalization of different forms of neural cell adhesion molecule (NCAM) in rat taste buds. *J Comp Neurol*. **336**:507-16.

- Neuringer M, Connor WE, Lin DS, Barstad L, Luck S, (1986). Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal omega 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **83** (11): 4021-25.

- Niot I, Poirier H, Besnard P, (1997). Regulation of gene expression by fatty acids: special reference to fatty acid-binding protein (FABP). *Biochimie*. **79** (2-3:129-33.

- Nishizuka Y, (1986). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*. **233**:305-12. Review

- Nishizuka Y, (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*. **25** [334(6184)]: 661-65. Review.

- Notari L, Baladron V, Aroca-Aguilar JD, Balko N, Heredia R, Meyer C, Notario PM, Saravanamuthu S, Nueda ML, Sanchez-Sanchez F, Escribano J, Laborda J, Becerra SP, (2006). Identification of a lipase-linked cell membrane receptor for pigment epithelium-derived factor. *J Biol Chem*. **281**(49):38022-37.

- Nysenbaum AN, Smart JL , (1982). Sucking behaviour and milk intake of neonates in relation to milk fat content. *Early Hum Dev.* **6** (2): 205-**213**.
- **O**bici S, Feng Z, Morgan K, Stein D, Karkanias G, Rossetti L. Diabetes, (2002). Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. **51** (2): 271-75.
- Ockenhouse CF, Tandon NN, Magowan C, Jamieson GA, Chulay JD, (1989). Identification of a platelet membrane glycoprotein as a falciparum malaria sequestration receptor. *Science*. **243**:1469-71.
- Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM, Olefsky JM, (2010). GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell*. **142**: 687-98.
- Ohto T, Uozumi N, Hirabayashi T, Shimizu T, (2005). Identification of novel cytosolic phospholipase A(2)s, murine cPLA(2){delta}, {epsilon}, and {zeta}, which form a gene cluster with cPLA(2){beta}. *J Biol Chem*. **280** (26):24576-83.
- Oikawa Y, Yamato E, Tashiro F, Yamamoto M, Uozumi N, Shimada A, Shimizu T, Miyazaki J, (2005). Protective role for cytosolic phospholipase A2alpha in autoimmune diabetes of mice. *FEBS Lett*. **579** (18):3975-78.
- Oike H, Matsumoto I, Abe K, (2006, a). Group IIA phospholipase A(2) is coexpressed with SNAP-25 in mature taste receptor cells of rat circumvallate papillae. *J Comp Neurol.* **494**:876-86.
- Oike H, Wakamori M, Mori Y, Nakanishi H, Taguchi R, Misaka T, Matsumoto I, Abe K, (2006, b). Arachidonic acid can function as a signaling modulator by activating the TRPM5 cation channel in taste receptor cells. *Biochim. Biophys. Acta*. **1761**:1078-84.
- Otten W, Iaizzo PA, Eichinger HM, (1997). Effects of a high n-3 fatty acid diet on membrane lipid composition of heart and skeletal muscle in normal swine and in swine with the genetic mutation for malignant hyperthermia. *J Lipid Res*. **38** (10): 2023-34.
- **P**arekh AB, Penner R, (1997). Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev.* **77**(4):901-30
- Parker NJ, Begley CG, Smith PJ, (1996). Fox RM. Molecular cloning of a novel human gene (D11S4896E) at chromosomal region 11p15.5. *Genomics*. **37** (2):253-56.
- Pathak N, Khandelwal S. Immunomodulatory role of piperine in cadmium induced thymic atrophy and splenomegaly in mice, (2009). *Env. Toxicol. Pharmacol*. **28** (1):52-60.
- Peinelt C, Vig M, Koomoa DL, Beck A, Nadler MJ, Koblan-Huberson M, Lis A, Fleig A, Penner R, Kinet JP, (2006). Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol*. **8** (7):771-73.

- Pepino MY, Love-Gregory L, Klein S, Abumrad NA, (2012). The fatty acid translocase gene CD36 and lingual lipase influence oral sensitivity to fat in obese subjects. *J Lipid Res*. **53** (3):561-66.

- Perisic O, Fong S, Lynch DE, Bycroft M, Williams RL, (1998). Crystal structure of a calcium-phospholipid binding domain from cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem*. **273** (3):1596-604.

- Pickard RT, Strifler BA, Kramer RM, Sharp JD, (1999). Molecular cloning of two new human paralogs of 85-kDa cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem*. **274** (13):8823-31.

- Pickard RT, Strifler BA, Kramer RM, Sharp JD, (1999). Molecular cloning of two new human paralogs of 85-kDa cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem*. **274** (13): 8823-31.

- Polit D, Beck C, Hungler BP, (2001) Essentials of Nursing Research: Methods, Appraisal and Utilisation. *Lippincott* **(**Philadelphia, PA). **5th Ed**.

- Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM, (2000). Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem*. **69**:419-45.

- Putney JW et McKay RR, (1999). Capacitative calcium entry channels. *Bioessays*. **21**:38-46.

- **R**ainier S, Bui M, Mark E, Thomas D, Tokarz D, Ming L, Delaney C, Richardson RJ, Albers JW, Matsunami N, Stevens J, Coon H, Leppert M, Fink JK, (2008). Neuropathy target esterase gene mutations cause motor neuron disease. *Am J Hum Genet*. **82** (3):780-85.

- Ramanadham S, Hsu FF, Zhang S, Jin C, Bohrer A, Song H, Bao S, Ma Z, Turk J, (2004). Apoptosis of insulin-secreting cells induced by endoplasmic reticulum stress is amplified by overexpression of group VIA calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2 beta) and suppressed by inhibition of iPLA2 beta. *Biochemistry*. **43** (4):918-30.

- Ramdriamampita C, Tsien RY, (1993). Emptying of intracellular Ca2+ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca2+ influx. *Nature*. **364** (6440):809-14.

- Randriamampita C, Tsien RY, (1993). Emptying of intracellular Ca2+ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca2+ influx. *Nature*. **364**:809-14.

- Raybould HE, (2007). Mechanisms of CCK signaling from gut to brain. *Curr Opin Pharmacol*. **7**(6): 570-74. Review.

- Reddy BS, (1992). Dietary fat and colon cancer: animal model studies. Lipids **27**: 807–13

- Reynolds LJ, Hughes LL, Louis AI, Kramer RM, Dennis EA, (1993). Metal ion and salt effects on the phospholipase A2, lysophospholipase, and transacylase activities of human cytosolic phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta*. **1167** (3):272-80.

- Rhee SG, (2001). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem*. **70**:281-12. Review.

- Riendeau D, Guay J, Weech PK, Laliberté F, Yergey J, Li C, Desmarais S, Perrier H, Liu S, Nicoll-Griffith D, (1994). Arachidonyl trifluoromethyl ketone, a potent inhibitor of 85-kDa phospholipase A2, blocks production of arachidonate and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid by calcium ionophore-challenged platelets. *J Biol Chem*. **269** (22):15619-24.

- Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Gómez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, Murillo-Rodríguez E, Giuffrida A, LoVerme J, Gaetani S, Kathuria S, Gall C, Piomelli D, (2001). An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature*. **414** (6860): 209-12.

- Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH, (2008). Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet*. **40** (12):1461-65.

- Roper SD, (2006). Cell communication in taste buds. *Cell Mol. Life Sci*. **63**: 1494-500

- Roper SD, (2007). Signal transduction and information processing in mammalian taste buds. *Pflugers Arch*. **454** (5):759-76. Review.

- Rosado JA, Sage SO, (2002). The ERK cascade, a new pathway involved in the activation of store-mediated calcium entry in human platelets. *Trends Cardiovasc Med*. **12**:229-34.

- Rosenson RS, Gelb MH, (2009).. Secretory phospholipase A2: a multifaceted family of proatherogenic enzymes. *Curr Cardiol Rep*. **11** (6):445-51

- Rothrock DW, and Foster DM, (1990). Effects of fish oil on VLDL triglyceride kinetics in humans. *J. Lipid Res*. **31**: 1549–1558

- Rouault M, Bollinger JG, Lazdunski M, Gelb MH, Lambeau G, (2003). Novel mammalian group XII secreted phospholipase A2 lacking enzymatic activity. *Biochemistry*. **42** (39):11494-503.

- Roy CC, Roulet M, Lefebvre D, Chartrand L, Lepage G, Fournier LA, (1979). The role of gastric lipolysis on fat absorption and bile acid metabolism in the rat. Lipids. **14**: 811-15.

- Ruiz CJ, Stone LM, McPheeters M, Ogura T, Böttger B, Lasher RS, Finger TE, Kinnamon SC, (2001). Maintenance of rat taste buds in primary culture. *Chem Senses*. **26**:861-73.

- **S**aarela J, Jung G, Hermann M, Nimpf J, Schneider WJ, (2008). The patatin-like lipase family in Gallus gallus. *BMC Genomics*. **9**:281.

- Sabbioni S, Barbanti-Brodano G, Croce CM, Negrini M, (1997). GOK: a gene at 11p15 involved in rhabdomyosarcoma and rhabdoid tumor development. *Cancer Res*. **57** (20):4493-97.

- Saitou K, Yoneda T, Mizushige T, Asano H, Okamura M, Matsumura S, Eguchi A, Manabe Y, Tsuzuki S, Inoue K, Fushiki T, (2009). Contribution of gustation to the palatability of linoleic acid. *Physiol. Behav.* **96**: 142-48.

- Samanta U, Bahnson BJ, (2008). Crystal structure of human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: structural implication to lipoprotein binding and catalysis. *J Biol Chem*. **283** (46):31617-24.

- Sanchez T, Moreno JJ, (2001). The effect of high molecular phospholipase A2 inhibitors on 3T6 fibroblast proliferation. *Biochem Pharmacol*. **61** (7):811-16.

- Sanchez-Muniz FJ, Bastida S, Viejo JM, Terpstra AH, (1999). Small supplements of N-3 fatty acids change serum low density lipoprotein composition by decreasing phospholid and apolipoprotein B concentrations in young adult women. *Eur J Nutr*. **38** (1): 20-27.

- Sato H, Kato R, Isogai Y, Saka G, Ohtsuki M, Taketomi Y, Yamamoto K, Tsutsumi K, Yamada J, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, Kobayashi T, Ikeda K, Taguchi R, Hatakeyama S, Hara S, Kudo I, Itabe H, Murakami M, (2008). Analyses of group III secreted phospholipase A2 transgenic mice reveal potential participation of this enzyme in plasma lipoprotein modification, macrophage foam cell formation, and atherosclerosis. *J Biol Chem*. **283** (48):33483-97.

- Schaloske RH, Dennis EA (2006). The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta*. **1761** (11):1246-59.

- Scheid JL, De Souza MJ, Leidy HJ, Williams NI, (2011). Ghrelin but not peptide YY is related to change in body weight and energy availability. *Med Sci Sports Exerc*. **43** (11): 2063-71.

- Schenk U, Menna E, Kim T, Passafaro M, Chang S, De Camilli P, Matteoli M, (2005). A Novel Pathway for Presynaptic Mitogen-Activated Kinase Activation via AMPA Receptors. *J Neurosci*. **25** (7):1654–63.

- Schiffman SS, Suggs MS, Losee ML, Gatlin LA, Stagner WC, Bell RM, (1995). Effect of lipid-derived second messengers on electrophysiological taste responses in the gerbil. *Pharmacol Biochem Behav.* **52** (1): 49-58.

- Schoenborn V, Heid IM, Vollmert C, Lingenhel A, Adams TD, Hopkins PN, Illig T, Zimmermann R, Zechner R, Hunt SC, Kronenberg F, (2006). The ATGL gene is associated with free fatty acids, triglycerides, and type 2 diabetes. *Diabetes*. **55** (5):1270-75.

- Schulte G, Fredholm BB, (2003). Signaling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell. Signal*. **15**:813-27

- Sclafani A, Ackroff K, Abumrad NA, (2007). CD36 gene deletion reduces fat preference and intake but not post-oral fat conditioning in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **293** (5): R1823-32.

- Sedgwick SG, Smerdon SJ, (1999). The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem Sci*. **24** (8):311-16.
- Seilhamer JJ, Pruzanski W, Vadas P, Plant S, Miller JA, Kloss J, Johnson LK, (1989). Cloning and recombinant expression of phospholipase A2 present in rheumatoid arthritic synovial fluid. *J Biol Chem*. **264** (10):5335-38.
- Shridas P, Bailey WM, Gizard F, Oslund RC, Gelb MH, Bruemmer D, Webb NR, (2010). Group X secretory phospholipase A2 negatively regulates ABCA1 and ABCG1 expression and cholesterol efflux in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **30** (10):2014-21.
- Shuttleworth TJ, (2009). Arachidonic acid, ARC channels, and Orai proteins. *Cell Calcium*. **45** (6):602-10.
- Siddiqui, L.J. Jenski, K. Neff, K. Harvey, R.J. Kovacs, W. Stillwell Docosahexaenoic acid induces apoptosis in Jurcat cells by a protein phosphate mediated pathway, (2001). *Biochim. Biophys. Acta*. **1499**: 265–75
- Silverstein RL, (2009). Type 2 scavenger receptor CD36 in platelet activation: the role of hyperlipemia and oxidative stress. *Clin Lipidol*. **4**(6):767.
- Simons PJ, Kummer JA, Luiken JJFP, Boon L, (2010). Apical CD36 immunolocalization in human and porcine taste buds from circumvallate and foliate papillae. *Acta Histochem*. **10**:1016.
- Singer AG, Ghomashchi F, Le Calvez C, Bollinger J, Bezzine S, Rouault M, Sadilek M, Nguyen E, Lazdunski M, Lambeau G, Gelb MH, (2002). Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. *J Biol Chem*. **277**(50):48535-49.
- Singer AU, Waldo GL, Harden TK, Sondek J, (2002). A unique fold of phospholipase C-beta mediates dimerization and interaction with G alpha q. *Nat Struct Biol*. **9** (1):32-36.
- Six DA, Dennis EA, (2003). Essential Ca(2+)-independent role of the group IVA cytosolic phospholipase A(2) C2 domain for interfacial activity. *J Biol Chem*. **278** (26):23842-50.
- Smani T, Zakharov SI, Csutora P, Leno E, Trepakova ES, Bolotina VM, (2004). A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. *Nat Cell Biol*. **6**:113-20.
- Smith DV and St John SJ. Neural coding of gustatory information. *Curr Opin Neurobiol.* (1999). **9** (4): 427-35.
- Soboloff J, Spassova MA, Tang XD, Hewavitharana T, Xu W, Gill DL, (2006). Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *J Biol Chem*. **281** (30) 20661-65.

- Song H, Bao S, Ramanadham S, Turk J, (2006).. Effects of biological oxidants on the catalytic activity and structure of group VIA phospholipase A2. *Biochemistry*. **45** (20):6392-406

- Song H, Ramanadham S, Bao S, Hsu FF, Turk J, (2006). A bromoenol lactone suicide substrate inactivates group VIA phospholipase A2 by generating a diffusible bromomethyl keto acid that alkylates cysteine thiols. *Biochemistry*. **45** (3):1061-73.

- Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L, (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*. **305** (5689):1434-37.

- Spector AC, Grill HJ, (1992). Salt taste discrimination after bilateral section of the chorda tympani or glossopharyngeal nerves. *Am. J Physiol*. **263**: R169-76.

- Spector AC, St John SJ, (1998). Role of taste in the microstructure of quinine ingestion by rats. *Am. J Physiol*. **274**: R1687-703.

- Stewart JE, Feinle-Bisset C, Golding M, Delahunty C, Clifton PM, Keast RS, (2010). Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects. *Br. J. Nutr*. 1-8.

- Stewart JE, Seimon RV, Otto B, Keast RS, Clifton PM, Feinle-Bisset C, (2011). Marked differences in gustatory and gastrointestinal sensitivity to oleic acid between lean and obese men. *Am J Clin Nutr*. **93** (4):703-11.

- Stratford JM, Curtis KS, Contreras RJ, (2006).Chorda tympani nerve transection alters linoleic acid taste discrimination by male and female rats. *Physiol. Behav*. **89**: 311-19.

- Street IP, Lin HK, Laliberté F, Ghomashchi F, Wang Z, Perrier H, Tremblay NM, Huang Z, Weech PK, Gelb MH, (1993). Slow- and tight-binding inhibitors of the 85-kDa human phospholipase A2. *Biochemistry*. **32** (23):5935-40.

- Stylianou C, Galli-Tsinopoulou A, Farmakiotis D, Rousso I, Karamouzis M, Koliakos G, Nousia-Arvanitakis S, (2007). Ghrelin and leptin levels in obese adolescents. Relationship with body fat and insulin resistance. *Hormones* (Athens). **6** (4): 295-303.

- Suh HN, Huong HT, Song CH, Lee JH, Han HJ, (2008). Linoleic acid stimulates gluconeogenesis via Ca2+/PLC, cPLA2, and PPAR pathways through GPR40 in primary cultured chicken hepatocytes. Am J Physiol Cell Physiol. **295** (6): C1518-27.

- Sun B, Zhang X, Yonz C, Cummings BS, (2010). Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 activates p38 MAPK signaling pathways during cytostasis in prostate cancer cells. *Biochem Pharmacol*. **79** (12):1727-35.

- Sun Q, Hirasawa A, Hara T, Kimura I, Adachi T, Awaji T, Ishiguro M, Suzuki T, Miyata N, Tsujimoto G, (2010) Structure-activity relationships of GPR120 agonists based on a docking simulation. Mol Pharmacol. **78**:804-10.

- Svensson CI, Lucas KK, Hua XY, Powell HC, Dennis EA, Yaksh TL, (2005). Spinal phospholipase A2 in inflammatory hyperalgesia: role of the small, secretory phospholipase A2. *Neuroscience*. **133** (2): 543-53.

- **T**akaesu G, Surabhi RM, Park KJ, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Gaynor RB, (2003). TAK1 is critical for IkappaB kinase-mediated activation of the NF-kappaB pathway. *J. Mol. Biol*. **326**: 105-15.

- Tanaka H, Takeya R, Sumimoto H, (2000). A novel intracellular membrane-bound calcium-independent phospholipase A (2). *Biochem Biophys Res Commun.* **272** (2):320-26.

- Tanaka K, Matsutani S, Kanda A, Kato T, Yoshida T, (1994).. Thielocin B3, a novel antiinflammatory human group II phospholipase A2 specific inhibitor from ascomycetes. *J Antibiot* (Tokyo). **47** (6): 631-38.

- Tanaka T, Katsuma S, Adachi T, Koshimizu TA, Hirasawa A, Tsujimoto G, (2008). Free fatty acids induce cholecystokinin secretion through GPR120, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **377**: 523-27

- Tanaka T, Kawamura K, (1995). Isolation of myocardial membrane long-chain fatty acid-binding protein: homology with a rat membrane protein implicated in the binding or transport of long-chain fatty acids. *J Mol Cell Cardiol*. **27** (8):1613-22.

- Tang J, Kriz RW, Wolfman N, Shaffer M, Seehra J, Jones SS, (1997). A novel cytosolic calcium-independent phospholipase A2 contains eight ankyrin motifs. *J Biol Chem*. **272** (13):8567-75.

- Tew DG, Boyd HF, Ashman S, Theobald C, Leach CA, (1998). Mechanism of inhibition of LDL phospholipase A2 by monocyclic-beta-lactams. Burst kinetics and the effect of stereochemistry. *Biochemistry*. **37** (28):10087-93.

- Tjoelker LW, Eberhardt C, Unger J, Trong HL, Zimmerman GA, McIntyre TM, Stafforini DM, Prescott SM, Gray PW, (1995). Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is a secreted phospholipase A2 with a catalytic triad. *J Biol Chem*. **270** (43): 25481-87.

- Törnquist K, Ekokoski E, Forss L, (1994). Thapsigargin-induced calcium entry in FRTL-5 cells: possible dependence on phospholipase A2 activation. *J Cell Physiol*. **160** (1):40-46.

- Tramposch KM, Chilton FH, Stanley PL, Franson RC, Havens MB, Nettleton DO, Davern LB, Darling IM, Bonney RJ, (1994). Inhibitor of phospholipase A2 blocks eicosanoid and platelet activating factor biosynthesis and has topical anti-inflammatory activity. *J Pharmacol Exp Ther*. **271** (2):852-59.

- Trepakova ES, Csutora P, Hunton DL, Marchase RB, Cohen RA, Bolotina VM, (2000). Calcium influx factor directly activates store-operated cation channels in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. **275** (34):26158-63.

- Triggiani M, Granata F, Oriente A, De Marino V, Gentile M, Calabrese C, Palumbo C, Marone G, (2000). Secretory phospholipases A2 induce beta-glucuronidase release and IL-6 production from human lung macrophages. *J Immunol*. **164** (9):4908-15.

- Tsunoda Y, Owyang C, (1993). Differential involvement of phospholipase A2/arachidonic acid and phospholipase C/phosphoinositol pathways during cholecystokinin receptor activated Ca2+ oscillations in pancreatic acini. *Biochem Biophys Res Commun*. **194** (3):1194-202.

- **U**memura K, Kato I, Hirashima Y, Ishii Y, Inoue T, Aoki J, Kono N, Oya T, Hayashi N, Hamada H, Endo S, Oda M, Arai H, Kinouchi H, Hiraga K, (2007). Neuroprotective role of transgenic PAF-acetylhydrolase II in mouse models of focal cerebral ischemia. *Stroke*. **38** (3):1063-38.

- Underwood KW, Song C, Kriz RW, Chang XJ, Knopf JL, Lin LL, (1998). A novel calcium-independent phospholipase A2, cPLA2-gamma, that is prenylated and contains homology to cPLA2. *J Biol Chem*. **273**(34):21926-32.

- Uozumi N, Shimizu T, (2002). Roles for cytosolic phospholipase A2alpha as revealed by gene-targeted mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. **68-69**: 59-69.

- Uyama T, Morishita J, Jin XH, Okamoto Y, Tsuboi K, Ueda N, (2009). The tumor suppressor gene H-Rev107 functions as a novel Ca2+-independent cytosolic phospholipase A1/2 of the thiol hydrolase type. *J Lipid Res.* **50** (4):685-93.

- **v**an Tienhoven M, Atkins J, Li Y, Glynn P, (2002). Human neuropathy target esterase catalyzes hydrolysis of membrane lipids. *J Biol Chem*. **277** (23):20942-48.

- Varghese, J.; Rydel, R.; Thorsett, E, (1998). Athena Arylsulfonamides as phospholipase A2 inhibitors. *Neurosciences, Inc.* **Patent** WO 9825893,

- Venter JC *et al*. (2001). The Sequence of the Human Genome. *Science*. **291**:1304-51

- **W**ang R, Cruciani-Guglielmacci C, Migrenne S, Magnan C, Cotero VE, Routh VH, (2006). Effects of oleic acid on distinct populations of neurons in the hypothalamic arcuate nucleus are dependent on extracellular glucose levels. *J Neurophysiol.* **95** (3): 1491-98.

- Wang Y, Kowalski PE, Thalmann I, Ornitz DM, Mager DL, Thalmann R, (1998). Otoconin-90, the mammalian otoconial matrix protein, contains two domains of homology to secretory phospholipase A2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95** (26):15345-50.

- Weinrauch Y, Abad C, Liang NS, Lowry SF, Weiss J, (1998). Mobilization of potent plasma bactericidal activity during systemic bacterial challenge. Role of group IIA phospholipase A2. *J Clin Invest*. **102** (3):633-38.

- Williams RT, Manji SS, Parker NJ, Hancock MS, Van Stekelenburg L, Eid JP, Senior PV, Kazenwadel JS, Shandala T, Saint R, Smith PJ, Dziadek MA, (2001). Identification

and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. *Biochem J*. **357** (Pt 3): 673-85.

- Wilson PA, Gardner SD, Lambie NM, Commans SA, Crowther DJ, (2006). Characterization of the human patatin-like phospholipase family. *J Lipid Res*. **47** (9):1940-9.
- Winstead MV, Balsinde J, Dennis EA, (2000). Calcium-independent phospholipase A (2): structure and function. *Biochim Biophys Acta*. **1488** (1-2): 28-39.
- Wong GT, Gannon KS, Margolskee RF, (1996). Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature*. **381**:796-800.
- Wooton-Kee CR, Boyanovsky BB, Nasser MS, de Villiers WJ, Webb NR, (2004). Group V sPLA2 hydrolysis of low-density lipoprotein results in spontaneous particle aggregation and promotes macrophage foam cell formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **24** (4):762-67.
- **Y**ang R, Crowley HH, Rock ME, Kinnamon JC, (2000). Taste cells with synapses in rat circumvallate papillae display SNAP-25-like immunoreactivity. *J Comp Neurol*. **424**:205-15.
- Yang R, Stoick CL, Kinnamon JC, (2004). Synaptobrevin-2-like immunoreactivity is associated with vesicles at synapses in rat circumvallate taste buds. *J Comp Neurol*. **471**:59-71.
- Yang S, Zhang JJ, Huang XY, (2009). Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell*. **15(**2):124-34.
- Ye J & Keller JN, (2010). Regulation of energy metabolism by inflammation: A feedback response in obesity and calorie restriction. *Aging Albany NY*. **2 (6)**: 361-68
- Yee CL, Yang R, Bottger B, Finger TE, Kinnamon JC, (2001). "Type III" cells of rat taste buds: immunohistochemical and ultrastructural studies of neuron-specific enolase, protein gene product 9.5, and serotonin. *J Comp Neurol.* **440**: 97-108.
- Yokota Y, Hanasaki K, Ono T, Nakazato H, Kobayashi T, Arita H, (1999). Biochim Suppression of murine endotoxic shock by sPLA2 inhibitor, indoxam, through group IIA sPLA2-independent mechanisms. *Biophys Acta*. **1438** (2):213-22.
- Yuan W, Quinn DM, Sigler PB, Gelb MH, (1990). Kinetic and inhibition studies of phospholipase A2 with short-chain substrates and inhibitors *Biochemistry*. **29** (25): 6082-94.
- **Z**hang XJ, Zhou LH, Ban X, Liu DX, Jiang W, Liu XM, (2010). Decreased expression of CD36 in circumvallate taste buds of high-fat diet induced obese rats. *Acta Histochem*. Article in press.

- Zhou M, Gu L, Yeager AM, Findley HW, (1998). Sensitivity to Fas-mediated apoptosis in pediatric acute lymphoblastic leukemia is associated with a mutant p53 phenotype and absence of Bcl-2 expression. *Leukemia* **12**: 1756–1763.