

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON
Délivrée par
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)

soutenu publiquement le 10 avril 2009
par

Bruno PILLOT

**Etude des mécanismes par lesquels les
protéines exercent leur pouvoir anorexigène**

Directeur de thèse : Gilles MITHIEUX

JURY :	Mme M. Laville	Présidente
	Mr J. Epelbaum	Rapporteur
	Mr F. Andreelli	Rapporteur
	Mr G. Mithieux	Directeur de thèse
	Mr C. Magnan	Examineur

Résumé

Une alimentation riche en protéines entraîne une importante diminution de la prise alimentaire, chez l'homme et l'animal, par rapport à une alimentation classique (riche en hydrates de carbones). Les précédents travaux du laboratoire chez le rat montrent que le mécanisme implique une induction de la production intestinale de glucose libéré dans la veine porte. Il s'ensuit un signal qui transite au cerveau via le nerf vague et se traduit par un effet anorexigène.

Le régime protéique induit en fait une redistribution de la production endogène de glucose au profit du rein et de l'intestin chez le rat, et au profit de l'intestin et du foie chez la souris. L'effet anorexigène des protéines est présent également chez les souris, confirmant un rôle tout particulier de l'intestin, et du signal glucose portal, dans ce phénomène de satiété. Nos résultats montrent d'ailleurs que le signal glucose portal n'est pas impliqué dans l'augmentation de la production rénale de glucose induite par le régime protéique qui est observée uniquement chez le rat.

Les mesures effectuées chez des rats nourris par différents régimes protéiques indiquent l'implication de mécanismes propres à la nature des protéines qui reste à déterminer.

De plus nous avons mesuré une augmentation de la sensibilité à l'insuline de la production endogène de glucose chez le rat nourri par le régime protéique. Des études plus approfondies chez la souris devraient permettre de comprendre les mécanismes impliqués.

Nos expériences suggèrent par ailleurs que le système mélanocortinergique ne serait pas impliqué dans l'effet anorexigène du régime à long terme mais pourrait constituer un élément important de contre-régulation face à l'hypophagie sévère temporaire provoquée par le changement de régime.

Mots Clefs :

Régime protéique, production de glucose, signal glucose portal, système mélanocortinergique, prise alimentaire.

Abstract

Protein feeding is known to decrease hunger and subsequent food intake in animals and humans. Previous data point out the connection between the central nervous system and the intestinal glucose production in the central inhibitory control of food intake by protein feeding.

Our study demonstrates that protein feeding induces redistribution of endogenous glucose production to the kidney and intestine in rats and to the intestine and liver in the mouse. Anorexigenic effect of protein diet exists in both animal models, confirming a specific role of the intestine in this satiety phenomenon. Moreover, portal glucose sensing is not involved in the induction of renal glucose production by protein feeding that is only observed in rats.

Measurement in rat fed with different protein diets suggest a role of the nature of the protein or structure, but proper mechanisms remain to be clarified.

Moreover, protein feeding potentiates the endogenous glucose production suppression by insulin. Some additional studies have to be performed to find the mechanisms that are implicated.

Our experiments suggest that the melanocortinergic system wouldn't be involved in the long-term anorexigenic effect of protein feeding but could constitute an important counter-regulatory pathway against the temporary hypophagia induced by diet change.

Keywords :

Protein feeding, glucose production, portal glucose sensing, melanocortinergic system, food intake

ABBREVIATIONS

α -MSH : Hormone mélanotrope
6P2K/F2,6BPase : 6-Phosphofruktokinase-2/fructose-2,6-bisphosphatase
ACTH : Adrenocorticotropin hormone
ADP : Adénosine diphosphate
AG : Acides gras
AgRP : Agouti-Related Protein
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
AMPK : 5'-AMP-activated protein kinase
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ATP : Adénosine triphosphate
BRG : Balance rénale de glucose
C/EBP : CAAT/ enhancer binding protein
CART : Cocaine- and Amphetamine- Related Transcript
CCK : Cholécystokinine
cDNA : Acide désoxyribonucléique complémentaire
CREB : cAMP responsive element binding protein
CRH : Corticotropin-Releasing Hormone
CRH : corticotropin-releasing hormone
CRH-R1/2 : Récepteur à la CRH de type 1/2
DMH : Hypothalamus dorsomédian
EDTA : Ethylène diamine tétraacétique
F2,6PB : Fructose 2,6 Bisphosphate
FX : Extraction fractionnelle
G6P : Glucose-6-phosphate
G6PC : Sous-unité catalytique de la glucose-6-phosphatase
G6PT : Glucose-6-phosphate translocase
GABA : gamma amino butyric acid
GC : Glucocorticoïdes
GHS-R1a : Récepteur à la ghréline
Glc6Pase : Glucose-6-phosphatase
GLP-1 : Glucagon-like peptide-1
GLUT-1/2/3/4/5 : Transporteur de glucose de type 1/2/3/4/5
GTP : Guanosine triphosphate
HNF4 : hepatic nuclear factor 4
IGF-1 : Insulin-like growth factor 1
IRE : Élément de réponse à l'insuline
IRS : Insulin receptor substrate
JAK : Janus kinases
LHA : Aires hypothalamiques latérales
MAPK : Mitogen-activated protein kinases
MC1/2/3/4-R : Récepteurs aux mélanocortines de type 1/2/3/4
MCH : Mélaninconcentrating hormone
NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide
NPY : Neuropeptide Y
NTS : Noyau du tractus solitaire
OXA/B : Orexine A/B
PA : Etat post-absorptif
PEG : Production endogène de glucose

PEP : Phosphoénolpyruvate
PEPCK : Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PHG : Production hépatique de glucose
PI3K : Phosphatidyl-inositol 3-kinase
PIG : Production intestinale de glucose
PKA : Protein kinase A
PKB : Protein kinase B
POMC : Proopiomelanocortine
PRG : Production rénale de glucose
PVN : Noyau paraventriculaire
PYY : Peptide YY
SNC : Système nerveux central
SNP : Système nerveux parasympathique
SNS : Système nerveux sympathique
STAT : Signal transducer and activator of transcription
TG : Triglycérides
TRH : Thyrotropin-Releasing Hormone
UCP1 : Uncoupling Protein 1
URG : Utilisation rénale de glucose
VMH : Hypothalamus ventromédian

AVANT PROPOS	8
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	10
I. Régulation de la prise alimentaire	11
1. Centres nerveux impliqués	11
a. L'hypothalamus	11
b. Tronc cérébral	13
2. Signaux orexigènes et anorexigènes endogènes	13
a. Système mélanocortinergique	14
1) <i>Neuropeptides sécrétés par les neurones de premier ordre</i>	14
2) <i>Récepteurs aux mélanocortines exprimés dans les neurones de second ordre</i>	14
3) <i>Fonctionnement et régulations du système mélanocortinergique</i>	15
b. Neuropeptides et neuromédiateurs	17
1) <i>Principales molécules orexigènes</i>	18
2) <i>Principales molécules anorexigènes</i>	19
c. Les hormones périphériques	20
1) <i>L'insuline et la leptine : régulation à long-terme de la prise alimentaire</i>	20
a) <i>Description des hormones</i>	21
b) <i>Régulation de l'expression et de la sécrétion des hormones</i>	21
c) <i>Action des hormones sur la prise alimentaire et mécanismes impliqués</i>	22
2) <i>Les hormones intestinales</i>	23
a) <i>La cholécystokinine</i>	23
b) <i>Le glucagon-like peptide-1</i>	24
c) <i>Le PYY</i>	25
3) <i>La ghréline</i>	25
4) <i>Les glucocorticoïdes</i>	27
3. Effets des nutriments et mécanismes d'action.	28
a. Lipides alimentaires	28
b. Glucose et « signal glucose portal »	29
c. Protéines alimentaires	30
II. Homéostasie glucidique	30
1. Production endogène de glucose : les trois tissus glucoformateurs	31
a. Généralités	31
b. Rôle majeur de la glucose-6-phosphatase dans la production endogène de glucose.	32
c. Synthèse de glucose à partir du glycogène : la glycogénolyse	32
d. Synthèse de glucose à partir de substrats non glucidiques : la néoglucogenèse	33
III. Régulation du métabolisme glucidique	35
1. Régulation par l'insuline	35
a. Inhibition de la production endogène de glucose	35
1) <i>Voies de signalisation de l'insuline</i>	35
2) <i>Action de l'insuline sur les enzymes de la glycogénolyse</i>	36
3) <i>Mécanisme général d'action de l'insuline sur les enzymes de la néoglucogenèse</i>	36
4) <i>La néoglucogenèse extra-hépatique est sensible à l'insuline</i>	37
a) <i>Effet de l'insuline sur la production rénale de glucose</i>	37
b) <i>Effet de l'insuline sur la production intestinale de glucose</i>	37
5) <i>Autres régulations de la production de glucose par l'insuline</i>	38
b. Stimulation de l'utilisation périphérique de glucose	38
2. Autres régulations hormonales	39
a) <i>Le glucagon</i>	39
b) <i>Les glucocorticoïdes</i>	40
b. L'adrénaline et la noradrénaline	41
c. Les autres hormones	42
3. Rôle des systèmes nerveux sympathique et parasympathique	42
4. Régulation par les nutriments	43

a.	Les acides gras	43
b.	Le glucose	45
c.	Les protéines et les acides aminés	45
CONTEXTE, OBJECTIFS ET DEMARCHE EXPERIMENTALE		47
MATERIELS ET METHODES		51
I.	Animaux et régimes	52
1.	Expériences chez le rat	52
a.	Régime hyperprotéique Soja/Caséine	52
b.	Jeûne	52
c.	Régimes spécifiques Soja, Caséine et Viande	52
d.	Clamp hyperinsulinémique euglycémique	53
2.	Expériences chez la souris	53
II.	Mesure de l'expression de gènes de la néoglucogénèse.	54
1.	Prélèvement des tissus	54
2.	Quantification des ARNm	54
3.	Analyse en western-blot	55
4.	Dosages enzymatiques	55
a.	Activité de la glucose-6 phosphatase	55
b.	Activité de la PEPCCK	56
c.	Activité de la glutaminase	57
III.	Mesure de la production rénale de glucose chez le rat	58
1.	Opération des animaux	58
2.	Calcul de la production endogène de glucose	59
3.	Calcul de la production rénale de glucose	59
IV.	Dosage du glycogène hépatique	61
V.	Clamp hyperinsulinémique euglycémique	61
1.	Opération des animaux	61
2.	Déroulement du clamp – calculs – dosage de l'insuline	62
VI.	Dénervation portale chez les rats nourris par le régime hyper-protéique	62
VII.	Perfusion de glucose en veine porte chez les rats nourris par le régime standard	63
RESULTATS		64
Partie 1 : Action du régime enrichi en protéines sur le métabolisme glucidique		65
I.	Le régime protéique induit l'expression des principales enzymes clefs de la néoglucogénèse rénale	66
II.	La production rénale de glucose est induite par le régime protéique	67
1.	Validation de la méthode : effets du jeûne sur la production rénale de glucose	67
2.	Effets du régime protéique sur la production rénale de glucose	68
III.	Effet du régime protéique sur l'expression des principales enzymes clefs de la néoglucogénèse hépatique	68
Partie 2 : Action du régime enrichi en protéines sur la sensibilité à l'insuline		70
I	Les protéines alimentaires améliorent la sensibilité à l'insuline de la production endogène de glucose chez le rat	71
II	Etats des stocks de glycogène hépatique après un clamp hyperinsulinémique euglycémique chez le rat nourri par un régime protéique	72
Partie 3 : Implication du signal glucose portal dans l'induction de la néoglucogénèse rénale par le régime riche en protéines		73
I.	Effet d'une dénervation portale sur l'activité Glc6Pase rénale chez le rat nourri par le régime riche en protéines	74
II.	Effet d'une perfusion portale de glucose sur l'activité Glc6Pase rénale chez le rat nourri par un régime standard	74
Partie 4 : Rôle de la nature des protéines dans les effets du régime protéique sur le métabolisme glucidique		75

I.	Impact de la nature des protéines sur les gènes néoglucogéniques rénaux	76
II.	Impact de la nature des protéines sur les gènes néoglucogéniques intestinaux	76
III.	Impact de la nature des protéines sur les gènes néoglucogéniques hépatiques	77
Partie 5 : Implication du système mélanocortinergique dans l'effet anorexigène des protéines		78
I.	Variation de la prise alimentaire et du métabolisme glucidique chez les souris C57/bl6 et SV129 normales en réponse au régime protéique	79
1.	Effets du régime protéique sur la prise alimentaire des souris	79
2.	Effets du régime protéique sur le poids des souris	80
3.	Effets du régime protéique sur l'activité de la Glc6Pase intestinale des souris C57/bl6	80
4.	Effets du régime protéique sur l'activité de la Glc6Pase rénale des souris C57/bl6	81
5.	Effets du régime protéique sur l'activité de la Glc6Pase hépatique et sur les stocks de glycogène hépatique des souris C57/bl6	81
II.	Impact du régime protéique sur l'expression des gènes hypothalamiques du système mélanocortinergique chez les souris C57/B16	82
III.	Variation de la prise alimentaire et du poids chez les souris SV129 invalidées pour le gène codant POMC en réponse au régime protéique	83
IV.	Variation de la prise alimentaire et du poids chez les souris C57/bl6 invalidées pour le gène codant MC4R en réponse au régime protéique	84
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES		86
ARTICLE 1 :		94
PORTAL SENSING OF INTESTINAL GLUCONEOGENESIS IS A MECHANISTIC LINK IN THE DIMINUTION OF FOOD INTAKE INDUCED BY DIET PROTEIN		94
ARTICLE 2 :		104
PROTEIN FEEDING PROMOTES REDISTRIBUTION OF ENDOGENOUS GLUCOSE PRODUCTION TO THE KIDNEY AND POTENTIATES ITS SUPPRESSION BY INSULIN		104
REFERENCES		114
TRAVAUX PERSONNELS		138
ANNEXES		141

AVANT PROPOS

Aux Etats-unis, la prévalence de l'obésité a doublé en 20 ans et actuellement, environ 59 millions d'adultes américains sont obèses (enquête NHANES National Health and Nutrition Examination Survey). L'obésité affectait déjà plus de 300 millions d'adultes à travers le monde en 2000 (Flegal *et al.* 2001). La France, autrefois épargnée par ce fléau, compte désormais près de 20 millions de personnes en surpoids (Indice de Masse Corporelle (IMC) entre 25 et 30) dont 5,9 millions d'obèses (IMC supérieur à 30). De plus, les formes graves de l'obésité, associées aux maladies cardiovasculaires et/ou au diabète, progressent : l'obésité morbide toucherait 0,8% de la population contre 0,6% en 2003 (Enquête ObEpi 2006). Depuis 1998, l'organisation mondiale de la santé (OMS) définit l'obésité comme un phénomène épidémique. Par ailleurs, il existe un lien fort entre l'obésité et une autre pathologie impliquant le métabolisme glucidique : le diabète. En effet, en France, 80% des diabétiques de type 2 présentent une surcharge pondérale.

Or les troubles du comportement alimentaire ont un impact majeur sur le développement de l'obésité et du diabète de type 2 (Flier, 2004 ; Friedman, 2000). La compréhension des mécanismes impliqués dans la régulation de la prise alimentaire se révèle donc être nécessaire pour tenter d'enrayer ces fléaux.

L'ingestion puis l'absorption des nutriments déclenchent de nombreux signaux au sein des tissus périphériques, en particulier des organes du système digestif (motilité intestinale, sécrétion d'hormones intestinales ou gastriques). Ces signaux, auxquels s'ajoutent ceux qui reflètent des stocks énergétiques de l'organisme, convergent vers les centres nerveux où ils sont intégrés. L'intégration de cette multitude de signaux fait naître une réponse adaptée aux besoins de l'organisme : régulation de la prise alimentaire et adaptation des flux des différents substrats énergétiques (par exemple, inhibition de la production de glucose par le foie). Les circuits et noyaux neuronaux, ainsi que les hormones ou neuropeptides, impliqués dans la transduction et l'intégration centrale de ces signaux périphériques font l'objet de nombreuses études, mais les réseaux complets « signal périphérique-transduction-intégration », mis en place dans les différentes situations spécifiques (jeûne, alimentation riche en graisses, en protéines, etc.), ne sont pas encore bien établis.

Différents travaux ont montré que les protéines alimentaires ont un effet anorexigène, et réduisent de ce fait la prise alimentaire (Latner and Schwartz 1999 ; LeJeune *et al.* 2006).

Par ailleurs, les travaux de Gannon et Nuttall en 2003 montrent qu'une alimentation enrichie en protéines chez des patients diabétiques induit une amélioration de leurs paramètres glycémiques. Les mécanismes impliqués n'ont cependant pas été totalement élucidés.

La production endogène de glucose a longtemps été considérée comme une fonction restreinte au foie et au rein, cependant notre groupe a mis en évidence l'existence d'un troisième organe néoglucogénique : l'intestin grêle. La production intestinale de glucose prend place majoritairement dans les situations insulino-péniques et également lors des régimes riches en protéines. La libération de glucose par l'intestin génère un signal « glucose portal », qui transite via le nerf vague et entraîne l'activation de neurones hypothalamiques impliqués dans la régulation du comportement alimentaire, diminuant ainsi la prise alimentaire.

Etant donné l'existence d'un lien entre les protéines alimentaires, le métabolisme glucidique et la satiété, nous nous sommes intéressés à la compréhension du mécanisme d'action des protéines alimentaires et la caractérisation des circuits et métabolites impliqués.

Ce travail est introduit par des données bibliographiques qui décrivent dans une première partie, 1) la localisation des centres nerveux ainsi que 2) les différents neuropeptides et hormones impliqués dans la régulation de la prise alimentaire et 3) les effets spécifiques des différents nutriments contenus dans l'alimentation. Une deuxième partie présente brièvement les systèmes impliqués dans le maintien de l'homéostasie glucidique. Et enfin, une troisième partie rapporte des données concernant les différents mécanismes de régulations hormonale et nutritionnelle du métabolisme glucidique, ainsi que les perturbations du métabolisme glucidique conduisant au diabète.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. Régulation de la prise alimentaire

1. Centres nerveux impliqués

La régulation de la prise alimentaire entre dans le cadre général de la régulation de l'homéostasie énergétique et prend place au sein du système nerveux central. En effet, des centres nerveux, spécialisés dans la régulation de la prise alimentaire et localisés principalement dans l'hypothalamus et le tronc cérébral, sont le siège de l'intégration des signaux périphériques et centraux, qui renseignent sur les réserves énergétiques de l'organisme et sur l'apport ponctuel de substrats énergétiques exogènes. Cependant les réseaux neuronaux impliqués sont complexes et font appel à de nombreux centres recevant chacun des informations spécifiques sur l'environnement ou l'état de l'organisme.

a. L'hypothalamus

Des expériences réalisées dans les années 1950 ont montré que des stimulations électriques ou des lésions spécifiques de l'hypothalamus modifiaient la prise alimentaire (Anand *et al.*, 1951). Ces expériences avaient conduit à identifier des centres de la faim et de la satiété au sein de l'hypothalamus. Ces différents noyaux hébergent des populations neuronales exprimant différents neuromédiateurs impliqués dans la régulation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique (**Figure I**) :

- Le noyau arqué (ARC) est situé entre la base du 3^{ème} ventricule et l'éminence médiane. Il joue un rôle clef dans l'intégration des signaux d'origine hormonale puisque la modification de la barrière hémato-encéphalique au niveau de l'éminence médiane le rend accessible aux messagers circulants (insuline, leptine). Deux populations distinctes de neurones dits de « premier ordre » activent soit des circuits orexigènes (neurones sécrétant le Neuropeptide Y (NPY) et l' « Agouti-Related Protein (AgRP) » (Hahn *et al.* 1998) soit des circuits anorexigènes (neurones sécrétant la Proopiomelanocortine (POMC), qui est précurseur notamment des mélanocortines et de la β -endorphine, et le « Cocaine- and Amphetamine- Related Transcript » (CART)) (Kristensen *et al.* 1998). Ces neurones projettent leurs axones vers des régions hypothalamiques comme le noyau paraventriculaire,

les aires hypothalamiques latérales et l'hypothalamus dorsomédian et ventromédian , dans lesquels sont situés les neurones dits de « second ordre » (Williams *et al.* 2001).

- Le noyau paraventriculaire (PVN) est un centre intégrateur où convergent des axones issus des neurones à NPY/AgRP et à POMC/CART du noyau arqué, et des neurones à orexine présents dans les aires hypothalamiques latérales (Williams *et al.* 2001). Le PVN est le site de sécrétion de la « Corticotropin-Releasing Hormone » (CRH) et de la « Thyrotropin-Releasing Hormone » (TRH).

- Le noyau de l'hypothalamus ventromédian (VMH) a longtemps été considéré comme le centre de la satiété. En effet, plusieurs études des années 50-70 montrent que des lésions de l'hypothalamus ventromédian entraînent une hyperphagie et une obésité (Stellar 1954). Cependant des travaux plus récents, notamment de Gold et coll., dénoncent le manque de spécificité des méthodes utilisées et suggèrent que l'hyperphagie et l'obésité seraient dues, au moins en partie, à l'atteinte des populations neuronales adjacentes au VMH plutôt qu'à l'atteinte du VMH lui-même (Gold et al. 1973 ; voir King et al. 2006 pour une revue). D'autres études démontrent cependant que des liaisons, plus spécifiques cette fois-ci, du VMH provoque une obésité « métabolique » indépendante d'une hyperphagie, comme proposée par une revue de Powley et coll., et due aux perturbations des communications entre le VMH et les systèmes sympathique et parasympatique (Powley 1977 ; Cox et al. 1981 ; Parkinson et al. 1990 ; Rabin et al. 1974). De plus, l'implication du VMH dans les régulations de la prise alimentaire est largement suggéré par, notamment, la présence de récepteurs aux mélanocortines (composante d'un système de régulation de la prise alimentaire) ainsi que les nombreuses liaisons nerveuses du VMH avec les autres noyaux précédemment cités, tels que le PVN ou le noyau arqué. Le VMH reçoit en effet de nombreuses projections de neurones à NPY/AgRP, à POMC/CART et à β -endorphine du noyau arqué (Koylu *et al.*, 1997 ; Finley *et al.*, 1981). Il envoie ses efférences en direction de l'hypothalamus dorsomédian (DMH), du PVN et du noyau du tractus solitaire. Par ailleurs le VMH, de même que, dans une moindre mesure, le noyau arqué et le PVN, exprime la « fatty acid synthase », le rendant ainsi sensible aux métabolites intermédiaires du métabolisme des acides gras (Lopez *et al.*, 2008).

- L'hypothalamus dorsomédian (DMH) possède des connections avec les autres noyaux hypothalamiques médians et latéraux. Des lésions de ce noyau perturbent bien moins la prise alimentaire que les lésions du VMH (Bernardis *et al.*, 1987).

- Les aires hypothalamiques latérales (LHA) sont considérées comme le centre de la faim. La stimulation de ces zones induit la prise alimentaire alors que des lésions induisent une perte de poids associée à une aphasie temporaire (le retour à une prise alimentaire normale dépend de la taille et de la localisation de la lésion (Bernardis *et al.*, 1996)). Le LHA reçoit des connexions du noyau arqué et possède des neurones à orexine et à la mélanin-concentrating hormone (MCH) qui stimulent la prise alimentaire (Schwartz *et al.* 2000). Une des particularités de cette aire est de contenir des neurones sensibles au glucose répondant aux fluctuations de la glycémie (Routh 2002).

b. Tronc cérébral

Le contrôle de l'homéostasie énergétique et de la prise alimentaire implique également le noyau du tractus solitaire (NTS) localisé dans le tronc cérébral. Des informations telles que la distension gastrique, la glycémie portale, les signaux du tractus gastro-intestinal sont transmises par le nerf vague jusqu'au NTS (Thorens and Larsen 2004 ; Woods *et al.* 2004) (**Figure I**). Le NTS est également relié aux différents noyaux hypothalamiques avec lesquels il établit de nombreuses connexions (van der Kooy *et al.*, 1984, Ter Horst *et al.*, 1989). La POMC, mais aussi l'AgRP et les récepteurs aux mélanocortines de type 3 et 4 (MC3-R et MC4-R) sont exprimés dans les neurones du NTS, constituant ainsi un système mélanocortinergique semblable à celui rencontré dans le noyau arqué.

2. Signaux orexigènes et anorexigènes endogènes

Le mécanisme de transmission d'un signal de faim ou de satiété implique notamment la sécrétion périphérique d'hormones (en réponse à des variations métaboliques ou mécaniques) qui provoquent, au niveau central, la libération de plusieurs neuromédiateurs et neuropeptides qui agissent à leur tour sur les centres de contrôle de la prise alimentaire. L'un des principaux systèmes de transduction de ces signaux au niveau central est le système mélanocortinergique.

a. Système mélanocortinergique

Le système se compose de populations de neurones de premier ordre, localisées dans le noyau arqué, et qui projettent leurs axones au niveau de populations de neurones de second ordre, localisées dans d'autres régions de l'hypothalamus (**Figure II**).

1) Neuropeptides sécrétés par les neurones de premier ordre

Deux sous-populations de neurones de premier ordre ont été décrites. L'une sécrète l'hormone mélanotrope (α -MSH), peptide anorexigène de 13 acides aminés (aa). L' α -MSH joue également un rôle dans la pigmentation de la peau puisqu'elle stimule la mélanogenèse par sa fixation au MC1-R au niveau des mélanocytes. De plus, on lui connaît des propriétés anti-inflammatoires (Catania *et al.*, 1999). L' α -MSH est issue des clivages successifs de la pro-opiomélanocortine (POMC) par les pro-hormones convertases 1 et 2 (PC1, PC2). La POMC, principalement synthétisée dans le noyau arqué mais aussi dans le NTS, est en fait un peptide de 266 aa également à l'origine de l'« Adrenocorticotropin hormone » (ACTH), de la β -endorphine et d'autres mélanocortines dont l'action sur la prise alimentaire reste mineure. L'autre sous population de neurones de premier ordre sécrète l'Agouti-Related Protein (AgRP), neuropeptide orexigène de 132 aa. L'AgRP possède également un effet stimulateur de l'axe surrénalo-hypothalamo-hypophysaire (Xiao *et al.*, 2003) mais pourtant inhibe l'expression de la TRH (Fekete *et al.* 2002). De plus il joue un rôle pro-inflammatoire puisqu'il potentialise l'effet positif de l'Interleukine 1 sur la production d'ACTH. L'AgRP est exprimé essentiellement dans le noyau arqué et la glande surrénale (Ollman *et al.*, 1997 ; Bicknell *et al.*, 2000 ; Doghman *et al.*, 2007).

2) Récepteurs aux mélanocortines exprimés dans les neurones de second ordre

Au niveau des neurones de second ordre, deux formes de récepteurs (famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G) à ces hormones mélanotropes sont exprimés (**Tableau I**) : le récepteur de type 4 (MC4-R) est une protéine de 332 aa localisée dans différentes régions du système nerveux central (dont l'hypothalamus, principalement le PVN, le DMH et le HLA (Mountjoy *et al.*, 1994)) et contrôle directement la

prise alimentaire. Le récepteur de type 3 (MC3-R) est une protéine de 323 aa chez le rat et la souris (et 361 aa chez l'Homme), dont l'expression est davantage restreinte à l'hypothalamus (notamment dans le noyau arqué et le VMH), et est impliqué essentiellement dans la régulation de l'homéostasie énergétique en limitant le stockage d'énergie. Chacun des récepteurs aux mélanocortines stimule une voie dépendante de l'AMPc, mais d'autres voies de signalisation ont été identifiées, notamment la voie d'activation de l'inositol triphosphate (Mountjoy *et al.*, 2001), et la voie des « Mitogen-activated protein kinases » (MAPK) (Englaro *et al.*, 1995). Plusieurs arguments de la littérature sont venus confirmer le rôle de ces récepteurs dans le contrôle de la prise alimentaire et le stockage énergétique. L'invalidation du gène codant MC4-R chez la souris entraîne l'apparition d'un syndrome d'obésité morbide avec hyperphagie, hyperinsulinémie, hyperglycémie et croissance excessive (Huszar *et al.* 1997). Chez des souris invalidées pour le gène codant MC3-R la masse grasse augmente, ce qui se traduit par l'apparition du syndrome métabolique (Chen *et al.* 2000). Un phénotype intermédiaire est obtenu chez les souris hétérozygotes pour l'un des deux récepteurs. Chez l'Homme, plusieurs mutations au niveau du gène codant MC4-R ont été décrites chez des enfants atteints d'obésité précoce et sévère (Hinney *et al.* 1999) et une mutation de MC3-R s'accompagnant du développement de la masse adipeuse viscérale a également été rapportée (Lee *et al.* 2002). Ces mutations n'affectent qu'un seul allèle, ce qui indique que la réduction de moitié de l'expression de ces récepteurs se traduit déjà par des modifications du statut métabolique.

3) Fonctionnement et régulations du système mélanocortinergique

L' α -MSH est le ligand naturel des récepteurs aux mélanocortines, et sa fixation sur MC3-R et MC4-R entraîne respectivement une augmentation des dépenses énergétiques et une diminution de la prise alimentaire (Hillebrand *et al.* 2002).

L'expression de la POMC, précurseur de l' α -MSH, est augmentée par la CRH et la vasopressine alors qu'elle est inhibée par les glucocorticoïdes (Rivier *et al.*, 1982). Par ailleurs, il a été montré que les glucocorticoïdes inhibent également l'expression de la PC1, inhibant ainsi le clivage de la POMC (Dong *et al.*, 2002). L'invalidation du gène codant la POMC chez la souris se traduit par l'apparition d'une obésité importante associée à une hyperphagie, qu'un traitement par l' α -MSH tend à abolir (Yaswen *et al.* 1999). Chez

l'Homme, les mutations du gène de la POMC entraînent de la même façon une obésité morbide précoce chez l'enfant (Krude and Grüters 2000).

L'AgRP est un puissant antagoniste de ces deux récepteurs, provoquant leur endocytose (Breit *et al.*, 2006). La libération d'AgRP au niveau des neurones de second ordre provoque une diminution de la dépense énergétique et une hyperphagie (Ollmann *et al.* 1997). In vitro, il a été montré que l'AgRP, pouvait agir en tant qu'agoniste inverse, supprimant l'activité adénylate cyclase constitutive du récepteur (Nijenhuis *et al.* 2001 ; Chai et al. 2003). De plus, des études mettent en évidence que certains neurones à AgRP projettent leurs axones dans des cellules qui expriment MC4-R mais qui ne sont pas innervées par les neurones à -MSH, suggérant une action de l'AgRP sur MC4-R, indépendante de l' -MSH (Haskell-Luevano et al. 1999). Ces données semblent être confirmées in vivo à l'aide de souris hétérozygotes pour le gène codant POMC et chez lesquelles une injection icv d'AgRP augmente plus fortement la prise alimentaire que chez des souris témoins (Tolle et al. 2008). Les auteurs proposent un mécanisme impliquant une régulation de l'activité de MC4-R.

Chez l'Homme, le taux d'AgRP plasmatique est augmenté pendant le jeûne (Shen *et al.* 2002) et chez l'obèse (Katsuki *et al.*, 2001). La surexpression ubiquitaire du gène codant l'AgRP chez la souris se traduit par une insulino-résistance et une hyperphagie, conduisant à l'apparition d'un phénotype obèse semblable à celui observé par inactivation de MC4-R (Ollmann *et al.* 1997 ; Graham *et al.*, 1997). De plus, une perfusion intracérébroventriculaire (icv) d'AgRP provoque une augmentation de la prise alimentaire et du poids corporel, ainsi qu'un important stockage lipidique dans le tissu adipeux blanc, associés à une chute de l'expression de la protéine découplante « Uncoupling Protein 1 » (UCP1) dans ce tissu, et à une diminution de la dépense énergétique (Small *et al.*, 2001).

Les souris invalidées pour le gène codant l'AgRP (absence d'AgRP dès la naissance) ne présentent ni hypophagie ni perte de poids (Qian *et al.*, 2002). De plus, ces souris présentent une glycémie et des taux plasmatiques de leptine, de triglycérides et d'acide gras semblables aux souris témoins. L'expression du MC-3R, du MC4-R et du NPY est également inchangée (Qian *et al.*, 2002). Cependant, à 6 mois, les souris présentent un phénotype maigre corrélé avec une dépense énergétique, une température corporelle et une expression d'UCP1 dans le tissu adipeux brun augmentées (Wortley *et al.*, 2005). Par ailleurs, la destruction partielle tardive des neurones à AgRP/NPY chez la souris conduit à une importante diminution de la prise alimentaire et une perte de poids accompagnées d'une augmentation de la dépense énergétique reflétée par l'augmentation de l'expression des ARNm codant l'UCP1 dans le tissu adipeux brun (Bewick *et al.*, 2005). Une autre étude montre également que

l'ablation spécifique des neurones à AgRP/NPY chez les souris adultes induit une diminution significative du poids corporel, de la prise alimentaire, de la glycémie, de la leptinémie et de l'insulinémie, tandis que la réalisation de l'ablation au stade périnatal n'entraîne que peu de modifications de ces paramètres (Luquet *et al.*, 2006). L'ensemble de ces études suggère fortement que la perte du signal AgRP (destruction des neurones) chez l'embryon ou le nouveau-né induit la mise en place de mécanismes compensatoires par le biais de la plasticité neuronale.

Par ailleurs, les populations neuronales de premier ordre projettent aussi leurs axones au sein même du noyau arqué, suggérant des interactions étroites entre les deux systèmes neuropeptidergiques (POMC et AgRP). Plusieurs études démontrent l'existence de mécanismes de rétrocontrôle. Il a en effet été montré que les neurones à POMC et ceux à AgRP expriment MC3-R (Bagnol *et al.* 1999 ; Jégou *et al.* 2000 ; Mounien *et al.* 2005). De ce fait, une libération d' α -MSH peut à la fois contrôler la libération d'AgRP mais aussi réguler sa propre production. D'autre part, le GABA (gamma amino butyric acid) et le NPY, sécrétés par les neurones à AgRP, peuvent inhiber les neurones à POMC (Jégou *et al.* 1993). Ainsi, la destruction des neurones à AgRP entraîne l'abolition de cette boucle de régulation, rendant difficile l'interprétation des études d'ablation de neurones.

Il n'existe par ailleurs que très peu de données sur la régulation de l'expression génique ou sur l'étude du promoteur des récepteurs aux mélanocortines. Chez le rat, une restriction alimentaire avec perte de poids provoque une augmentation de la liaison de la NDP-MSH marquée à l' ^{125}I , sur le MC4-R, dans le noyau arqué, le DMH, le VMH et l'éminence médiane (Harrold *et al.*, 1999). Par ailleurs, des études de liaisons *in vitro* révèlent l'implication des facteurs de transcription de la famille « Sp » dans l'activité constitutive du promoteur de MC4-R (Blondet *et al.*, 2005).

b. Neuropeptides et neuromédiateurs

Outre l' α -MSH et l'AgRP appartenant au système mélanocortinergique, il existe d'autres médiateurs neuronaux régulant la prise alimentaire (**Tableau II**). Par ailleurs, il existe de fortes interactions entre ces différents systèmes (**Figure I**).

1) Principales molécules orexigènes

- Le NPY, peptide de 36 aa, est caractérisé comme le plus puissant parmi les principaux effecteurs orexigènes (Stanley and Thomas 1993). Il est synthétisé majoritairement dans le noyau arqué, dans les neurones de premier ordre qui expriment également l'AgRP (Schwartz *et al.* 2000). Tout comme l'AgRP, il est exprimé lorsque l'organisme est en déplétion énergétique associée à des taux d'insuline et de leptine bas (Wilding al. 1993). Ainsi sa libération au niveau de l'hypothalamus est augmentée en période de jeûne. L'expression du NPY est aussi induite par les glucocorticoïdes qui interfèrent avec l'action de la leptine (Solano and Jacobson 1999). Il a été montré qu'une perfusion centrale de NPY inhibe la thermogénèse, favorise la lipogénèse (par augmentation de l'expression des enzymes lipogènes dans le tissu adipeux blanc) et induit la prise alimentaire chez le rat (Williams *et al.* 2004). Le NPY se lie à plusieurs isoformes de récepteurs répartis dans l'hypothalamus. Ils sont au nombre de 6 et les isoformes Y1 et Y5 sont impliquées dans l'effet anorexigène, puisque des souris invalidées totalement pour l'un ou l'autre de ces récepteurs présentent une obésité avec diminution de la dépense énergétique et de la prise alimentaire (Burcelin *et al.*, 2001 ; Marsh *et al.*, 1998). Cependant, les mécanismes induits par ces deux récepteurs semblent être différents, puisque les souris Y1-/- à jeun présentent une hyperinsulinémie et une intolérance au glucose (Burcelin *et al.*, 2001), alors que les souris Y5-/- présentent une réponse normale au jeûne (Marsh *et al.*, 1998). Les récepteurs Y2 et Y4 participeraient, quant à eux, à un rétro-contrôle négatif (Williams *et al.* 2001). Par ailleurs, des études chez l'animal indiquent que le NPY induirait plus particulièrement la consommation de glucides (Stanley *et al.* 1985 ; Morley *et al.* 1987).

- La MCH est un neuropeptide cyclique de 19 aa, à effet orexigène, que l'on trouve principalement dans l'hypothalamus latéral et qui joue un rôle important dans la balance énergétique (Flier, 2004). Une déficience en MCH induit chez la souris une diminution de la prise alimentaire et une perte de poids (Williams, 2004). Il a été également montré qu'une ablation spécifique des neurones à MCH provoque une hypophagie et une augmentation de la dépense énergétique (Alon and Friedman 2006). A l'inverse, une perfusion centrale de MCH chez le rat induit une hyperphagie avec augmentation du poids (Williams, 2004).

- Les orexines, appelées aussi hypocrétines, existent sous deux formes. L'orexine A (OXA) et l'orexine B (OXB) ont été identifiées en 1998 (Sakurai 1998). Ces deux

polypeptides d'environ 30 aa, essentiellement localisés dans la partie dorsolatérale de l'hypothalamus et dans l'hypothalamus latéral (Rodgers *et al.* 2001), proviennent de l'hydrolyse de la prépro-orexine, polypeptide de 130 acides aminés. Les orexines, et en particulier l'OXA, affectent l'appétit de façon circadienne. En effet, une perfusion icv chronique de 8 jours chez le rat augmente la prise alimentaire durant la phase diurne, mais provoque un effet compensatoire de réduction de la prise alimentaire la nuit, n'entraînant *in fine* aucune modification de la prise alimentaire quotidienne ni du poids (Rodgers *et al.* 2001). De même, des études chez l'Homme montrent qu'une perfusion périphérique d'OXA n'affecte pas le comportement alimentaire mais réduit pourtant les taux de leptine et diminue la vidange gastrique (Ehrstrom *et al.* 2005).

2) Principales molécules anorexigènes

- Le CART est présent dans plusieurs organes, notamment le cerveau, particulièrement l'hypothalamus. Il est généralement co-exprimé dans les neurones de premier ordre à POMC, sécrétant l' α -MSH (Aja *et al.*, 2001). C'est un peptide anorexigène de 129 aa (une seconde forme de 116 aa existe chez le rat) qui s'oppose aux effets du NPY et augmente la sécrétion d'ACTH. L'expression du CART est colocalisée avec celle de la POMC dans le noyau arqué, avec celle de la MCH dans les aires latérales hypothalamiques, et avec celle de la TRH dans le PVN. La synthèse de CART dans le noyau arqué est diminuée par le jeûne et augmentée par l'administration icv ou sous-cutanée de leptine (McAlister 2004). Les souris obèses (invalidées pour le gène de la leptine) ou des rats *fa/fa* présentent une diminution de l'expression hypothalamique de CART, par rapport à des animaux témoins (Duan *et al.*, 2007). La perfusion icv de CART réduit de manière dose-dépendante la prise alimentaire chez le rat et le poulet (Lambert *et al.*, 1998 ; Vettor *et al.*, 2002). Le CART induit également la synthèse de protéines découplantes qui augmentent les dépenses d'énergie. Stanley et coll. démontrent que l'injection icv de CART inhibe la prise alimentaire par l'intermédiaire d'une stimulation de la libération de CRH, de TRH et de NPY et une inhibition de la libération d' α -MSH dans l'hypothalamus (Stanley *et al.*, 2001). L'effet du CART sur la prise alimentaire semble cependant controversé. En effet, l'étude de peptides recombinants de CART suggère un effet antagoniste de CART sur la prise alimentaire chez le rat (Couceyro *et al.*, 2003). Une étude plus récente montre finalement que la surexpression de CART dans le PVN par une

méthode adénovirale induit une augmentation de la prise alimentaire d'environ 4 à 6% chez le rat après plusieurs semaines (Smith *et al.*, 2008).

- La corticolibérine ou CRH (corticotropin-releasing hormone) est un neuropeptide de 41 aa sécrété principalement au niveau du noyau paraventriculaire. Une injection centrale de CRH chez le rat inhibe sa prise alimentaire et réduit son poids (Vettor *et al.* 2002), tandis qu'une injection périphérique de CRH chez l'Homme stimule ses dépenses énergétiques et l'oxydation des graisses (Smith *et al.* 2001). L'inhibition de la prise alimentaire implique la liaison de la CRH à deux récepteurs : le récepteur de type 1 (CRH-R1) qui stimule la motricité colique, et le récepteur de type 2 (CRH-R2) impliqué dans l'inhibition de la vidange gastrique. En outre, il a été montré que cet effet était supprimé après vagotomie, indiquant que le mécanisme implique les efférences vagales. La CRH augmente également l'activité nerveuse sympathique et de ce fait la thermogénèse, la dépense énergétique et la lipolyse.

- La TRH est un tripeptide exprimé principalement dans le noyau paraventriculaire. Une perfusion icv de TRH réduit la prise alimentaire et la consommation d'eau chez le rat (Vettor *et al.* 2002) et favorise une balance énergétique négative (Al-Arabi *et al.* 2003). In vitro, l'-MSH stimule la libération de TRH par l'hypothalamus (Kim *et al.*, 2000). A l'inverse, l'administration d'AgRP dans le ventricule latéral inhibe l'expression de la TRH dans le PVN (Fekete *et al.* 2004).

c. Les hormones périphériques

Le noyau arqué de l'hypothalamus est la cible de facteurs circulants capables d'informer le cerveau sur les réserves et les besoins énergétiques et métaboliques de l'organisme. Les hormones impliquées dans cette signalisation peuvent agir à long terme, comme l'insuline et la leptine ou à court terme, comme le peptide YY₃₋₃₆ (PYY) (**Tableau III**).

1) L'insuline et la leptine : régulation à long-terme de la prise alimentaire

L'insuline et la leptine sont le reflet de réserves ou d'apports énergétiques importants et possèdent un pouvoir anorexigène puissant.

a) Description des hormones

Au cours du 20^{ème} siècle, Gordon Kennedy propose pour la première fois que des signaux circulants, sécrétés en proportion des stock de graisses corporelles, modulent la prise alimentaire et la dépense énergétique (Kennedy 1953).

L'insuline est une hormone constituée de deux chaînes peptidiques de 21 et 30 aa et sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Cette sécrétion est directement contrôlée par la glycémie, et permet ainsi d'informer en temps réel l'organisme sur la disponibilité de son principal substrat énergétique : le glucose. Les effets de l'insuline sont médiés par le récepteur à l'insuline (famille des récepteurs à tyrosine kinase) et le récepteur à l'IGF-1 (pour les concentrations importantes d'insuline). Les voies activées par la fixation de l'insuline à son récepteur sont celles de la MAPK et de l' « insulin receptor substrate » (IRS)/Phosphatidyl-inositol 3-kinase (PI3K). Outre son action sur le métabolisme glucidique, l'insuline stimule la lipogenèse dans le foie et le tissu adipeux et inhibe la lipolyse. Elle possède également une action stimulatrice sur la synthèse hépatique de triglycérides. L'insuline est également impliquée dans d'autres fonctions, notamment la synthèse protéique musculaire et la plasticité synaptique (Plum 2006).

La leptine est une protéine de 167 aa libérée par le tissu adipeux en proportion de la masse de celui-ci. Elle permet ainsi de renseigner l'organisme sur ses réserves en lipides. La fixation de la leptine à son récepteur (famille des récepteurs de cytokines de classe I) active plusieurs voies de signalisation : la voie des Janus kinases (JAK), la voie « signal transducer and activator of transcription » (STAT), la voie « 5'-AMP-activated protein kinase » (AMPK) et enfin les voies MAPK et PI3K communes avec l'insuline (Niswender *et al.*, 2003). La leptine affecte le métabolisme lipidique par plusieurs voies centrales et périphériques (Havel 2004). Dans le muscle, elle stimule l'oxydation des acides gras par une activation de l'AMP-activated protein kinase (Minokoshi *et al.*, 2002). Elle joue également un rôle dans d'autres fonctions, notamment la plasticité synaptique des neurones du noyau arqué (Bouret *et al.*, 2004 ; Pinto *et al.*, 2004), la réponse inflammatoire et le développement osseux (Cohen 2006).

b) Régulation de l'expression et de la sécrétion des hormones

Il existe une boucle de rétrocontrôle entre ces deux hormones. En effet, l'insuline stimule la synthèse et la sécrétion de leptine par les adipocytes *in vivo* et *in vitro* (Saladin *et*

al., 1995 ; Kolaczynski *et al.* 1996), et la leptine diminue la synthèse et la sécrétion d'insuline par les cellules pancréatiques (Seufert 2004). Par ailleurs, de nombreux facteurs ont été décrits comme modulant l'expression et la sécrétion de la leptine. Parmi ceux-ci, les glucocorticoïdes et les cytokines les augmentent alors que l'AMPc, les thiazolidinediones, et les agonistes α -adrénergiques les diminuent (Auwerx *et al.*, 1998).

c) Action des hormones sur la prise alimentaire et mécanismes impliqués

Les ARN messagers codants pour les récepteurs à l'insuline et à la leptine sont exprimés dans le noyau arqué (Mercer *et al.* 1996 ; Bruning *et al.* 2000) et l'administration centrale de ces hormones réduit la prise alimentaire et le gain de poids (Ikeda *et al.* 1986 ; Halaas *et al.* 1997 ; Woods *al.* 1979). Le rôle critique de l'insuline et de la leptine dans la régulation de l'homéostasie énergétique est clairement confirmé par les modèles génétiques d'obésité et d'hyperphagie résultant d'une déficience totale de la leptine (souris ob/ob (Zhang *et al.* 1994)), du récepteur à la leptine (souris *db/db* (Lee *et al.* 1996)) ou du récepteur neuronal à l'insuline (souris NIRKO (Bruning *et al.* 2000)).

Le groupe d'Obici est parvenu à réduire significativement le signal hypothalamique de l'insuline en injectant dans le troisième ventricule un oligonucléotide antisens conçu pour inhiber l'expression du récepteur à l'insuline dans les noyaux proches. Il en résulte une rapide hyperphagie associée à une augmentation de l'expression du NPY et de l'AgRP (Obici *et al.* 2002a). De plus, une injection icv d'insuline inhibe l'expression de NPY et d'AgRP (Plum *et al.* 2006 ; Schwartz *et al.*, 1992) et stimule l'expression de la POMC (Benoit *et al.*, 2002), confirmant l'action de l'insuline sur le système mélanocortinergique.

Par ailleurs, des travaux montrent que la leptine inhibe l'expression des gènes du NPY et de l'AgRP (Morisson *et al.*, 2005) et stimule l'expression de la POMC (Schwartz *et al.* 2000 ; Ma *et al.* 2008), démontrant que la leptine agit également via le système mélanocortinergique. Chez les rongeurs, la leptine stimule la sécrétion de TRH, alors que la TRH inhibe la sécrétion de leptine (Garcia, 2002).

L'insuline et la leptine ont un double effet puisqu'elles stimulent les voies neuronales anorexigènes tout en réprimant les circuits induisant la prise alimentaire (Schwartz *et al.* 2000). En effet, les travaux du groupe de Cowley (Cone *et al.* 2001 ; Cowley *et al.* 2001) permettent de proposer un modèle de régulation par la leptine des neurones à POMC et à

NPY/AgRP du noyau arqué qui prend en compte les interactions entre les deux populations de neurones ainsi que les phénomènes d'autorégulation s'exerçant sur les deux systèmes. La leptine agirait ainsi à plusieurs niveaux sur les neurones à POMC et à AgRP (**Figure III**).

Des études menées chez le rat montrent que selon l'état nutritionnel de l'animal, la leptine exerce des effets différents sur la sécrétion de CRH, neuropeptide anorexigène. En effet, à jeun, elle diminue l'expression du peptide et l'activité des neurones à CRH, alors qu'à l'état nourri, elle les augmente (Ahima *et al.*, 1996 ; Huang *et al.*, 1998).

2) Les hormones intestinales

a) La cholécystokinine

La cholécystokinine (CCK) est un polypeptide dont il existe plusieurs isoformes bioactives de notamment 58, 33, 22 ou 8 aa, nommées CCK58, CCK33, CCK22 et CCK8 respectivement et résultantes d'hydrolyses de la pré-procholécystokinine qui comporte 115 acides aminés (Rehfeld 2004 ; Rehfeld *et al.* 2001). Ces peptides sont sécrétés principalement en périphérie par les cellules entéro-endocrines en réponse à l'arrivée de lipides et de protéines dans la lumière intestinale (Liddle *et al.* 1985). La CCK8 est également synthétisée au niveau du système nerveux central (Rehfeld *et al.* 2003). Il a été montré que, dans certaines conditions, l'administration intraveineuse de CCK exogène réduit la taille du repas et augmente le rassasiement chez différentes espèces animales (Geary 2004) et chez l'Homme (Kissileff *et al.* 1981 ; Lieverse *et al.*, 1995 ; Gutzwiller *et al.* 2001).

Des études suggèrent qu'une partie des effets de la CCK s'expliquerait par des distensions gastriques (Kissileff *et al.* 2003) médiées par la sérotonine (Hayes *et al.* 2004). Cependant, il a été montré qu'après chirurgie du sphincter pylorique (Moran and McHugh 1988), la CCK conserve un effet anorexigène, qui disparaît lors de la lésion du nerf vague (Moran and Kinzig, 2004). Le mécanisme impliquerait en particulier la stimulation des neurones à POMC présents dans le noyau du tractus solitaire, en réponse au signal généré par la fixation de la CCK sur ses récepteurs spécifiques au niveau des terminaisons nerveuses des afférences vagues (Appleyard S.M., 2005). De plus, les effets anorexigènes de la CCK sont perdus chez des souris invalidées pour le gène du MC4-R ou chez lesquelles les récepteurs aux mélanocortines sont bloqués pharmacologiquement au niveau du tronc cérébral (Fan *et*

al., 2004). Ces données confirment le rôle du système mélanocortinergique dans les effets de la CCK sur le comportement alimentaire.

b) Le glucagon-like peptide-1

Le glucagon-like peptide-1 (GLP-1) est une hormone produite par le tractus gastro-intestinal en réponse à une prise alimentaire (Drucker *et al.* 2006). Il fait partie de la famille des incrélines (hormones intestinales qui peuvent réguler les sécrétions pancréatiques). C'est un polypeptide à effet anorexigène constitué de 30 acides aminés, sécrété principalement par les cellules L de l'iléon et du colon. Le principal effet du GLP-1, libéré en périphérie, est d'induire la synthèse d'insuline et sa sécrétion en réponse au glucose, et de réduire la libération de glucagon en réponse au glucose (Bojanowska, 2005 ; Holst 2005). Une perfusion intraveineuse de GLP-1 inhibe également la sécrétion et la motilité gastriques (Naslund *et al.* 1999b). Par ailleurs, des études chez l'Homme confirment que le GLP-1 diminue la prise alimentaire de manière dose-dépendante et augmente la dépense énergétique, chez des sujets sains, obèses ou diabétiques (Gutzwiller *et al.* 1999a, Gutzwiller *et al.* 1999b ; Naslund *et al.* 1999a). D'autres travaux montrent qu'une perfusion intraveineuse d'exendine-4, un agoniste à action longue du GLP-1, chez l'Homme, est suivie d'une diminution de la prise alimentaire (Edwards *et al.* 2001 ; Bray, 2006). Le récepteur au GLP1 a été identifié dans différentes aires impliquées dans le contrôle de l'appétit, incluant le noyau arqué et le PVN. De plus, la perfusion de GLP-1 en icv chez le rat provoque une diminution de la prise alimentaire et une perte de poids (Turton *et al.* 1996 ; Meeran *et al.* 1999). Il a d'ailleurs été mis en évidence une action du GLP-1 sur les neurones hypothalamiques de premier ordre. En effet, une injection icv de GLP-1 chez des rats à jeun 48h atténue, d'une part, l'augmentation des taux d'ARNm du NPY et de l'AgRP hypothalamiques, et d'autre part la diminution des taux d'ARNm de POMC et CART hypothalamiques, induites par le jeûne (Seo *et al.*, 2008). Les auteurs suggèrent que le mécanisme impliquerait une abolition, par le GLP-1, de l'augmentation de l'expression de la MAPK, voie de signalisation intracellulaire induite par le jeûne dans les neurones hypothalamiques concernés. L'hypothèse d'une synergie avec la leptine a été proposée, mais les mécanismes impliqués restent inconnus (Williams, 2006).

c) Le PYY

Le PYY, composé de 36 aa, est sécrété sous deux formes, i.e. PYY1-36 et PYY3-36, principalement par les cellules endocrines L du tube digestif proportionnellement au contenu énergétique du repas (Batterham *et al.*, 2003). L'injection de ces peptides en périphérie provoque une inhibition de la vidange gastrique chez l'Homme et le singe (Allen *et al.* 1984 ; Moran *et al.* 2005). L'action du PYY au niveau central est encore débattue. En effet, tandis qu'une administration icv de PYY provoque une augmentation de la prise alimentaire (Kanatani *et al.* 2000), l'injection de PYY directement dans le noyau arqué de rongeur provoque une diminution de la prise alimentaire (Batterham *et al.* 2002). Ce paradoxe semble être expliqué par l'existence de plusieurs récepteurs d'affinité variable pour le PYY, qui seraient distribués de manière hétérogène au sein de l'hypothalamus. En effet, le récepteur Y2 est exprimé sur les neurones du noyau arqué, tandis que les récepteurs Y1 et Y5 sont présents dans le noyau paraventriculaire. Cependant, il a été largement montré que l'administration périphérique de PYY3-36 réduit la prise alimentaire aussi bien chez l'animal que chez l'Homme, obèse ou sain chez lequel il prolonge également l'intervalle inter-repas (Moran *et al.* 2005 ; Batterham *et al.* 2002 ; Batterham *et al.* 2003 ; Halatchev *et al.* 2004 ; Chaudhri *et al.* 2006 ; Degen *et al.* 2005). L'effet anorexigène du PYY disparaît chez les souris invalidées pour le gène du récepteur Y2 (Batterham *et al.* 2002), suggérant la fixation du PYY au niveau du noyau arqué. Cependant, l'ARNm du récepteur Y2 a également été détecté au niveau du NTS et du nerf vague suggérant que le PYY agirait sur l'hypothalamus au moins en partie via des afférences vagues ciblant le NTS (Gustafson *et al.* 1997 ; Koda *et al.* 2005). Cette hypothèse a été confirmée par d'autres études de dénervation (Abbott *et al.* 2005a). Par ailleurs, des travaux de Batterham réalisés sur des souris invalidées pour le PYY suggèrent que ce peptide jouerait un rôle dans l'effet anorexigène des protéines alimentaires (Batterham *et al.* 2006). En effet, les auteurs montrent que des souris invalidées pour le gène codant le PYY, présentent une résistance à l'effet hypophagique des protéines et développent rapidement une obésité.

3) La ghréline

La ghréline est un polypeptide orexigène composé de 28 acides aminés, sécrété en majeure partie par l'estomac et, à un moindre degré, par différents organes : l'intestin, le

pancréas, le rein, mais aussi l'hypothalamus et l'hypophyse (Cowley *et al.* 2003). La sécrétion de ghréline est induite par le jeûne et l'hypoglycémie provoquée par l'insuline, tandis qu'elle chute rapidement après la prise d'aliments (Tschop *et al.* 2001). Par ailleurs, les patientes anorexiques de l'étude de Tolle et coll. présentent un taux de ghréline plasmatique plus élevé que les témoins (Tolle et al. 2003). Cependant la re-nutrition, chez ces femmes, normalise leur taux de ghréline circulante, suggérant que celui-ci reflèterait simplement l'état nutritionnel des patientes. En effet, le poids ne semble pas être un élément de régulation de la sécrétion de ghréline et les auteurs suggèrent plutôt le développement, chez les patientes anorexique, d'une résistance à la ghréline.

L'administration périphérique de ghréline stimule rapidement la prise alimentaire (effet à court-terme) (Wren *et al.* 2001) et inhibe l'utilisation des graisses (effet à long-terme) (Strassburg et al. 2008). La ghréline joue en effet un rôle important dans le métabolisme adipocytaire et la gestion des lipides en induisant la lipogenèse et en inhibant la lipolyse du tissu adipeux blanc (Theander-Carrillo *et al.* 2006). Il a été observé également que des souris déficientes en ghréline ne développent pas d'obésité en réponse à un régime enrichi en graisses. Par ailleurs, les effets de la ghréline sur le tissu adipeux sont abolis chez les souris invalidées pour les récepteurs β -adrénergiques, suggérant un rôle clef du système sympathique. L'équipe de Rohner-Jeanrenaud a également mis en évidence, par comparaison entre des souris nourries ad-libitum et des souris dont l'apport alimentaire a été volontairement restreint, que cet effet à long-terme d'une perfusion chronique de ghréline sur le tissu adipeux est indépendant de l'effet à court-terme sur la prise alimentaire. En accord avec ces données, de récents travaux montrent que la perfusion périphérique d'un anticorps dirigé contre la ghréline abolit l'induction de la prise alimentaire provoquée par l'insuline mais ne semble pas affecter l'effet à long-terme de la ghréline sur la régulation de la balance énergétique (Lu et al. 2009). Du fait de la présence du récepteur à la ghréline (GHS-R1a) au niveau des neurones à AgRP/NPY, la ghréline pourrait agir au niveau de l'hypothalamus en stimulant la biosynthèse et la sécrétion de l'AgRP et du NPY, et en inhibant les neurones à POMC (Lucidi *et al.* 2005 ; Takayama *et al.*, 2007). Par ailleurs, le récepteur à la ghréline est également présent au niveau des neurones afférents du nerf vague. Des travaux de Date et coll. ont apporté la preuve de l'implication de ce mécanisme dans l'action centrale de la ghréline (Date *et al.*, 2002). En effet, les auteurs ont montré que l'injection intraveineuse de ghréline chez des rats vagotomisés, ou dont les afférences vagues ont été spécifiquement détruites, induit une perte de l'effet orexigène de la ghréline associée notamment à une absence d'activation des neurones à NPY. Par ailleurs, une perfusion intraveineuse de

ghréline chez l'homme inhibe la sécrétion d'insuline, indiquant mécanisme d'action de la ghréline sur la prise alimentaire impliquant l'insuline (Broglia et al. 2003). D'autre part, une perfusion icv chronique de ghréline augmente l'utilisation du glucose dans le tissu adipeux induite par l'insuline, lors d'un clamp hyperinsulinémique-euglycémique chez la souris (Theander-Carrillo et al. 2006).

4) Les glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes (GC) sont produits par la zone fasciculée de la corticosurrénale. Les hormones biologiquement actives sont le cortisol et la corticostérone (chez l'Homme et les rongeurs respectivement), produites à partir du cholestérol au cours de la stéroïdogenèse. Ils sont sécrétés lors de stress physiologiques et lorsque l'organisme doit mobiliser ses réserves énergétiques. Les GC favorisent l'accumulation des triglycérides (TG) via une induction de la lipoprotéine lipase dans les adipocytes, dont ils stimulent la différenciation (Ottoosson *et al.*, 1994). Ils agissent également notamment sur la pression sanguine puisqu'ils augmentent l'expression de l'angiotensinogène et des récepteurs à l'angiotensine de type 1 (Sato *et al.*, 1994), tout en réduisant la production des facteurs vasodilatateurs que sont les prostaglandines et l'oxyde nitrique (Falardeau *et al.*, 1989). Les GC ont également une action anti-inflammatoire et immunodépressive (Fauci *et al.*, 1975 ; Dhabhar *et al.*, 1996, Cox *et al.*, 1982).

Depuis longtemps, la surrénalectomie est connue pour corriger les phénotypes d'obésité, notamment chez des souris invalidées pour le gène codant pour la leptine (Solomon *et al.*, 1973 ; Makimura *et al.* 2000). Elle provoque une diminution de la prise alimentaire et du poids corporel (Bellinger *et al.*, 1979 ; Green *et al.*, 1992), en augmentant la sensibilité à la leptine et à l'insuline (Zakrzewska *et al.*, 1997 ; Chavez *et al.*, 1997). Les GC semblent également jouer un rôle dans l'action du NPY, car l'absence de GC chez l'animal surrénalectomisé annule la réponse à une administration chronique de NPY (Sainsbury *et al.*, 1997). Par ailleurs, chez le rongeur surrénalectomisé, le traitement par des GC provoque la réapparition du phénotype obèse, démontrant le rôle permissif des GC dans le développement de l'obésité (Sainsbury *et al.*, 1997).

3. Effets des nutriments et mécanismes d'action.

L'ingestion et l'absorption des différents nutriments initient le déclenchement de signaux nerveux et hormonaux spécifiques. Mais les mécanismes complets ne sont pas encore caractérisés.

a. Lipides alimentaires

De nombreuses études consacrées aux relations entre composition lipidique du régime et régulation pondérale suggèrent que les lipides entraînent plutôt un effet délétère sur l'équilibre énergétique, tout au moins lorsque leur apport alimentaire est élevé. Il a été montré que la prise calorique sur 24h chez les rats soumis à un régime riche en graisses est doublée par rapport à des rats nourris par un régime standard (Cruciani-Guglielmacci *et al.*, 2004). Par ailleurs, d'autres études ont montré que la prise d'un « pré-repas » lipidique, comparé à un « pré-repas » équi-calorique pauvre en lipides, induit significativement la prise alimentaire de 40 à 50% pour le repas suivant (Gaysinskaya *et al.*, 2007). Les auteurs suggèrent que l'effet serait principalement dû à l'augmentation de la libération, dans l'hypothalamus, des hormones orexigéniques, notamment les orexines.

Chez la souris, un régime pauvre en lipides induit l'expression de l'AgRP tandis qu'un régime riche en lipides diminue l'expression de l'AgRP, sans modifier l'expression de NPY (Stazkiewics *et al.*, 2007). De plus, d'autres travaux ont montré qu'un régime riche en graisses et pauvre en hydrates de carbone diminue l'expression du gène de la POMC d'environ 45% dans le noyau arqué, suggérant un mécanisme d'induction de la prise alimentaire par les lipides (Kinzig *et al.* 2005). Ceci est associé également à une diminution des taux de leptine et de ghréline circulants, et une augmentation de l'insulinémie (Kinzig *et al.* 2005). Par ailleurs, une étude montre qu'un régime riche en graisses active, via l'augmentation des lipides circulants, la libération dans le PVN de galanine, peptide connu pour ses effets orexigènes (Leibowitz, 2005).

Cependant, il a été montré qu'une injection icv d'acide oléique (acide gras monoinsaturé) inhibe la prise alimentaire (Obici *et al.* 2002b), suggérant que la nature des acides gras jouerait un rôle important dans l'effet global des lipides alimentaires.

b. Glucose et « signal glucose portal »

Il a été observé, à la fois chez le rat et l'Homme, que les repas spontanés sont précédés d'un profil glycémique typique qui consiste en un léger fléchissement. En effet, la détection des variations de la glycémie par différentes cellules nerveuses va permettre l'organisation des comportements ingestifs.

Il a été montré chez la souris à jeun qu'une perfusion intrapéritonéale de glucose réduit la prise alimentaire par réversibilité de l'activation des neurones du noyau arqué induite par le jeûne (Becskei *et al.* 2008). De plus, le glucose participe aux mécanismes de la satiété par l'intermédiaire des hormones et médiateurs qu'il mobilise, en particulier l'insuline, hormone anorexigène.

Par ailleurs, le glucose *per se* est une molécule « signal » clef, détectée en veine porte et capable de diminuer la prise alimentaire (Thorens and Larsen, 2004). Plusieurs travaux réalisés dès les années 70-80 montraient déjà que des perfusions de glucose spécifiquement en veine porte induisent une diminution de la prise alimentaire chez le rat et le chien (Tordoff and Friedman, 1986 ; Tordoff *et al.*, 1989 ; Russek 1970 ; Langhans *et al.*, 2001). Des études par stimulation de la branche hépatique du nerf vague ont révélé la transmission du « signal glucose portal » jusqu'au noyau du tractus solitaire (Adachi *et al.*, 1981 ; Adachi *et al.*, 1984). Des perfusions de glucose à différents niveaux de la veine porte, i.e. à la sortie de l'intestin et à l'entrée du foie, ont permis de mettre en évidence la présence d'« unités » sensibles au glucose spécifiquement dans la veine porte (Hevener *et al.*, 1997 ; Hevener *et al.*, 2001). Ainsi, des faibles variations de la glycémie peuvent être détectées au niveau de la veine porte, créant ainsi un signal, qui transite via le nerf vague et provoque *in fine* une diminution de la prise alimentaire.

Le glucose étant un fort signal contrôlant la prise alimentaire, les mécanismes régulant sa concentration plasmatique, en particulier dans la veine porte, et sa production, sont donc majeurs dans la compréhension du contrôle de la prise alimentaire.

Notre hypothèse de travail est que les régimes protéiques pourraient induire de telles modifications du métabolisme glucidique et participer ainsi à l'effet anorexigène des protéines alimentaires.

c. Protéines alimentaires

Les protéines sont connues depuis longtemps pour induire la satiété. En effet, en 1955, Fryer *et al.* observent déjà que des sujets nourris par un régime pauvre en protéines (13%) avaient « continuellement faim », tandis qu'un régime pauvre en glucose (et riche en protéines) les satisfaisait mieux. Les études de consommation effectuées au cours de différents travaux ont confirmé ces premières données subjectives (Louis-Sylvestre 2002). D'autres études confirment que les protéines diminuent la sensation de faim et consécutivement la prise alimentaire chez l'animal et chez l'Homme (Barkeling *et al.* 1990 ; Booth *et al.*, 1970 ; Jean *et al.*, 2001 ; Rolls *et al.*, 1988). Des travaux ont par ailleurs montré qu'un régime riche en protéines induit l'expression du gène codant la POMC dans le noyau arqué et l'expression du gène du NPY dans le noyau dorso-médian de l'hypothalamus, sans modification des taux de leptine et de ghréline plasmatiques (Kinzig et al, 2007).

Cependant, les mécanismes impliqués dans l'effet anorexigène des protéines n'ont jusqu'à présent pas été complètement élucidés. Un certain nombre de travaux ont cependant permis d'écarter plusieurs hypothèses sur l'origine de l'effet anorexigène des protéines. En effet, l'effet anorexigène ne semble être dû ni simplement à un mécanisme d'aversion (L'Heureux-Bouron *et al.*, 2004b), ni à la distension de l'estomac provoquée par l'ingestion, induite par le régime riche en protéine, de quantités d'eau plus importantes (L'Heureux-Bouron *et al.*, 2004a). La palatabilité des aliments ne semble pas non plus être un élément déterminant dans l'effet anorexigène des protéines (L'Heureux-Bouron *et al.*, 2004a, Mithieux et al. 2005).

II. Homéostasie glucidique

Le glucose est la principale source d'énergie de l'organisme. Il est donc nécessaire de maintenir une glycémie constante et suffisante pour fournir cette énergie à l'ensemble des tissus. En effet, certains tissus comme le cerveau, les globules rouges, la région médullaire du rein, le cristallin et le muscle en contraction rapide ont besoin d'un approvisionnement continu en glucose. La notion d'homéostasie glucidique a été confirmée par Mann et Magath en 1924 (Mann and Magath, 1924). En dehors des périodes de repas, lorsque l'intestin n'absorbe plus de nutriments, une production de glucose se met en place au sein des trois

tissus glucoformateurs pour assurer le maintien de la glycémie. Cette stabilité est assurée en grande partie par le foie qui stocke ou libère du glucose sous l'action de mécanismes endocriniens (insuline, glucagon, catécholamines), métaboliques (nutriments) ou nerveux. Dans certaines conditions d'insulinopénie, le rein et, plus récemment, l'intestin, sont apparus comme d'importants régulateurs de l'homéostasie glucidique (Stumvoll *et al.* 1997 ; Croset *et al.* 2001 ; Gerich *al.* 2001)

1. Production endogène de glucose : les trois tissus glucoformateurs

a. Généralités

Le foie est généralement considéré comme étant le principal organe producteur de glucose (Mittelman and Bergman, 1998). Il contribue en effet à près de 80% de la production endogène de glucose (PEG) à l'état post-absorptif (5 à 6 heures de jeûne). La production hépatique de glucose (PHG) mobilise les deux voies métaboliques impliquées dans la PEG : la glycogénolyse en premier lieu, puis la néoglucogenèse (Nordlie *et al.*, 1999).

La caractérisation de la PEG au cours du jeûne prolongé a été révélatrice du rôle majeur du rein et de l'intestin dans l'homéostasie glucidique (Mithieux *et al.*, 2006 ; Owen *et al.*, 1969).

En effet, la production rénale de glucose (PRG) représenterait 20 et 45% de la PEG chez les rats à l'état post-absorptif et à jeun 24h respectivement (Kida *et al.*, 1978), proportion qui se maintient lorsque le jeûne se prolonge (Mithieux *et al.*, 2006). A l'état post-absorptif chez l'Homme, l'importance de la PRG reste sujette à controverse et varierait de 5% à 20% (Cersosimo *et al.*, 1999 ; Ekberg *et al.*, 1999). Au cours du jeûne prolongé de jeunes obèses (3 semaines), il a été suggéré que le rein contribuerait à la moitié environ de la PEG (Owen *et al.*, 1969).

En situation post-absorptive, la contribution de l'intestin à la PEG est très faible, inférieure à 10%. Celle-ci devient majeure dans les situations de jeûne prolongé et peut s'élever jusqu'à 20 et 35% de la PEG chez les rats à jeûn pendant 48h et 72h respectivement (Croset *et al.* 2001 ; Mithieux *et al.* 2004a). Ainsi, lorsque le jeûne se prolonge, le foie diminue sa production et est relayé par les deux organes néoglucogéniques, dans lesquels la voie de la néoglucogenèse est largement majoritaire, la quantité de glycogène étant négligeable dans ces tissus.

L'importance des organes extra-hépatiques dans le maintien de la PEG a été confirmée durant la phase anhépatique d'une transplantation de foie chez l'Homme (Battezzati *et al.* 2004).

b. Rôle majeur de la glucose-6-phosphatase dans la production endogène de glucose.

Les études de Cori et coll. ont permis de mettre en évidence la présence d'une phosphatase qui permet au glucose-6-phosphate (G6P) d'être dégradé en glucose, lequel est ensuite libéré dans le sang (Cori *et al.*, 1939) (**Figure IV**). De Duve et coll. purifient partiellement cette phosphatase (la glucose-6-phosphatase (Glc6Pase)) qui catalyse l'hydrolyse du glucose-6-phosphate (G6P) en glucose et phosphate inorganique, et montrent plus tard qu'elle est localisée dans le réticulum endoplasmique (de Duve *et al.*, 1949). L'existence de mutations de la Glc6Pase responsables des glycogénoses de type 1 (ou maladie de Von Gierke) apporte la preuve de son rôle essentiel dans la libération du glucose dans la circulation sanguine. En effet, la perte d'activité Glc6Pase chez les patients atteints de ces désordres métaboliques héréditaires se traduit notamment par de sévères hypoglycémies et une accumulation de glycogène hépatique (Burchell, 1990). La Glc6Pase confère aux tissus qui l'expriment, i.e. le foie, le rein et l'intestin, la capacité de libérer du glucose dans la circulation sanguine (Adroque, 1992 ; Mithieux, 1997, Mittelman and Bergman, 1999 ; Rajas *et al.*, 1999). La Glc6Pase est un complexe comprenant une sous-unité catalytique (G6PC) et une sous-unité responsable du transport de G6P à travers la membrane du réticulum endoplasmique (Glc6PT) (van Schaftingen *et al.*, 2002). Ce modèle est confirmé par l'existence de seulement deux formes de glycogénose 1 (pathologie associée à un défaut de l'activité Glc6Pase) dues à des mutations, soit dans le gène de la G6PC (glycogénose 1a), soit dans le gène de la G6PT (glycogénose 1b) (Veiga-da-Cunha *et al.*, 2000).

c. Synthèse de glucose à partir du glycogène : la glycogénolyse

Le foie a longtemps été considéré comme le tissu glucogénique exclusif, du fait de sa participation majeure dans la PEG, en situation physiologique post-absorptive. En effet, au

XIX^{ème} siècle, Claude Bernard découvre la « fonction glycogénique du foie » et introduit l'idée d'une fabrication chimique de « sucre » dans le foie et désigne la substance hépatique à l'origine de ce sucre par le nom de « matière glycogène » (Bernard, 1850). Plus tard, il purifie « cet amidon animal » et présente sa méthode de préparation peu différente de celles encore utilisées de nos jours (Bernard, 1857). Ce glycogène hépatique constitue une réserve de glucose rapidement mobilisable. En effet, la dégradation du glycogène par la glycogène phosphorylase active libère directement une molécule de glucose-1-phosphate (**Figure IV**). Cette enzyme constitue le site majeur de la régulation de la glycogénolyse. Contrairement aux muscles squelettiques, dans lesquels le glucose-1-phosphate est pris en charge pour fournir immédiatement de l'énergie via la glycolyse, le foie exprime la Glc6Pase qui lui permet de produire du glucose à partir de G6P et de le libérer dans la circulation sanguine. Le foie a la capacité de capter le glucose issu de l'absorption intestinale et apporté par la veine porte, de le stocker sous forme de glycogène et de le restituer ainsi par la voie de la glycogénolyse pour le redistribuer rapidement aux autres tissus par l'intermédiaire de la circulation systémique (Nordlie and Arion, 1964). Ainsi, au cours des premières heures de jeûne, le foie est le premier organe à être mis en jeu car il maintient la glycémie en puisant dans ses réserves de glycogène.

Lorsque le jeûne se prolonge, le foie, de même que le rein et l'intestin, synthétisent *de novo* du glucose par la voie de la néogluco-genèse.

d. Synthèse de glucose à partir de substrats non glucidiques : la néogluco-genèse

Des travaux de Claude Bernard, résumés dans un ouvrage publié en 1877, ont contribué aussi bien à la notion de néogluco-genèse qu'à celle de glycogénogenèse (Bernard, 1877).

La voie de la néogluco-genèse est la synthèse *de novo* de glucose à partir de précurseurs non glucidiques (**Figure IV**). Déjà en 1937, en étudiant le devenir du lactate et du pyruvate dans le cortex rénal, Benoy et Elliott mettent en évidence que ces composés ne sont pas uniquement oxydés, mais qu'ils seraient précurseurs, en plus d'autres métabolites, d'une néosynthèse d'hydrates de carbone (Picckard, Benoy and Elliott, 1937). En effet, le pyruvate issu de l'oxydation du lactate par le métabolisme anaérobie, le glycérol issu de la lipolyse

adipocytaire, et certaines acides aminés libérés par la protéolyse musculaire, constituent les principaux substrats néoglucogéniques *in vivo* (Stumvoll *et al.*, 1998a).

Par ailleurs, la glutamine et l'alanine, deux acides aminés circulants les plus importants quantitativement, représentent également les substrats néoglucogéniques majoritaires chez l'Homme et l'animal (Stumvoll *et al.* 1997 ; Tessari and Garibotto, 2000). Il existe vis-à-vis de ces deux substrats une sélectivité des organes utilisateurs.

Stumvoll et coll. ont en effet montré chez l'Homme que la synthèse de glucose à partir d'alanine se produit principalement dans le foie (Stumvoll *et al.*, 1998a). A l'état post-absorptif, ce dernier ne capte pas ou peu de glutamine contrairement au rein ou à l'intestin (Felig *et al.*, 1973). Des travaux montrent cependant une augmentation du captage hépatique de glutamine chez des sujets post-absorptifs sains perfusés par du glucagon à des concentrations mimant celles mesurées en situation d'hypoglycémie (Stumvoll *et al.*, 1998b).

Des travaux ont mis en évidence que le rein utilise préférentiellement la glutamine comme précurseur néoglucogénique, plutôt que l'alanine (Stumvoll *et al.*, 1998a). Le fait que la glutamine est majoritairement utilisé dans le rein, et peu dans le foie, s'explique par l'existence de deux isoformes de la glutaminase aux propriétés cinétiques différentes et exprimées de manière tissu-spécifique (Curthoys et al. 1995). Cependant, plusieurs études combinant l'utilisation de précurseurs néoglucogéniques marqués et la mesure de la balance glycémique artérioveineuse rénale ont permis de mettre en évidence que le rein utiliserait plutôt le lactate comme substrat néoglucogénique (Cersosimo *et al.*, 2000 ; Meyer *et al.*, 2002).

Windmueller et Spaeth ont mis en évidence que l'intestin grêle constitue un site majeur d'utilisation de la glutamine et que le métabolisme entérocytaire de celle-ci conduit à la production d'alanine dans la veine porte (Windmueller and Spaeth, 1974 ; Windmueller, 1984). En outre, notre groupe a démontré que l'intestin utilise la glutamine comme principal substrat néoglucogénique chez le rat, et que cette voie de synthèse contribue également à la production d'alanine et de lactate, les deux principaux précurseurs néoglucogéniques hépatiques (Croset *et al.*, 2001 ; Mithieux 2004).

Ces différentes données soulignent l'existence d'interrelations complexes et de coopérations entre les trois organes néoglucogéniques, notamment en terme de substrats.

III. Régulation du métabolisme glucidique

Aussi bien une hypoglycémie qu'une hyperglycémie chronique, peuvent avoir de lourdes conséquences sur les tissus et leur métabolisme. Aussi, de nombreux mécanismes permettent de réguler finement l'utilisation et la production du glucose, et de normaliser au mieux le taux de glucose plasmatique.

Parmi les désordres métaboliques rencontrés chez les patients diabétiques, la dysrégulation de la production endogène de glucose, qui fait suite à l'instauration de l'insulino-résistance, reste la cause majeure du développement de la maladie (Ferrannini and Groop, 1989 ; Granner and O'Brien, 1992). En effet, un excès de production hépatique de glucose est associé à l'hyperglycémie chez les patients diabétiques de type 2 (Clore *et al.* 2000). Une étude très probante a montré que la simple surexpression de la G6PC au niveau hépatique par une technique adénovirale, chez le rat, est suffisante à l'instauration d'anomalies métaboliques associées à un état de pré-diabète (Trinh *et al.*, 1998).

1. Régulation par l'insuline

En période d'absorption alimentaire, l'apport de glucose par l'intestin va stimuler la sécrétion d'insuline par les cellules du pancréas, au sein des îlots de Langerhans. L'insuline sécrétée va diminuer la concentration plasmatique de glucose en inhibant la PEG d'une part et en induisant le captage et l'utilisation de glucose par les tissus d'autre part.

a. Inhibition de la production endogène de glucose

1) Voies de signalisation de l'insuline

La fixation de l'insuline sur son récepteur induit la phosphorylation des résidus tyrosine de ses substrats, en particulier des protéines IRS. Cette activation déclenche deux voies principales de signalisation impliquant la PI3K d'une part, et les MAPK d'autre part.

La voie de signalisation induite par la PI3K régule principalement les effets métaboliques de l'insuline via la phosphorylation de la « protéin kinase B » (PKB), tandis que

la voie des MAPK contrôle majoritairement les effets de prolifération et de différenciation par de l'insuline.

2) Action de l'insuline sur les enzymes de la glycogenolyse

L'insuline induit la phosphorylation de la glycogène synthase kinase, via la phosphorylation de la PKB, favorisant ainsi l'activation de la glycogène synthase, et la synthèse de glycogène. L'insuline induit également la « protein phosphatase 1 », ce qui permet l'inhibition de la glycogène phosphorylase. L'insuline stimule ainsi le stockage de glycogène hépatique (Bollen *et al.*, 1998).

3) Mécanisme général d'action de l'insuline sur les enzymes de la néoglucogenèse

Des études ont montré, par le biais de clamp hyperinsulinémique euglycémique chez des patients obèses, que l'insuline inhibe fortement la PEG (Prager *et al.* 1986). L'action de l'insuline prend place au niveau de la transcription des gènes, et au niveau de l'activité des enzymes-clefs de la néoglucogenèse. L'insuline inhibe ainsi la transcription de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et de la Glc6Pase par l'intermédiaire d'un élément de réponse à l'insuline (IRE) (Streeper *et al.* 1997 ; Onuma *et al.* 2008 ; O'Brien *et al.* 2001 ; Fougère and Ferre 2002). Le mécanisme implique la voie de la PI3K, dont les inhibiteurs abolissent l'action de l'insuline sur les gènes néoglucogéniques (Agati *et al.* 1998 ; Dickens *et al.* 1998), et dont la surexpression de la sous-unité catalytique est suffisante pour inhiber l'expression de ces gènes (Miyake *et al.*, 2002). De plus, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique à la PKB a permis de démontrer l'implication de cette voie de signalisation dans l'inhibition du gène de la G6PC par l'insuline (Logie et al. 2007). La mutation des IRS abolit l'inhibition du gène de la G6PC par l'insuline (Schmoll et al. 2000 ; Streeper et al. 1998). Le mécanisme moléculaire implique le facteur de transcription Foxo1 dont la liaison au promoteur a été démontré par immunoprécipitation de la chromatine (Vander Kooi et al. 2003). L'insuline induit la translocation de Foxo1 dans le cytoplasme annulant ainsi son activité transcriptionnelle. Par ailleurs, el Maghrabi et coll. ont montré que l'insuline inhibe la transcription de la fructose-1,6-bisphosphatase (el Maghrabi *et al.* 1988).

L'insuline contrôle également l'activité de la fructose-1,6-bisphosphatase via la régulation de la 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (6P2K/F2,6BPase). Cette dernière est à l'origine de la production de fructose-2,6-bisphosphate (F2,6BP), puissant inhibiteur allostérique de la fructose-1,6-bisphosphatase (Pilkis *et al.* 1981 ; Van Schaftingen *et al.*, 1981). En effet, la phosphorylation de la 6P2K/F2,6BPase dépend de la concentration d'AMPc (Kurland *et al.*, 1995). Le mécanisme d'action de l'insuline implique notamment l'activation de l'AMPc-phosphodiesterase par la PI3K, conduisant à une diminution de la concentration intracellulaire d'AMPc (Bollen *et al.*, 1998). En accord avec ces données, Wu et coll. montrent que la surexpression d'un mutant de la 6P2K/F2,6BPase présentant un déficit de l'activité phosphatase, chez la souris, conduit à une baisse de la glycémie consécutive à une diminution de la PHG (Wu *et al.*, 2001).

4) La néoglucogenèse extra-hépatique est sensible à l'insuline

a) Effet de l'insuline sur la production rénale de glucose

Chez le chien, comme chez l'Homme, il a été démontré que l'utilisation rénale de glucose est augmentée en réponse à une perfusion intrarénale d'insuline (Cersosimo *et al.* 1994 ; Cersosimo *et al.* 1999). Cependant, il est mentionné que la perfusion d'insuline ne diminuerait pas l'utilisation par le rein de ses principaux substrats néoglucogéniques. Ceci s'expliquerait par un « shunt » des substrats de la voie de la néoglucogenèse vers la voie de l'oxydation (Meyer *et al.* 1998). Par ailleurs, notre groupe a montré que l'induction de la Glc6Pase rénale par le diabète et le jeûne prolongé (situations insulino-péniques), chez le rat, est totalement abolie par l'insuline (Mithieux *et al.*, 1996) confirmant que, comme dans le foie, l'expression d'un gène régulateur majeur de la néoglucogenèse rénale est sensible à l'insuline.

b) Effet de l'insuline sur la production intestinale de glucose

La production intestinale de glucose est observable notamment en situations d'insulino-pénies telles que le jeûne prolongé et le diabète induit, situations pendant lesquelles l'expression de la Glc6Pase et celle de la PEPCK intestinales sont induites (Croset *et al.* 2001;

Mithieux *et al.*, 2004a). D'autres études montrent que ces taux d'expression sont normalisés par un traitement à l'insuline, confirmant que, comme dans le foie et le rein, la néoglucogenèse intestinale est sensible à l'insuline, au moins à travers l'expression des gènes (Rajas *et al.* 1999 ; Rajas *et al.* 2000).

5) Autres régulations de la production de glucose par l'insuline

Outre l'action directe de l'insuline sur les enzymes néoglucogéniques, l'insuline régule la PEG par le contrôle de l'apport de ses substrats néoglucogéniques. En effet, il a été démontré notamment que l'insuline, par son action antilipolytique, réduit l'apport d'acides gras libres et de glycérol au foie (Coppack *et al.* 1994) et qu'elle limite l'apport par les muscles de substrats néoglucogéniques tel que l'alanine (Freyse *et al.* 1987).

Enfin, l'insuline est aussi connue pour inhiber la sécrétion de glucagon (Unger *et al.*, 1985 ; Stevenson *et al.* 1987 ; Mittelman *et al.* 1997), ce qui constitue un autre effet indirect de la suppression de la PEG.

Par ailleurs, des travaux ont mis à jour une inhibition de la production hépatique de glucose par l'insuline via le système nerveux central. En effet, une injection icv d'insuline induit une diminution de la production hépatique de glucose (Obici *et al.*, 2002c). Le groupe de Rossetti a démontré que cette action hypothalamique de l'insuline sur l'expression des gènes néoglucogéniques hépatiques (Glc6Pase et PEPCCK) impliquait des canaux potassium ATP-dépendant au niveau central (Pocai *et al.*, 2005). De plus, l'effet central de l'insuline dépend des branches efférentes du nerf vague (Choudhury et al. 2005) et des neurones qui co-expriment l'AgRP et le NPY. En effet, chez la souris, l'inactivation du récepteur à l'insuline spécifiquement dans les neurones à AgRP/NPY annule la suppression de la PHG induite par l'insuline lors d'un clamp hyperinsulinémique euglycémique (Könner et al. 2007).

b. Stimulation de l'utilisation périphérique de glucose

L'insuline stimule l'utilisation de glucose grâce à l'activation de la glycolyse et à l'augmentation du captage de glucose dans le muscle et le tissu adipeux. L'activation de la glycolyse dans le foie porte sur une activation allostérique de la phosphofructokinase-1 (Pilkis *et al.*, 1981) par le fructose-2,6-bisphosphate (F2,6BP), comme décrit précédemment. La production de F2,6BP est induite par l'insuline via l'inhibition de la phosphorylation AMPc-

dépendante de la 6-phosphofructokinase-2/fructose-2,6-bisphosphatase (6P2K/F2,6BPase). Par ailleurs, l'expression de la glucokinase est induite directement par l'insuline via SREB1c (Iynedjian et al. 1988 ; Iynedjian et al. 2000 ; Kim *et al.*, 2004) et indirectement par le F2,6BP. En effet, des approches adénovirales impliquant des formes mutées de la 6P2K/F2,6BPase, chez la souris, démontrent une induction de l'expression du gène de la glucokinase par le F2,6BP (Wu et al., 2004).

Dans les cellules musculaires et adipeuses, la liaison de l'insuline à son récepteur, et la stimulation de la voie PI3K, stimule le captage du glucose en provoquant la mobilisation rapide et réversible du transporteur de glucose GLUT-4 à la membrane plasmique (Zorzano *et al.*, 1996). L'activation de la glycolyse par l'insuline prend également place dans ces tissus (Culbert *et al.*, 2002 ; Diabetes *et al.*, 2004 ; Vasta *et al.*, 1989). L'insuline induit également la glycogène synthase par déphosphorylation de l'enzyme (Cohen P. 1993). Le mécanisme n'a pas été clairement mis en évidence mais semble impliqué la voie de la PI3K et PKB (Lawrence et al. 1997 ; Wojtaszewski et al. 1999).

2. Autres régulations hormonales

Plusieurs autres hormones libérées en situations de stress, de pathologie, ou de jeûne, ont une action importante sur le métabolisme glucidique.

a) Le glucagon

Le glucagon est synthétisé par les cellules du pancréas. Il est libéré lorsque la glycémie est basse et a pour rôle principal de stimuler la production hépatique de glucose. L'administration de glucagon élève le taux de glucose chez l'animal à jeun et nourri (Cherrington 1999). Une revue de Jiang et Zhang rappelle le rôle majeur de cette hormone dite « contre-régulatrice » dans l'induction de la PHG, et décrit les différents mécanismes d'action impliqués (Jiang and Zhang 2003). Le glucagon se fixe à un récepteur transmembranaire couplé aux protéines G (Jelinek *et al.* 1993) identifié dans de nombreux tissus tels que le foie, le cerveau, le rein, l'intestin et le tissu adipeux (Burcelin *et al.* 1996), mais son rôle n'est aujourd'hui bien caractérisé que dans le foie. Comme l'insuline, le glucagon agit à la fois sur la transcription et sur l'activité des enzymes impliqués dans la

production hépatique de glucose. Par l'intermédiaire des voies de signalisation impliquant l'AMPc et le Ca²⁺, l'action du glucagon se traduit par une activation de la glycogène phosphorylase et une inhibition de la glycogène synthase, via phosphorylation de ces enzymes par la protéine kinase A (PKA). De plus, des études ont montré que le glucagon inhibe la phosphofructokinase 1 et active la fructose-1,6-biphosphatase, via le F2,6PB dont la production est induite par l'AMPc (cf paragraphe sur l'action de l'insuline) (Pilkis *et al.* 1988).

Par ailleurs, une étude réalisée *in vivo* et *in vitro* a montré l'existence d'un mécanisme d'activation à court terme de la Glc6Pase par le glucagon (Ichai *et al.* 2001). Le glucagon stimule ainsi l'hydrolyse du G6P et augmente la production hépatique de glucose. Cette activation prendrait place au niveau de la Glc6Pase et serait sensible à la température (Guillam et al. 1998).

Les mécanismes de régulation transcriptionnelle du glucagon font intervenir la PKA. La PKA est capable de phosphoryler certains facteurs de transcription, tels que CREB (cAMP responsive element binding protein), qui participent à la régulation d'expression de gènes impliqués dans la production de glucose. En effet, CREB interagit avec d'autres facteurs de transcription tels que HNF4 (hepatic nuclear factor 4) et C/EBP (CAAT/ enhancer binding protein) pour induire la transcription du gène de la *Glc6Pase* dans le foie (Gautier-Stein *et al.* 2005) et l'intestin (Gautier-Stein *et al.* 2006) et de la PEPCK dans le foie (Croniger *et al.* 1998).

Cependant, le glucagon ne stimule pas la néoglucogénèse dans le rein de rat perfusé isolé (Bowman 1970). Il a également été démontré qu'une perfusion de glucagon à un taux équivalent à celui mesuré lors d'une hypoglycémie, ne stimule pas la synthèse de glucose dans le rein, que ce soit chez l'Homme ou chez l'animal (Gustavson *et al.* 2004).

b) Les glucocorticoïdes

Un déficit en cortisol se caractérise en partie par une perte de poids et une hypoglycémie chronique alors qu'un excès produit une obésité et une intolérance au glucose (Andrews and Walker 1999). Les effets des GC *in vivo* se caractérisent par l'induction d'une insulino-résistance périphérique et d'une augmentation de la néoglucogénèse hépatique (Dinneen *et al.* 1993). L'injection de GC *in vivo* augmente l'activité de la Glc6Pase de 40% dans le foie de rats témoins et surrenalectomisés (Ashmore *et al.*, 1956 ; Nordlie *et al.*, 1965). L'administration de GC induit également la transcription de la G6PT (Hiraiwa and Chou,

2001). En accord avec ces données, la dexaméthasone, une hormone glucocorticoïde de synthèse, augmente la quantité d'ARNm de la G6PC, l'activité promotrice du gène de la G6PT, et finalement l'activité du complexe Glc6Pase dans les cellules hépatomateuses (Garland *et al.*, 1986 ; Kallwellis-Opara *et al.*, 2003 ; Schmoll *et al.*, 1996). Les GC activent également la transcription de la PEPCK par stabilisation du complexe glucocorticoïde-récepteur de type II en présence de facteurs de transcription accessoires tels que HNF3 , HNF4 ou encore C/EBP (Scott *et al.*, 1998 ; Stafford *et al.*, 2001 ; Mink *et al.* 1997 ; Hanson *et al.*, 1997). La transcription de la Glc6Pase est également induite par les GC, par l'intermédiaire de leur récepteur et de facteurs accessoires (Foxo, HNF-1 et CREB) (Lin *et al.*, 1998 ; Vander Kooi *et al.*, 2005). Ce rôle des GC a été confirmé par une étude montrant, chez des souris invalidées pour le gène codant le récepteur aux GC, l'absence d'induction de l'expression des gènes néoglucogéniques par le jeûne (Opherk *et al.*, 2004). Contrairement aux effets immédiats provoqués par les catécholamines et le glucagon, l'action des GC sur la production hépatique de glucose nécessite plusieurs heures (Corssmit *et al.* 2001).

Par ailleurs, les GC inhibent le captage et l'utilisation du glucose par les tissus périphériques, en partie par une inhibition directe du transport du glucose dans la cellule. Ces données sont confirmées par des études menées à l'aide d'antagonistes du récepteur aux GC, montrant qu'une perfusion de ces antagonistes provoque une diminution de la production hépatique puis une augmentation du captage périphérique de glucose (Zinker *et al.* 2007).

b. L'adrénaline et la noradrénaline

L'adrénaline est sécrétée par les glandes surrénales sous l'action du système nerveux sympathique (SNS), tandis que la noradrénaline est libérée directement par les terminaisons nerveuses sympathiques. Ces deux hormones se lient ensuite aux récepteurs transmembranaires et . Dans une situation d'hypoglycémie induite par l'insuline, l'adrénaline augmente fortement la production endogène de glucose en stimulant l'activité Glc6Pase hépatique (Bady *et al.* 2001). Il a également été montré que l'adrénaline stimule la sécrétion de glucagon et inhibe la sécrétion d'insuline amplifiant ainsi le mécanisme de régulation de la PEG (Nonogaki 2000). La noradrénaline jouerait un rôle beaucoup moins important que l'adrénaline *in vivo* (McGuinness *et al.* 1997). Par ailleurs, l'action de ces hormones contre-régulatrices sur le rein est controversée (Gustavson *et al.* 2004). En effet, d'après McGuinness et coll., l'adrénaline n'est pas nécessaire pour l'augmentation de la

production rénale de glucose (McGuinness *et al.* 1997). Par contre, Cersosimo et coll. ont démontré que la sécrétion de ces hormones en réponse à l'hypoglycémie induite par l'insuline augmenterait la production rénale de glucose (Cersosimo *et al.* 1997 ; Cersosimo *et al.*, 1999). En outre, dans la même situation, le blocage des récepteurs α -adrénergiques inhibe la production rénale de glucose, impliquant l'adrénaline comme effecteur majeur (Cersosimo *et al.* 1998).

c. Les autres hormones

L'injection intracérébroventriculaire et périphérique de leptine conduit à une induction de l'expression du gène de la Glc6Pase dans le foie (Liu *et al.*, 1998). L'ablation du tissu adipeux viscéral (diminution du taux de leptine) chez les souris obèses inverse l'état d'insulino-résistance et normalise la régulation des gènes par l'insuline. En effet, l'expression du gène codant pour la Glc6Pase est plus faible chez les souris opérées par rapport aux souris non opérées (Barzilai *et al.*, 1999).

L'adiponectine inhibe l'expression du gène de la Glc6Pase via l'activation de l'AMPK (Andreelli *et al.*, 2006 ; Yamauchi *et al.*, 2002 ; Lochhead *et al.* 2000).

3. Rôle des systèmes nerveux sympathique et parasympathique

De nombreuses études ont mis en évidence les liens existants entre le système nerveux central (SNC) et le métabolisme des hydrates de carbone (Nonogaki and Iguchi 1997). L'hypothalamus est considéré comme la région cruciale du SNC pour la régulation de l'homéostasie glucidique, en particulier les fibres adrénergiques (SNS) invervant le VMH et les fibres cholinergiques (système nerveux parasympathique (SNP)) afférente au LH (Perseghin *et al.* 1997 ; Corssmit *et al.* 2001). Or les organes tels que le foie, le pancréas, les muscles et le tissu adipeux sont sous l'influence directe du SNS et du SNP (Nonogaki 2000). Les différentes populations de neurones hypothalamiques sont activées par des neuromédiateurs spécifiques (acétylcholine, histamine, sérotonine, dopamine, etc.) libérés en fonction de l'état physiologique de l'organisme (stress, jeûne, choc hémorragique).

Le SNS joue un rôle important dans la contre-régulation en réponse à l'hypoglycémie (Hoffman 2007), notamment via l'activation de la voie de la glycogénolyse (Brodows *et al.*, 1975). Par ailleurs, l'activation du SNS, notamment par un exercice intense, stimule la

glycogénolyse musculaire (Villar-Palasi and Larner 1976), favorisant ainsi la formation de G6P musculaire, métabolisé en lactate (Richter *et al.*, 1982). Ce substrat néoglucogénique est alors libéré pour être utilisé par le foie. De plus, il a été montré que la stimulation du VMH chez le lapin induit une diminution des stocks de glycogène hépatique due à l'induction rapide de l'activité de la Glc6Pase et de la glycogène phosphorylase (Shimazu 1996).

A l'opposé, l'activation du SNP a pour conséquence de réduire la production endogène de glucose. Notamment, le SNP diminue la concentration de glucose plasmatique en activant l'activité de la glycogène synthase (Shimazu 1983). Xue et coll. montrent d'ailleurs que la dénervation spécifique des fibres cholinergiques hépatiques abolit d'une part le stockage du glycogène induit par l'alimentation et d'autre part l'induction de la PHG induite par le glucagon (Xue *et al.*, 2000).

Par ailleurs, la sécrétion d'insuline est induite en réponse à l'activation du SNS et inhibée en réponse à l'activation du SNP (Ahren et al. 1986).

4. Régulation par les nutriments

a. Les acides gras

Les acides gras (AG) induisent la glycogénolyse *in vitro* et *in vivo*. En effet, l'oxydation des acides gras dans le foie conduit à la production d'Acetyl-CoA, qui active allostériquement la pyruvate carboxylase (donc la néoglucogénèse) (Jitrapakdee S *et al.*, 2008), et de NADH, nécessaire à la formation de glycéraldéhyde-3P à partir de 1,3-biphosphoglycérate dans la voie de la néoglucogénèse. De plus l'oxydation des AG diminue l'activité de la phosphofructokinase-1 et augmente celle de la fructose-1,6-biphosphatase ce qui amplifie l'activation de la néoglucogénèse (Lam *et al.* 2003).

Chez l'Homme, le rôle des AG dans la régulation de la production hépatique de glucose est controversé (Chen *et al.* 1999). En effet, l'élévation des acides gras libres circulants, provoquée par une perfusion intraveineuse de lipides ou d'héparine, chez le sujet sain semble induire la néoglucogénèse (Clore *et al.* 1991). De plus, l'inhibition de la lypolyse induirait une diminution de la néoglucogénèse (Puhakainen *et al.* 1999). Pourtant, Fery *et al.* montre que l'administration d'une drogue antilipolytique chez des sujets à jeun pendant 4 jours inhiberait la néoglucogénèse (Fery *et al.*, 1996).

Par ailleurs, les acides gras induisent des effets opposés selon leur degré de saturation et la longueur de leurs chaînes. Il a été montré qu'une perfusion intraveineuse d'acide oléique, chez le rat, induit la néoglucogenèse hépatique (Williamson *et al.*, 1969 ; Morand *et al.*, 1993). D'autres travaux ont montré également qu'une perfusion d'acides gras à longue chaîne, en conditions hormonales contrôlées chez le rat ou en culture cellulaire, induit l'expression du gène de la Glc6Pase hépatique par stabilisation de l'ARNm (Massillon *et al.*, 1997 ; Chatelain *et al.* 1998).

Chez l'Homme, comme chez le rat, une concentration plasmatique élevée d'acides gras libres circulants est corrélée à l'apparition d'une insulino-résistance et d'un diabète de type 2 (Paolisso *et al.*, 1995 ; Lam *et al.*, 2003 ; Delarue and Magnan 2007). D'ailleurs, un régime riche en graisses induit des perturbations de la sécrétion d'insuline (Ahren *et al.*, 1999). Cependant, la présence d'acides gras insaturés permet d'atténuer l'insulinorésistance de la production hépatique de glucose observée à la suite de l'ingestion de régime riche en graisses (Storlien *et al.*, 1987 ; Storlien *et al.*, 1991), suggérant un effet opposé entre acides gras saturés et insaturés. En effet, la présence d'acide gras insaturés dans un régime riche en graisses prévient l'induction de l'activité Glc6Pase hépatique (Garg *et al.*, 1985 ; Venkatraman *et al.* 1991). Les acides gras polyinsaturés bloquent la transcription du gène de la Glc6Pase en inhibant la liaison du facteur de transcription HNF4 sur le promoteur du gène codant l'enzyme (Rajas *et al.* 2002).

Par ailleurs, plusieurs études mettent en évidence un effet des acides gras sur le métabolisme glucidique via le système nerveux central. En effet, l'injection icv d'acide oléique induit chez le rat une inhibition de la production de glucose (Obici *et al.*, 2002b). A l'opposé, pour Clément et coll., la perfusion d'une émulsion de lipides dans la carotide induirait une insulino-résistance de la production hépatique de glucose (Clement *et al.*, 2002). Le mécanisme impliquerait une diminution du tonus sympathique due à la bêta-oxydation des acides gras dans l'hypothalamus (Cruciani-Guglielmacci *et al.*, 2004 ; Cruciani-Guglielmacci *et al.*, 2005 ; Migrenne *et al.*, 2007). De plus, il a été montré qu'une injection icv d'une émulsion de triglycérides chez le rat provoque une augmentation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, par le biais de la diminution du tonus sympathique (Magnan et al. 1999).

b. Le glucose

Indépendamment des hormones gluco-régulatrices, le glucose inhibe lui-même la production de glucose *in vitro* et *in vivo* (Davidson 1981 ; Shulman *et al.* 1978). En effet, l'hyperglycémie, indépendamment de l'insuline, provoque une suppression de la production hépatique de glucose par une inhibition partielle de l'activité Glc6Pase (Guignot and Mithieux 1999). A l'état post-absorptif, les mécanismes d'autorégulation supprimant la PHG impliquent une inhibition de la glycogène phosphorylase (glycogénolyse) (Petersen *et al.* 1998) et une augmentation du flux de glucose à travers la glucokinase (glycolyse) (Rossetti *et al.* 1993). Cependant, lorsque l'hyperglycémie survient dans des conditions où les réserves hépatiques de glycogène sont épuisées, le phénomène de suppression de la production hépatique de glucose pourrait s'exercer sur la néoglucogénèse mais les mécanismes sont encore méconnus (Moore *et al.* 2003).

Outre son action sur la prise alimentaire, une élévation de la glycémie en veine porte conduit à une diminution de la production hépatique de glucose chez le chien (Pagliassotti *et al.* 1991, Pagliassotti *et al.* 1996, Moore *et al.* 1997), ainsi qu'à une stimulation du captage périphérique de glucose, chez la souris (Burcelin *et al.*, 2000). Une étude à l'aide de souris invalidées pour le gène de GLUT2 indique que ce transporteur serait impliqué dans la détection du glucose portal, point de départ du « signal glucose portal » (Burcelin *et al.*, 2000). La co-perfusion de glucose et d'un antagoniste du récepteur au GLP-1 (exendine 9-39) en veine porte semble par ailleurs abolir les effets induits par la perfusion de glucose seul sur le métabolisme glucidique, suggérant que la détection du glucose portal nécessiterait l'activation du récepteur au GLP-1 (Burcelin *et al.* 2001). Il a par ailleurs été montré que l'action du glucose portal sur la stimulation du captage de glucose par les muscles est indépendant d'une action directe de l'insuline sur ce tissu (Burcelin *et al.* 2003).

c. Les protéines et les acides aminés

Chez l'Homme, un régime riche en protéines stimulerait la production endogène de glucose d'environ 12% (Linn *et al.* 2000). Cette variation pourrait être la somme de plusieurs mécanismes, notamment dû à l'afflux d'acides aminés glucoformateurs.

En effet, la perfusion d'acides aminés chez l'Homme provoque une hausse de la production hépatique de glucose via la néoglucogénèse (Krebs *et al.* 2003). L'afflux de

substrats énergétiques (glutamine, alanine) constituerait un effet direct des acides aminés, tandis qu'une induction des gènes des enzymes clefs de la néoglucogenèse traduirait un effet indirect. Ce dernier serait dû à la stimulation de la sécrétion de glucagon par les acides aminés (Ohneda *et al.* 1968). En effet, une étude menée chez des sujets en clamp euglycémique hyperinsulinémique à faible dose d'insuline (42pmol/L) indique que la glucagonémie des sujets nourris par un régime riche en protéines est significativement plus importante que celle de sujets nourris par un régime standard (Linn *et al.*, 2000).

Par ailleurs, il a été montré que l'acidose métabolique, provoquée par cet afflux d'acides aminés au rein, induit le gène de la PEPCK rénale (Hwang *et al.* 1991), sans induire celui de la Glc6Pase (Burch *et al.* 1978).

De nombreux travaux montrent qu'un régime riche en protéines stimule la sécrétion d'insuline et de glucagon dans les heures qui suivent le repas (Floyd *et al.* 1966a ; Nuttall *et al.*, 1984). Une supplémentation du repas en caséine, principale protéine du lait, provoque une hausse de l'insulinémie d'environ 30 à 40% en situation post-absorptive, par rapport à des régimes témoins (Westphal *et al.*, 2004). Certains auteurs avaient attribué cette induction de la sécrétion d'insuline à un effet spécifique des acides aminés (Floyd et al, 1965 ; Floyd *et al.*, 1966b). L'effet des protéines alimentaires sur la sécrétion d'insuline serait dû à une augmentation de la sensibilité au glucose des cellules beta du pancréas (Linn *et al.*, 2000).

Des travaux menés chez des patients diabétiques indiquent que leur insulinémie, intégrée sur 24 heures, ainsi que leur taux circulant d'acides gras et de peptide-C, n'augmentent pas significativement en réponse au régime enrichi à 30% de protéines par rapport au régime contrôle, contenant 15% de protéines (Gannon *et al.*, 2003). Par ailleurs, la glucagonémie, intégrée sur 24 heures, des patients nourris par le régime enrichi en protéines est 4 fois plus importante que celle des patients nourris par le régime contrôle (Gannon *et al.*, 2003). Les travaux de M.C. Gannon et F.Q. Nuttall menés chez des patients diabétiques, indiquent une amélioration des paramètres glycémiques suite à l'ingestion de régimes riches en protéines. En effet, un régime enrichi à 30% de protéines (contre 15% chez les patients témoins), induit une diminution de 40% de l'aire sous la courbe de réponse du glucose, mesurée sur 24h, et une diminution de 0.8% du taux d'hémoglobine glyquée au bout de 5 semaines de régimes (Gannon *et al.*, 2003). Les mécanismes impliqués dans ces effets bénéfiques des protéines alimentaires restent cependant très mal compris.

CONTEXTE, OBJECTIFS ET DEMARCHE EXPERIMENTALE

Des données de la littérature, rapportées dans l'introduction bibliographique de ce travail, démontrent très clairement qu'une alimentation riche en protéines entraîne une importante diminution de la prise alimentaire, chez l'Homme et l'animal, par rapport à une alimentation classique (riche en hydrates de carbone). S'il est bien montré que l'effet anorexigène des protéines n'est pas relié à une aversion conditionnée par le goût, les régions du système nerveux central, les population neuronales et les mécanismes inducteurs impliqués ne sont pas encore totalement compris.

Des travaux de notre groupe, en collaboration avec l'équipe du Pr C. Magnan, et auxquels j'ai participé durant mon stage de master (*En annexe* : Mithieux *et al.*, 2005), montrent qu'une production intestinale de glucose (PIG) prend place chez les rats nourris par un régime riche en protéines, par l'intermédiaire de l'induction des principales enzymes néoglucogéniques. En effet, alors que la PIG est indétectable chez le rat nourri par un régime standard (riche en hydrates de carbone), à l'état post-absorptif et après 24h de jeûne, des études de flux de glucose, réalisées à l'état post-absorptif chez les rats nourris par le régime enrichi en protéines, ont permis de mettre en évidence, dès le premier jour de régime, la libération d'une quantité significative de glucose par l'intestin à l'état post-absorptif. Au deuxième jour de régime, cette PIG est estimée à environ 12,5 $\mu\text{mol/kg/min}$, soit 20% de la production endogène totale, et se maintient ainsi jusqu'à 15 jours de régime, avec des valeurs individuelles (par rat) atteignant 25 $\mu\text{mol/kg/min}$.

Notre groupe a également montré que la libération de glucose par l'intestin dans la veine porte joue un rôle majeur dans l'effet hypophagique des protéines (*En annexe* : Mithieux *et al.*, 2005). Cependant, les effets des protéines sur l'ensemble du métabolisme glucidique n'ont pas encore été totalement élucidés.

Le premier objectif de ce travail de thèse a été d'approfondir la compréhension des mécanismes d'action des protéines alimentaires sur le métabolisme glucidique en étudiant l'effet du régime enrichi en protéines sur les autres organes glucoformateurs, i.e. le rein et le foie. Pour cela, nous avons analysé l'expression des principales enzymes néoglucogéniques au niveau rénal et au niveau hépatique chez des rats nourris par un régime enrichi en protéines. En parallèle, nous avons utilisé une méthode combinant la dilution de traceurs à la détermination de la balance glycémique artério-veineuse pour estimer l'impact du régime sur la production rénale de glucose. Ces données nous ont permis d'estimer la participation respective des différents organes glucoformateurs à la production endogène de glucose chez les rats nourris par le régime protéique, à l'état post-absorptif.

Par ailleurs, des études montrent que le glucose, délivré par la veine porte, est capable d'améliorer, dans certaines conditions, le captage du glucose par les tissus périphériques chez la souris (Burcelin *et al.*, 2000) et d'inhiber la production hépatique de glucose (PHG) chez le chien (Pagliassotti *et al.*, 1991 ; Pagliassotti *et al.*, 1996, Moore *et al.*, 1997). Ces résultats suggèrent que la PIG, induite par une alimentation riche en protéines, pourrait avoir des effets bénéfiques dans l'homéostasie glucidique. En accord avec cette hypothèse, les études de Gannon et coll. ont mis en évidence une amélioration de la tolérance au glucose chez des patients diabétiques de type 2 consommant un régime enrichi en protéines (Gannon *et al.*, 2003). Dans ce contexte, le second objectif de ce travail a été d'étudier l'effet des protéines alimentaires sur la sensibilité à l'insuline par la mise en place d'un clamp hyperinsulinémique euglycémique chez le rat nourri par un régime riche en protéines.

Nous avons également complété ces travaux par des expériences permettant de déterminer l'implication du « signal glucose portal » dans l'induction de la PRG par le régime protéique. Pour cela nous avons étudié l'effet d'une perfusion portale de glucose (chez les rats nourris par un régime standard) et d'une dénervation portale (chez les rats nourris par le régime riche en protéines) sur la glucose-6 phosphatase rénale. Ces travaux font l'objet de la troisième partie de ce travail de thèse.

Dans une quatrième partie, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'influence de la nature des protéines sur les régulations enzymatiques du métabolisme glucidique dans les trois tissus glucoformateurs. Pour cela, nous avons utilisé des régimes enrichis spécifiquement en protéines d'origines différentes : caséine, soja ou viande.

Les travaux de notre équipe indiquent que la perfusion portale de glucose, de même que la consommation pendant quelques jours d'un régime riche en protéines, provoquent chez le rat une importante activation des neurones des principaux centres hypothalamiques impliqués dans le comportement alimentaire (*En annexe*: Mithieux *et al.*, 2005). De plus, l'activation des aires hypothalamiques et l'inhibition de la prise alimentaire par le régime protéique d'une part et par les perfusions portales de glucose d'autre part, sont abolies après dénervation des afférences vagues au niveau de la veine porte. Ces données suggèrent que la libération de glucose en veine porte, en réponse à un régime riche en protéines, induirait un signal nerveux qui transiterait via le système vagal et qui serait intégré dans les aires hypothalamiques responsables du comportement alimentaire, induisant *in fine* une diminution

de la prise alimentaire. Ces résultats montrent ainsi le rôle majeur de ce « signal glucose portal » dans l'effet hypophagique des protéines mais n'ont cependant pas permis de déterminer précisément la nature des neurones et des neuromédiateurs impliqués.

Par ailleurs, l'administration d'un régime protéique ou les perfusions de glucose semblent activer plusieurs régions hypothalamiques où est présent le système mélanocortinergique, largement impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire. Nous avons donc proposé de déterminer l'implication ou non de certaines composantes de ce système dans l'effet anorexigène des protéines. Cela constitue la cinquième partie de ce travail de thèse. Pour répondre à cette question, nous disposons d'un modèle de souris invalidées pour MC4-R et d'un modèle de souris invalidées pour le gène de la POMC, à l'origine de la sécrétion d' α -MSH. Cette étude consiste à déterminer si l'absence d'une de ces composantes du système mélanocortinergique provoque, ou non, la disparition de l'effet hypophagique des protéines.

MATERIELS ET METHODES

I. Animaux et régimes

1. Expériences chez le rat

Les expériences sont menées sur des rats mâles de souche Sprague-Dawley d'environ 250g (IFFA CREDO, L'Arbresle, France). A leur arrivée, les rats sont acclimatés pendant 3 jours avant l'expérimentation. Au cours de cette période, les rats reçoivent une alimentation standard composée de 50% de glucides, 23,5% de protéines, 4% de lipides, 12% d'eau, 5,5% de sels minéraux, 4% de cellulose et 1% de vitamines (en poids) et de l'eau *ad libitum*.

a. Régime hyperprotéique Soja/Caséine

Après la période d'acclimatation des rats, deux groupes sont formés pour chaque expérimentation (n=6) : un groupe témoin, nourri avec le régime standard, et un groupe nourri avec un régime enrichi en protéines (23,5% glucides, 50% protéines (protéines de soja et protéines de caséine (1 :1))). Après 3 jours de régime, les rats des 2 groupes sont mis à jeun pendant 5 heures avant l'expérimentation (état post-absorptif (PA)).

b. Jeûne

Trois groupes de rats (n=6), nourris par le régime standard, ont été mis à jeun pendant 24, 48 et 72 heures (pour permettre des mesures de production endogène de glucose).

c. Régimes spécifiques Soja, Caséine et Viande

Après la période d'acclimatation, 4 groupes de rats (n=6) sont nourris pendant 3 jours par un régime standard (23,5% de protéines) ou un des trois régimes suivants : enrichi spécifiquement en caséine, en protéines de soja ou en protéines de viande (tous contenant 50% de protéines). A la fin du régime, les tissus sont prélevés pour permettre l'analyse de l'expression des gènes de la néoglucogénèse rénale, intestinale ou hépatique.

d. Clamp hyperinsulinémique euglycémique

Après la période d'acclimatation des rats, deux groupes sont formés pour chaque expérimentation : un groupe témoin, toujours nourri avec le régime standard, et un groupe nourri avec un régime enrichi en protéines. Après 5 jours de régime, les rats sont mis à jeun pendant 4h avant le début de l'opération de l'animal (afin d'obtenir un état post-absorptif, de 6h de jeûne, au démarrage du clamp).

2. Expériences chez la souris

Les souris sont âgées de 4 semaines et proviennent de Charles River (L'Arbresle, France) pour les souris C57/bl6 et de notre propre élevage (souris « sauvages provenant des reproductions des souris hétérozygotes pour le gène de la POMC) pour les souris SV129. Après 5 jours d'alimentation standard, les souris sont nourries par un régime riche en protéines (50% de protéines contre 23,5% dans le régime standard). Le contenu protéique du régime est un mélange de caséine et de protéines de soja (50/50), semblable à celui utilisé précédemment chez le rat. La mesure de la prise alimentaire et du poids des animaux est effectuée quotidiennement.

Les souris déficientes en POMC sont dépourvues de GC circulants et sont donc particulièrement sensibles au stress. Par ailleurs, les GC agissent comme un facteur facilitant la prise alimentaire. Nous avons donc fait le choix d'ajouter de la corticostérone (25 mg/L) à l'eau de boisson des souris déficientes en POMC. Afin de pouvoir comparer nos différents groupes de souris, nous avons également ajouté la même quantité de corticostérone à l'eau de boisson des souris SV129 témoins (non modifiées). L'apport exogène de GC chez ces souris inhibe leur production endogène, normalisant ainsi le taux de GC circulants, qui sera dosé par la suite dans le sang, dans les différents groupes de souris.

II. Mesure de l'expression de gènes de la néoglucogenèse.

1. Prélèvement des tissus

Les rats sont anesthésiés au pentobarbital, et les souris sont anesthésiées par un mélange xylazine/kétamine afin de procéder à une laparotomie. Les tissus sont prélevés en freeze-clamp à la température de l'azote liquide (-196°C) pour être stockés à -80°C.

2. Quantification des ARNm

Les ARN totaux ont été extraits suivant le protocole décrit par Sambrook et al. (Sambrook et al., 1989). La synthèse de l'ADN complémentaire (cDNA) est effectuée sur 500ng d'ARNm à l'aide de la M-MLV reverse transcriptase RNase H minus (Promega, France) et des oligonucléotides poly(dT) pendant 1h à 40°C. La PCR quantitative en temps réel est réalisée par un appareil light-cycler (Roche Diagnostics, Germany). Une courbe standard est générée automatiquement avec différentes quantités d'un fragment de cDNA cible. Le transcript de la protéine ribosomale rL19 est utilisé comme référence et les résultats sont exprimés par un ratio relatif à l'expression de rL19. La PCR est effectuée sur une dilution au 1/100^{ème} du produit de transcription dans le milieu « Master SYBR Green 1 Mixture » (Roche diagnostics, Germany) avec des primers spécifiques (0.25µM final pour chaque primer). Les séquences des primers utilisées sont les suivantes : 5'-TTACGAAGACTCCCAGGACTG-3' (sens) et 5'-TGACTATTACAGCAACAGCTC-3' (antisens) pour la Glc6Pase de rat, 5'-AGTGCCTGTGGGAAAACCAA-3' (sens) et 5'-CACCATCTTCACCAACGTGGCT-3' (antisens) pour la PEPCK de rat, 5'-AGATTGACCGTCATATGTATCACA-3' (sens) et 5'-TCTAAGACCAAGGAAGCACGAA-3' (antisens) pour le rL19 de rat, 5'-GCACATTTCCCTCACCAAGT-3' (sens), 5'-TCTTTCCCTGGTCCATCAACC-3' (antisens) pour la G6PC3 de rat, 5'-TCTCTATGTCCACATGTTCCCTG-3' (sens) et 5'-GGGGCCAGCAGACAACAAAG-3' (antisens) pour le MC4-R de souris, 5'-CTCAAGAAGACAACACTGCAGAC-3' (sens) et 5'-TGAAGAAGCGGCAGTAGCAC-3' (antisens) pour l'AgRP de souris, 5'-ATGCCGAGATTCTGCTACAGTCG-3' (sens) et 5'-TTCATCTCCGTTGCCAGGAAACAC-3' (antisens) pour la POMC de souris et 5'-TTCCAGTATGACTCCACTCACG-3' (sens) et 5'-AGACTCCACGACATACTCAGCA-3' pour la GAPDH de souris.

3. Analyse en western-blot

L'analyse des protéines par western-blot a été réalisée à partir d'homogénats intestinaux. La préparation des échantillons nécessite qu'un volume d'homogénat correspondant à une quantité de protéines de 40µg soit mixé à un tampon de dénaturation, composé de : glycérol 10% ; 2-β-mercaptoéthanol 5% ; Tris-HCl 31.2mM à pH=6.8 ; sodium dodécyl sulfate (SDS) 4% ; bleu de bromophénol , puis incubé 5 minutes à 100°C.

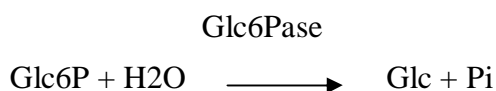
Les échantillons sont déposés sur un gel à 9% d'acrylamide. Après la migration à 200V, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF Immobilon (Millipore) pendant 1 heure à 90V dans un tampon composé de Tris 25mM ; glycine 192mM .

La membrane est ensuite récupérée puis saturée dans un tampon PBS-Tween 0,2%, lait écrémé 2%. La membrane est ensuite incubée en présence d'un antiserum de lapin anti-PEPCK au 1/7000^{ème} (donné par P. Iynedjian) ou anti-Glc6Pase dilué au 1/2000^{ème} (Inserm U449) ou anti-Glutaminase au 1/1000^{ème} (donné par N.P Curthoys) puis en présence d'une solution d'anticorps de chèvre anti-Ig G de lapin au 1/10000^{ème} couplé à la peroxydase. La détection est effectuée par chimioluminescence.

4. Dosages enzymatiques

a. Activité de la glucose-6 phosphatase

La détermination de l'activité Glc6Pase est réalisée selon la méthode décrite par Baginsky et collaborateurs (Baginski et al., 1974). Cette méthode mesure par dosage colorimétrique la quantité de phosphate inorganique (Pi) produite après l'hydrolyse du Glc6P par l'enzyme au cours la réaction :

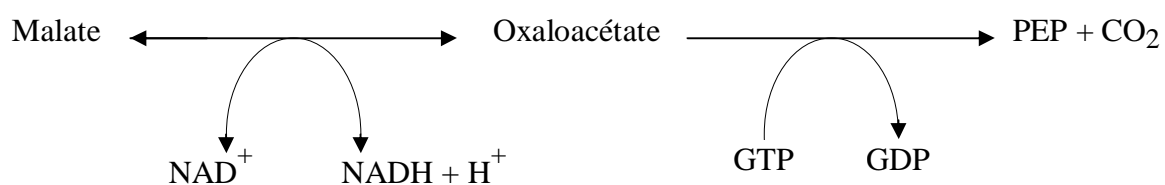


L'activité Glc6Pase est dosée à 30°C dans un milieu contenant du Tris-HCl (20mM, pH=7,3), de l'eau et de l'homogénat. La réaction est initiée par l'ajout de Glc6P (20mM). Après 10 minutes d'incubation, la réaction est stoppée par l'ajout d'une solution d'acide trichloroacétique/acide ascorbique (10%/2%, P/V) qui précipite les protéines. Le mélange est

ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 2000g et à 4°C. Le phosphate inorganique est dosé sur le surnageant par complexation avec le molybdate d'ammonium (1%, P/V). Le complexe phosphomolybdique formé est réduit par l'acide ascorbique en un complexe phosphomolybdeux-molybdique de couleur bleu en 30 minutes. L'excès de molybdate est neutralisé par l'ajout d'une solution d'arsenite citrate (2%/2%, P/V) qui stabilise le système. La mesure de la densité optique est effectuée à 700nm contre un blanc réalisé dans les mêmes conditions mais sans activité enzymatique (la solution d'acide trichloroacétique/acide ascorbique est rajouté avant l'homogénat inhibant toutes les réactions enzymatiques). Les activités phosphatases non spécifiques sont effectuées dans les mêmes conditions par l'hydrolyse du β -glycérophosphate. Les activités Glc6Pase spécifiques sont déterminées en retranchant les activités non spécifiques. L'activité Glc6Pase dans les homogénats est exprimée en μ moles de phosphate produites par minutes et par grammes de tissu.

b. Activité de la PEPCK

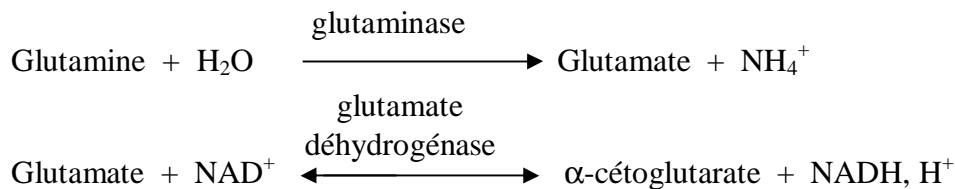
La détermination de l'activité PEPCK est réalisée selon la méthode décrite par Jomain-Baum et Schramm (Jomain-Baum and Schramm, 1978). Cette méthode permet de mesurer la formation de phosphoénolpyruvate (PEP) par le déplacement de l'équilibre de la réaction catalysée par la malate déshydrogénase. La vitesse d'apparition du PEP est égale à celle du NADH.



L'activité PEPCK est dosée à partir des cytosols obtenus par centrifugation 1h à 90000g et à 4°C des homogénats. La réaction s'effectue dans un milieu constitué d'un tampon de décarboxylation (Tris 50mM, MnCl₂ 0,75Mm, NAD⁺ 1Mm (pH=8)), 6U de malate déshydrogénase, 1Mm de GTP auquel on ajoute un volume de cytosol. Ce milieu réactionnel est thermostaté à 37°C. La réaction est lancée par l'apport de 10Mm de malate. La cinétique de formation du NADH est suivie au spectrophotomètre à 340nm pendant 10 minutes. Pour chaque échantillon, un blanc est réalisé dans les mêmes conditions sans malate. L'activité PEPCK est exprimée en μ mol/min/g de tissu.

c. Activité de la glutaminase

La détermination de l'activité des 2 formes de glutaminase, la forme Pi dépendante et la forme malate stimulée (γ -glutamyltranspeptidase), est réalisée en suivant la procédure décrite par Passoneau et Lowry (Passonneau and Lowry, 1993). L'activité des 2 formes est effectuée dans 2 milieux réactionnels différents mais selon le même principe :



-L'activité de la forme Pi dépendante est déterminée dans un milieu réactionnel contenant : Tris-HCl 40 mM à pH=8,6 ; glutamine 20 mM ; tampon phosphate potassium 150 mM ; EDTA 0,2 mM ; BSA 0,2% et H₂O.

-L'activité de la forme malate stimulée est déterminée dans un milieu réactionnel contenant : tampon maleate 60 mM à pH=6,6 ; glutamine 10 mM ; EDTA 0,2 mM ; BSA 0,2% et H₂O.

Dans les 2 cas, la réaction est initiée par l'ajout d'une fraction d'homogénat dans le milieu préalablement thermostaté à 38°C. Après une incubation d'1 heure, la réaction est stoppée par l'ajout d'une solution de HCl à 2 mM.

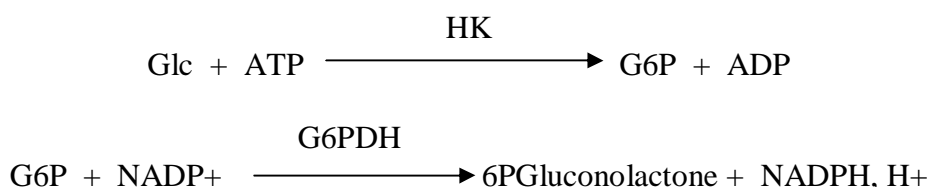
La seconde réaction est lancée par l'ajout d'un réactif contenant : 6U glutamate déhydrogénase ; Tris-HCl 90 mM à pH=8,4 ; NAD⁺ 1 mM ; ADP 0,3 mM ; H₂O₂ 0,03% et H₂O. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, les échantillons sont centrifugés à 2000g pendant 20 minutes. Après avoir récupéré les surnageants, la quantité de NADH formé est évaluée par spectrophotométrie à 340nm. Pour chaque échantillon, un blanc est réalisé dans les mêmes conditions sans glutamine. L'activité des 2 formes de glutaminase est exprimée en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de tissu.

III. Mesure de la production rénale de glucose chez le rat

1. Opération des animaux

Les rats sont anesthésiés au pentobarbital pour permettre la pose de cathéters en polyéthylène dans la veine jugulaire droite, pour la perfusion du 3[³H]-glucose, et dans l'artère carotidienne pour la collecte des échantillons sanguins. La température corporelle est maintenue à 37,5°C à l'aide d'une couverture chauffante reliée à une sonde thermique rectale. Les rats sont perfusés 90 minutes. Des études préliminaires montrent en effet que l'état d'équilibre du traceur est atteint au bout de 40 à 50 minutes dans nos conditions d'expérimentation (Croset et al., 2001). Une perfusion de charge de [3-³H] glucose (1,87µCi/min) est effectuée lors de la première minute, puis le traceur est perfusé à 0,187µCi/min jusqu'à la fin de la perfusion. A la fin des 90 minutes de perfusion, du sang est prélevé simultanément en carotide et en veine rénale. La fixation d'un cathéter à demeure dans la veine rénale étant délicate, le prélèvement est effectué à l'aide d'un cathélon placé juste au moment du prélèvement. Le plasma sanguin est ensuite séparé après une centrifugation de 10 minutes à 1500g à 4°C, puis déprotéinisé (par ajout de ZnSO₄ (0,3M) (1V) et de Ba(OH)₂ (0,3M) (1V) puis centrifugation à 10 000g) pour déterminer la concentration de glucose et l'activité spécifique (AS) des échantillons.

- La concentration plasmatique de glucose se détermine en mesurant l'absorbance à 340nm du NADPH, H formé, dans les réactions suivantes (Bergmeyer, Bernt et al. 1974) :



Ces réactions sont réalisées dans un milieu contenant : Triéthanolamine (TEA) (0,3M), MgSO₄ (3mM), NADP (0,5mM), ATP (5,6 mM), G6PDH (1mg/mL). Après lecture de la ligne de base, l'hexokinase est ajoutée (HK à 1mg/mL) puis mesure après 30 minutes de

réaction, en point final. Les valeurs sont validées par la mesure en parallèle d'un standard de glucose. La glycémie est exprimée en mmol/L.

- Le signal radioactif dû au glucose tritié présent dans le sang déprotéinisé est mesuré sur compteur bêta après évaporation au préalable de l'eau tritié par évaporation. La valeur obtenue est exprimée en cpm/mL de plasma.

2. Calcul de la production endogène de glucose

La production endogène de glucose a été obtenue à partir du calcul suivant :

$$Rd = F/AS$$

Avec : $\left\{ \begin{array}{l} Rd = \text{débit de disparition du glucose } (\mu\text{mol}/\text{min}) \\ F = \text{débit de perfusion de } [3\text{-}^3\text{H}] \text{ glucose } (\text{cpm}/\text{min}) \\ AS = \text{activité spécifique } (\text{cpm}/\mu\text{mol}) \end{array} \right.$

A l'état stationnaire, on obtient :

$$Rd = Ra = PEG + Re$$

Avec : $\left\{ \begin{array}{l} Ra = \text{débit d'apparition du glucose } (\mu\text{mol}/\text{min}) \\ PEG = \text{production endogène de glucose } (\mu\text{mol}/\text{min}) \\ Re = \text{débit exogène de glucose } (\mu\text{mol}/\text{min}) \end{array} \right.$

Les résultats de PEG sont exprimés en $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{min}$.

3. Calcul de la production rénale de glucose

Le rein est un organe qui consomme et produit du glucose en même temps. De ce fait, la mesure de la différence artério-veineuse de glucose ne reflète que le bilan net (balance nette), c'est-à-dire le résultat de la consommation et de la production. L'utilisation de traceur irréversible va nous permettre d'estimer l'utilisation de glucose par le rein. Le $3[^3\text{H}]$ -glucose est un traceur car 1) il est perfusé en quantité négligeable par rapport au glucose froid ; 2) il est strictement utilisé de la même façon que ce dernier et 3) il est irréversible c'est-à-dire que chaque molécule utilisée perd définitivement son marquage sous forme d'eau tritiée.

∅ Dans un premier temps, à l'aide des activités spécifiques, nous pouvons déterminer l'extraction fractionnelle de glucose, c'est à dire la fraction de glucose captée par le rein :

$$\mathbf{FX} = \frac{(AS_{\text{artère}} \times [Glc]_{\text{artère}}) - (AS_{\text{veine}} \times [Glc]_{\text{veine}})}{AS_{\text{artère}} \times [Glc]_{\text{artère}}}$$

Avec {

- FX = Extraction fractionnelle
- AS = Activité spécifique
- [Glc] = Concentration en glucose (μmol/ml)

∅ L'extraction fractionnelle permet d'estimer l'utilisation du glucose par le rein :

$$\mathbf{URG} = \text{FSR} \times [Glc]_{\text{artère}} \times \text{FX}$$

Avec {

- URG : Utilisation rénale de glucose (μmol/min)
- FSR : Flux sanguin rénal (ml/min)

Les flux sanguins ont été déterminés lors d'études antérieures par une technique utilisant des microsphères marquées au ¹⁴¹Cs (Croset et al., 2001).

∅ La balance nette de glucose est calculée par la formule :

$$\mathbf{BRG} = \text{FSR} \times ([Glc]_{\text{artère}} - [Glc]_{\text{veine}})$$

Avec BRG : Balance rénale de glucose (μmol/min)

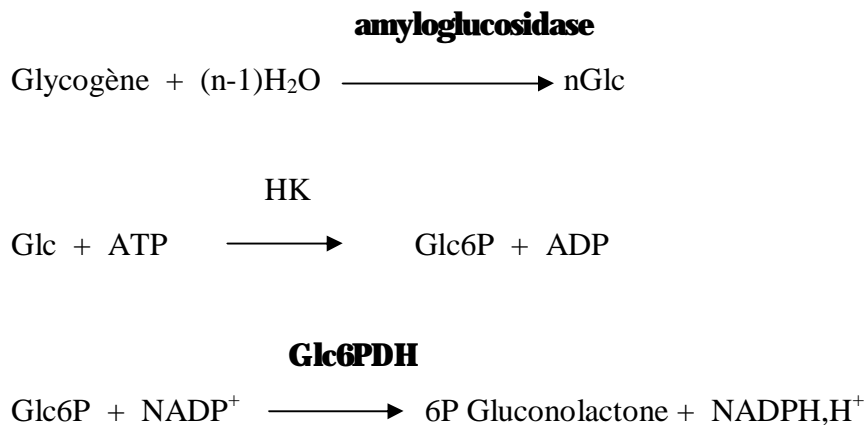
∅ L'obtention de l'utilisation du glucose par le rein ainsi que la balance nette de glucose permettent de déduire la production rénale de glucose :

$$\mathbf{PRG} = \text{URG} - \text{BRG}$$

Avec PRG : Production rénale de glucose

IV. Dosage du glycogène hépatique

La quantification du glycogène tissulaire s'effectue indirectement par mesure du glucose libéré après digestion enzymatique du glycogène (Keppler and Decker, 1974).



Le tissu broyé est repris dans une solution d'acide perchlorique 6% (V/V) afin de déprotéiniser l'homogénat. Après 15 minutes de centrifugation à 500g, le surnageant est neutralisé avec une solution de K_2CO_3 3,2M puis centrifugé à nouveau. Le surnageant est ensuite porté à ébullition 20 minutes en présence de 0,1M de NaOH. La digestion enzymatique du glycogène est réalisée pendant 1h à 45°C après ajout d'une solution composée de tampon acétate 0,2M, pH 4,8 et d' -amyloglucosidase (1mg/mL). Le glucose est alors dosé par une méthode enzymatique, décrite précédemment. Les résultats sont exprimés en mg de glycogène / g de protéines.

V. Clamp hyperinsulinémique euglycémique

1. Opération des animaux

Les rats sont anesthésiés au pentobarbital pour permettre la pose de cathéters en polyéthylène dans la veine jugulaire droite, pour la perfusion du $3[^3\text{H}]$ -glucose, de l'insuline et du glucose, et dans l'artère carotidienne pour la collecte des échantillons sanguins. La température corporelle est maintenue à 37,5°C à l'aide d'une couverture chauffante reliée à une sonde thermique rectale.

2. Déroulement du clamp – calculs – dosage de l’insuline

L’Etat d’équilibre du traceur est atteint après 40 à 50 minutes de perfusion (Croset et al., 2001). Une perfusion de charge de [3-³H] glucose (250 μ Ci/h) est effectuée lors de la première minute, puis le traceur est perfusé à 25 μ Ci/h jusqu’à la fin de la perfusion. Sur le même animal, nous avons testé deux doses d’insuline. La première, de 240pmol/h, permet d’inhiber partiellement la production endogène de glucose et la seconde, de 2880pmol/h, permet d’inhiber totalement la production endogène de glucose et de stimuler l’utilisation de glucose. La glycémie des rats vérifiée toutes les 10 minutes par prélèvement d’une goutte de sang au bout de la queue et lecture immédiate au glucomètre. Le débit de perfusion de glucose est alors adapté en permanence pour maintenir une glycémie basale (estimée par plusieurs mesures effectuées avant le début du clamp). Les débits moyens de glucose nécessaires pour maintenir la glycémie stable pendant des clamps à une faible et à forte dose d’insuline ont été estimés, dans des travaux précédents du laboratoire, à 11 μ mol/min et 50 μ mol/min. Ces estimations nous ont permis ici d’établir un débit correct de glucose dès le début du clamp, et d’obtenir ainsi plus rapidement un équilibre de la glycémie tout au long du clamp.

Les calculs de PEG sont les mêmes que ceux précédemment présentés (paragraphe « mesure de la production rénale de glucose »)

L’insulinémie a par ailleurs été mesurée dans les échantillons sanguins à l’aide d’un kit commercial (Spibio).

VI. Dénervation portale chez les rats nourris par le régime hyper-protéique

Afin d’effectuer une dénervation locale de la branche hépato-portale du nerf vague, nous avons utilisé une solution de capsaïcine (Sigma). La capsaïcine est un neurotoxique capable de provoquer une désensibilisation des afférences nerveuses. 80 μ l de solution de capsaïcine à 10mg/ml ont été appliqués à l’aide de fragments de compresses recouvrant les nerfs hépato-portaux pendant 15 minutes.

VII. Perfusion de glucose en veine porte chez les rats nourris par le régime standard

Les rats sont anesthésiés au pentobarbital pour permettre la pose d'un cathéter en polyéthylène dans la veine porte, fixé à l'aide de colle physiologique. Un espace est créé entre la peau et le tissu conjonctif, de l'abdomen jusqu'au dos de l'animal, pour permettre le passage du cathéter. Celui-ci est alors maintenu au dessus de la tête de l'animal par une « pièce de tête ». Après suture des incisions chirurgicales, le rat, une fois réveillé, est replacé dans sa cage pendant 5 jours de récupération postopératoire, avec accès à la nourriture standard et à l'eau *ad libitum*. Chaque jour une perfusion de 100µL d'une solution dense de PVP (polyvinylpyrrolidon 7% dans NaCl 9‰, P/V) est effectuée pour empêcher de boucher le cathéter par du sang coagulé.

Après cette période, les rats sont perfusés en continu pendant 5h avec une solution de glucose 20%, à un débit contrôlé de 25µmol/kg/min. Les animaux sont privés de nourriture pendant la perfusion mais gardent un accès à l'eau *ad libitum*. En parallèle, un groupe de rats témoins est perfusé avec une solution saline (NaCl 9‰). Les rats sont euthanasiés à la fin de la perfusion pour permettre le prélèvement des tissus.

RESULTATS

Partie 1 : Action du régime enrichi en protéines sur le métabolisme glucidique

Les précédentes études montrent qu'un régime riche en protéines induit, chez le rat, les gènes des principales enzymes néoglucogéniques intestinales, provoquant ainsi la libération de glucose par l'intestin. Nous avons voulu déterminer l'impact de ce régime protéique sur les deux autres tissus impliqués dans la PEG : le rein et le foie.

I. Le régime protéique induit l'expression des principales enzymes clés de la néoglucogenèse rénale

La glutamine est le principal substrat de la néoglucogenèse rénale, nous avons donc mesuré l'expression des trois enzymes clés de cette néoglucogenèse : la glutaminase, la Glc6Pase et la PEPCK (**Figure IV**).

Après 5 jours de régime enrichi en protéines, la Glc6Pase rénale est induite de près de deux fois dans le rein, en comparaison des rats nourris par le régime standard. Cette variation est présente au niveau de l'ARNm, de la protéine et de l'activité enzymatique mesurée à la Vmax (**Figure 1a A, B, C**), indiquant qu'il s'agit d'une régulation pré-translationnelle. L'induction de l'expression du gène de la PEPCK est davantage marquée puisque la quantité d'ARNm de l'enzyme est augmentée de 6 fois dans le rein des rats nourris par le régime riche en protéines, comparé aux rats témoins (**Figure 1a D**). Des inductions similaires au niveau de la protéine et de l'activité enzymatique ont également été observées (**Figure 1a E et F**). Il s'agit donc là aussi d'une régulation pré-translationnelle de l'enzyme. Nous avons parallèlement observé une induction d'environ 50% de l'activité de la glutaminase Pi-dépendante chez les rats nourris par le régime riche en protéine (**Figure 1b**). Par ailleurs, nous avons analysé l'expression de la G6PC3. Cette protéine, appelée aussi UGRP, présente 36% d'homologies de séquences avec la Glc6Pase (Martin et al., 2002). Elle est exprimée ubiquitairement mais son expression maximale a notamment été observée dans le rein (Martin et al. 2002., Guionie et al., 2003 ; Shieh et al. 2003). Son activité phosphatase n'a pu être mise en évidence que dans les expériences de forte surexpression, par transfection stable (Guionie et al., 2003) ou transduction par adénovirus (Shieh et al. 2003) et sa spécificité vis-à-vis du Glc6P n'a par ailleurs pas été établie. Dans nos conditions d'expérimentation, aucune variation de la quantité d'ARNm de cette enzyme n'a été observée chez les rats nourris par le régime riche en protéines (2.9 ± 0.6 vs. 2.7 ± 0.5 AU (normalisé avec la quantité d'ARNm de RL19), valeurs \pm SEM., n=5), en accord avec d'autres travaux (Azzout-Marniche et al., 2007).

II. La production rénale de glucose est induite par le régime protéique

1. Validation de la méthode : effets du jeûne sur la production rénale de glucose

La question que nous nous sommes posée était de connaître l'impact de l'expression des enzymes clefs de la néoglucogenèse rénale sur les flux de glucose à travers l'organe. Pour répondre à cette question, nous avons mis en place une méthode combinant dilution de traceur et balance glycémique artériovoineuse, précédemment utilisées pour quantifier la production intestinale de glucose (Croset et al., 2001 ; Mithieux et al. 2005).

Concernant la significativité des données, le test de Shapiro-Wilk a permis d'estimer si la distribution des valeurs des différents groupes de rats suivait la loi « normale » ou non. Nous avons choisi, en fonction des résultats de ce test, de calculer la significativité soit par le test t de student non apparié (pour les valeurs de PEG et PRG), soit par le test de Wilcoxon (pour les valeurs d'AS (apparié), de glycémie (apparié). Concernant l'extraction fractionnelle, la significativité a été calculée par une méthode de comparaison globale (test de Kruskal-Wallis) $p < 0,05$ puis par des comparaisons multiples (test de Nemenyi).

Chez les rats nourris par un régime standard, l'activité spécifique (en post-absorptif) du 3[3H]-glucose est plus faible dans la veine rénale que dans l'artère (environ -3,5%), indiquant que du glucose froid a été synthétisé et libéré par le rein (**Tableau 1**). Cependant, la glycémie artérielle n'est pas différente de la glycémie veineuse, suggérant que l'utilisation et la production de glucose par le rein sont comparables (**Tableau 1**). Ainsi, la production rénale de glucose chez le rat post-absorptif est d'environ 12,5 $\mu\text{mol/kg/min}$ (**Tableau 1**). Le rein contribue ainsi à 17% de la production endogène totale de glucose en condition post-absorptive, en accord avec d'autres résultats de la littérature chez le chien (Adroque et al., 1992) et chez l'Homme (Moller et al., 2001).

Dans un premier temps, nous avons choisi d'éprouver la méthode en effectuant des mesures chez des rats à jeun. En effet, la littérature contient plusieurs données estimées de la production de glucose par le rein, mais obtenues chez le rat à l'aide d'autres méthodes critiquées (ligature des vaisseaux : Mithieux et al., 2006 ; retrait du foie : Kida et al., 1978), ainsi que chez l'Homme (Ekberg et al., 1999).

En accord avec des données précédemment obtenues au laboratoire (Croset et al., 2001 ; Guignot et al., 1999), la production totale de glucose est diminuée dans tous les groupes d'animaux à jeun par rapport à la production endogène de glucose mesurée chez les rats témoins post-absorptifs. Par ailleurs, chez les rats à jeun 24h, la diminution de l'activité spécifique dans la veine rénale est plus importante ($p < 0,05$) que chez les rats post-absorptifs 6h (-9,5%) (**Tableau 1**). Comme chez les rats PA, il n'y a pas de différences entre la glycémie artérielle et la glycémie veineuse. Cependant, l'extraction fractionnelle est plus élevée ($p < 0,05$) que chez les rats témoins (**Tableau 1**). Ainsi, la production rénale de glucose est significativement plus élevée ($p < 0,05$) chez les rats à jeun 24h que chez les rats nourris témoins, i.e. $22,3 \pm 2,1 \mu\text{mol/kg}$, et participe ainsi à environ 50% de la production endogène totale de glucose. Des résultats similaires ont été obtenus avec des jeûnes plus longs, i.e. de 48 et 72 heures (**Tableau 1**). En accord avec cette rapide augmentation de la production rénale de glucose chez le rat à jeun, nous avons observé une forte induction (d'environ 6 fois) de la quantité de PEPCCK rénale dès 24h de jeûne (**Figure 2**).

2. Effets du régime protéique sur la production rénale de glucose

Chez les rats nourris par le régime riche en protéines, on observe une diminution (environ -6,5%) de l'activité spécifique entre l'artère et la veine rénale ($p < 0,05$) (**Tableau 1**). La glycémie veineuse est plus élevée (+6%, $p < 0,05$) que la glycémie artérielle (**Tableau 1**). L'extraction fractionnelle est proche de zéro et n'est pas différente de celle du régime standard. La production rénale de glucose est égale à $28,2 \pm 4,5 \mu\text{mol/kg/min}$, soit deux fois plus que chez les rats témoins, et représenterait ainsi environ 45% de la production totale de glucose.

III. Effet du régime protéique sur l'expression des principales enzymes clefs de la néoglucogenèse hépatique

Les situations d'insulinopénie induisent les gènes de la néoglucogenèse dans les trois tissus glucoformateurs, i.e. l'intestin, le rein et le foie. Dans le cas des régime enrichis en protéines, nous avons montré une induction des néoglucogenèses rénale et intestinale, sans qu'il y ait pourtant d'augmentation de la production totale, suggérant que le foie freine sa

production de glucose. Nous avons donc voulu déterminer l'impact du régime sur les gènes de la néoglucogenèse hépatique.

Les activités enzymatiques de la Glc6Pase et de la PEPCK hépatiques ne varient pas entre les rats nourris par le régime standard et les rats nourris par le régime riche en protéines (**Figure 3 B et D**). La quantité de protéines de ces deux enzymes ne varie pas non plus d'une condition à l'autre (**Figure 3 A et C**), suggérant que le régime ne provoque pas d'induction pré-traductionnelle des gènes hépatiques, comme c'est le cas dans l'intestin ou le rein.

Outre sa capacité à synthétiser du glucose à partir des substrats non glucidiques par la voie de la néoglucogenèse, le foie produit du glucose à partir du glycogène, par la voie de la glycogénolyse. La néoglucogenèse ne semble pas être affectée par le régime riche en protéines, suggérant donc fortement que la participation moindre du foie dans le cas d'un régime protéique serait due à des régulations au niveau des stocks de glycogène. Cette hypothèse est en accord avec des études réalisées chez le chien et qui montrent qu'une perfusion de glucose en veine porte provoque l'accumulation de glycogène hépatique (Pagliassotti et al. 1996). Ainsi, le glucose libéré par l'intestin dans la veine porte des rats nourris par le régime protéique favoriserait la synthèse de glycogène dans le foie.

DISCUSSION : Le régime protéique induit une redistribution de la production endogène de glucose.

Malgré l'induction de la production rénale de glucose par le régime riche en protéines, la production endogène totale de glucose n'est pas significativement différente de celle mesurée chez les rats nourris en régime standard. Ces résultats sont en accord avec de précédentes données obtenues au cours de la détermination de la production intestinale de glucose (Mithieux et al., 2005). L'ensemble de nos résultats suggère que le régime enrichi en protéine provoque une redistribution de la production endogène de glucose au profit du rein et de l'intestin, qui participent ainsi respectivement à environ 45 et 19% à la production endogène de glucose, aux dépens du foie (dont la contribution passerait de 3/4 de la production endogène de glucose en régime standard à moins de la moitié de la PEG dans le cas d'un régime riche en protéines) (**Figure 4**).

Partie 2 : Action du régime enrichi en protéines
sur la sensibilité à l'insuline

Des études montrent que le glucose libéré par l'intestin, comme dans le cas d'un régime riche en protéines (Mithieux et al. 2005), est capable d'améliorer, dans certaines conditions, le captage du glucose par les tissus périphériques chez la souris (Burcelin et al., 2000). De plus, des données de Gannon et coll. indiquent qu'un régime riche en protéines chez l'Homme améliore la tolérance au glucose des patients diabétiques de type 2 (Gannon et al., 2003), mais les mécanismes impliqués ne sont pas connus.

I Les protéines alimentaires améliorent la sensibilité à l'insuline de la production endogène de glucose chez le rat

Nous avons voulu vérifier l'hypothèse d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline par les protéines alimentaires chez le rat. Pour cela, nous avons effectué un clamp hyperinsulinémique euglycémique chez des rats nourris par un régime riche en protéines. Deux doses d'insuline ont été testées. La première dose, faible (240 pmol/h), inhibe partiellement la PEG et permet ainsi de tester la sensibilité à l'insuline de la PEG. La seconde dose, forte (2880 pmol/h), inhibe totalement la PEG et stimule l'utilisation de glucose, permettant ainsi de tester la sensibilité à l'insuline de l'utilisation de glucose. Le débit de perfusion de glucose est adapté pour maintenir la glycémie basale.

Il n'y a pas de différence au niveau de la PEG basale chez les deux groupes de rats (nourri par le régime standard et nourri par le régime riche en protéines). La production endogène de glucose est inhibée d'environ 25-30% par une perfusion d'insuline (à faible dose) chez les rats nourris par le régime standard (**Figure 5 A**). Cette inhibition est nettement plus forte (environ 50%) chez les rats nourris par le régime riche en protéines en comparaison des rats nourris par le régime standard ($p < 0,05$) (**Figure 5 A**), indiquant clairement une meilleure réponse à l'insuline de la PEG.

A forte dose d'insuline, la production endogène de glucose est inhibée de manière équivalente (plus de 90%) chez les deux groupes de rats. Il n'y a pas de différences inter-groupe au niveau de l'utilisation du glucose à cette dose d'insuline (**Figure 5 B**), indiquant que le régime riche en protéines n'affecte pas les mécanismes de captage de glucose par les tissus périphériques.

II Etats des stocks de glycogène hépatique après un clamp hyperinsulinémique euglycémique chez le rat nourri par un régime protéique

La glycogénolyse est plus sensible à l'insuline que la néoglucogénèse. Nous avons fait l'hypothèse que l'amélioration de la sensibilité à l'insuline prenait place dans le foie (siège de la glycogénolyse). Les stocks de glycogène hépatique ont donc été mesurés à la fin du clamp à petite dose d'insuline, par une méthode enzymatique sur homogénat tissulaire. Le contenu en glycogène du foie est significativement plus important chez les rats nourris par le régime riche en protéines que chez les rats témoins (18 ± 3.5 vs. 4.7 ± 3.2 mg/g de foie, $p < 0.05$) (**Figure 6**), suggérant un mécanisme d'« épargne » du glycogène hépatique induit par l'insuline chez les rats nourris par les protéines. Ces données suggèrent fortement que la meilleure sensibilité à l'insuline de la PEG induite par les protéines alimentaires met en jeu une suppression accrue de la glycogénolyse hépatique.

**Partie 3 : Implication du signal glucose portal dans
l'induction de la néoglucogenèse rénale par le régime
riche en protéines**

Les précédents résultats du laboratoire ont montré le rôle clef du glucose libéré par l'intestin dans l'inhibition de la prise alimentaire par le régime protéique (Mithieux *et al.*, 2005). La question à laquelle nous nous sommes proposé de répondre ici est donc de savoir si l'action du régime protéique sur la néoglucogenèse rénale implique également le « signal glucose portal » résultant de la PIG. Nous avons utilisé la mesure de l'activité Glc6Pase comme reflet de la PRG.

I. Effet d'une dénervation portale sur l'activité Glc6Pase rénale chez le rat nourri par le régime riche en protéines

L'induction de l'activité de la Glc6Pase rénale chez les rats nourris par le régime riche en protéines n'est pas abolie par la dénervation portale, dans nos conditions d'expérimentation (**Figure 7**). Ces résultats suggèrent que le régime protéique induit la PRG par des mécanismes indépendants du « signal glucose portal ».

II. Effet d'une perfusion portale de glucose sur l'activité Glc6Pase rénale chez le rat nourri par un régime standard

Pour confirmer notre hypothèse, nous avons donc testé une deuxième approche qui consiste à mimer, chez des rats nourris par le régime standard, un afflux de glucose portal équivalent à la PIG de rats nourris par le régime riche en protéines, à l'aide d'une perfusion de glucose chez des rats nourris par le régime standard. En effet, dans de précédents travaux, notre groupe a montré que des perfusions portales à 12,5 et 25 $\mu\text{mol/kg/min}$ induisaient une hypophagie similaire à celle provoquée par un régime enrichi en protéines. Nous avons donc perfusé en veine porte, chez des rats nourris par le régime standard, du glucose à un débit de 25 $\mu\text{mol/kg/min}$ et avons mesuré la réponse au niveau de la néoglucogenèse rénale.

Nos résultats indiquent qu'une telle perfusion n'induit pas l'activité de la Glc6Pase rénale, responsable de la libération de glucose par l'organe, par rapport à des rats témoins perfusés par une solution saline (**Figure 8**). Ces données vont donc dans le même sens que les résultats obtenus par dénervation portale. Nous pouvons en déduire que l'apparition de glucose, produit par l'intestin dans la veine porte, n'est pas responsable des effets observés dans le rein des rats nourris par le régime protéique. Ces données suggèrent l'implication d'autres mécanismes indépendants du « signal glucose portal » et qui restent à déterminer.

Partie 4 : Rôle de la nature des protéines dans les
effets du régime protéique sur le métabolisme
glucidique

Le régime protéique que nous avons utilisé lors de nos précédentes études est composé à moitié de protéines de soja et à moitié de caséine. Nous avons émis l'hypothèse que la puissance du signal anorexigène, de même que son action sur le métabolisme glucidique, pourraient dépendre de la nature des protéines composant le régime. Nous avons donc étudié l'influence de régimes enrichis spécifiquement en protéines de natures différentes sur le métabolisme glucidique

I. Impact de la nature des protéines sur les gènes néoglucogéniques rénaux

L'activité de la Glc6Pase est induite d'un facteur 2,3 , 2 et 2,8 chez les rats nourris par les régimes « viande », « soja » et « caséine » respectivement, comparés aux rats nourris par le régime standard (**Figure 9 A**). L'activité de la glutaminase est augmentée de 40% par le régime « soja » et de 90% par le régime « caséine » (**Figure 9 B**). Enfin, l'activité de la PEPCCK rénale est induite d'un facteur 6 , 6,5 et 9 par les régimes « viande », « soja » et « caséine » respectivement (**Figure 10 A**). La quantité de l'enzyme est induite de manière similaire, avec des inductions de 4, 6 et 9 fois, respectivement (**Figure 10 B**).

La nature des protéines affecte donc différemment l'activité des enzymes de la néoglucogénèse rénale. Ces résultats montrent que le régime caséine serait globalement plus efficace pour induire la PRG.

II. Impact de la nature des protéines sur les gènes néoglucogéniques intestinaux

La significativité des données a été calculée par une méthode de comparaison globale (test de Kruskal-Wallis) $p < 0,05$ puis par des comparaisons multiples (test de Nemenyi).

L'activité de la Glc6Pase est significativement induite dans le jejunum par le régime « caséine » uniquement (**Figure 11A**) $p < 0,01$. L'induction de la Gl6-Pase intestinale observée chez les rats nourris par un régime protéique (50% soja, 50% caséine) serait donc due à une action spécifique de la caséine contenue dans le régime.

L'activité de la glutaminase, dans le jejunum, est induite de façon modérée par les régimes « caséine » et « viande » ($p < 0,05$), tandis qu'elle n'est pas modifiée significativement par le régime « soja » (**Figure 11B**). La caséine semble être la protéine efficace pour stimuler

l'entrée de substrat dans la voie de la néoglucogenèse intestinale observée dans le cas du régime « caséine/soja » (Mithieux *et al.*, 2005).

III. Impact de la nature des protéines sur les gènes néoglucogéniques hépatiques

Nous avons précédemment montré qu'un régime riche en protéines (moitié caséine, moitié soja) n'induit aucun changement dans l'expression des gènes de la néoglucogenèse hépatique. En accord avec ces données, les régimes « caséine (seule) », « soja (seul) », de même que le régime « viande », n'induisent pas l'activité de la Glc6Pase (**Figure 12**). Ces données suggèrent en outre que l'absence d'induction de l'activité Glc6Pase par le régime protéique (caséine-soja) n'est pas la résultante d'un effet opposé de la caséine vis-à-vis des protéines de soja sur les enzymes néoglucogéniques hépatiques.

L'ensemble de nos résultats montre que la caséine semble plus efficace que les protéines de viande ou de soja pour induire les néoglucogenèses rénale et intestinale. Ces résultats suggèrent que la nature des protéines composant un régime pourrait moduler la puissance du pouvoir anorexigène de ce régime. Ces données posent également la question du rôle de certains acides aminés spécifiques, ou certains peptides spécifiques, produits en quantités variables selon la nature de la protéine ingérée, dans l'action du régime protéique sur la néoglucogenèse et la prise alimentaire. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour déterminer les molécules puis les mécanismes impliqués.

**Partie 5 : Implication du système
mélanocortinergique dans l'effet anorexigène des
protéines**

Ces travaux s'inscrivent dans le cadre d'un projet qui a été financé par la Société Française de Nutrition (SFN) pour ma troisième année de doctorat. Les résultats sont en cours d'obtention.

Le principal objectif de cette partie de mon projet de recherche était de déterminer dans le modèle murin l'implication du système mélanocortinergique dans l'effet anorexigène induit par les protéines et de savoir si l'intégrité de différents composants du système est nécessaire. Pour répondre à cette question, nous nous sommes proposés d'étudier l'effet d'un régime enrichi en protéines sur la prise alimentaire et sur certains paramètres clefs du métabolisme glucidique de souris transgéniques chez lesquelles certains gènes impliqués dans le système mélanocortinergique ont été invalidés. Nous nous sommes procurés deux modèles de souris transgéniques : d'invalidation ubiquitaire du gène codant le récepteur aux mélanocortines de type 4 (MC4-R) obtenue dans la lignée C57/Bl6, et d'invalidation ubiquitaire du gène codant la pro-opiomélanocortine (POMC), précurseur du ligand naturel des récepteurs aux mélanocortines (l' -MSH), obtenue dans la lignée SV129.

Dans la mesure où nos travaux précédents ont été réalisés chez le rat, il était nécessaire dans un premier temps de vérifier dans les deux lignées de souris (C57/Bl6 et SV129) si le régime protéique utilisé était capable d'induire une inhibition de la prise alimentaire similaire, puis dans un second temps, de déterminer l'amplitude et la chronologie de cette inhibition. En parallèle, nous avons étudié les variations d'expression des gènes de la néoglucogénèse dans le foie, le rein et l'intestin, en réponse au régime protéique. L'ensemble sera développé dans le premier chapitre.

I. Variation de la prise alimentaire et du métabolisme glucidique chez les souris C57/bl6 et SV129 normales en réponse au régime protéique

Pour la lignée SV129, seule la mesure de la prise alimentaire a pu être effectuée.

1. Effets du régime protéique sur la prise alimentaire des souris

Chez les souris C57/bl6 normales, nous avons observé une chute importante (plus de 50%) de la prise alimentaire dès le premier jour de régime protéique (**Figure 13**) qui peut s'expliquer par le changement de nourriture, ce qui nécessite une période d'accoutumance. En

effet, de manière compensatoire à cette chute, on constate une remontée de la prise alimentaire d'abord irrégulière sur une période d'environ 8 à 10 jours. Par la suite, on observe une stabilisation à partir de 12 jours après le début du régime à un niveau correspondant en moyenne à 80% de leur prise alimentaire mesurée en régime standard. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus précédemment chez le rat (Mithieux *et al.*, 2005).

Des résultats similaires ont été obtenus chez les souris SV129 témoins nourries par le régime riche en protéines, avec cependant une moindre diminution de la prise alimentaire au changement de régime, et une absence de remontée compensatoire après quelques jours (**Figure 14**).

2. Effets du régime protéique sur le poids des souris

En régime standard, le poids des souris C57/Bl6 augmente d'environ 1g en une semaine (**Figure 15**). Ces données sont cohérentes avec le fait que ces souris, à 4 semaines de vie, sont en pleine croissance. Le poids des souris diminue assez fortement dès le premier jour de régime protéique, avec une perte de poids de l'ordre de 5 à 10% au bout de 3-4 jours (par rapport au jour qui précède le régime protéique). Le poids des souris augmente ensuite progressivement pendant une semaine, puis semble se stabiliser à une valeur proche du poids basal (c'est-à-dire le poids des souris au jour précédant le début du régime protéique).

Des résultats similaires ont été obtenus chez les souris SV129 témoins nourries par le régime riche en protéines (**Figure 16**).

3. Effets du régime protéique sur l'activité de la Glc6Pase intestinale des souris C57/bl6

Les dosages ont été réalisés après 4 jours et 12 jours de régime protéique. Dans les deux groupes de souris, l'activité de la Glc6Pase est significativement plus élevée (environ 50%) par rapport aux témoins nourris en régime standard, indiquant une induction de la néoglucogenèse intestinale par les protéines (**Figure 17**).

4. Effets du régime protéique sur l'activité de la Glc6Pase rénale des souris C57/bl6

Contrairement aux résultats obtenus chez le rat, nous n'avons pas observé, chez la souris, d'induction de la Glc6Pase rénale par le régime riche en protéines, quelque soit la durée du régime (4 et 12 jours) (**Figure 18**).

5. Effets du régime protéique sur l'activité de la Glc6Pase hépatique et sur les stocks de glycogène hépatique des souris C57/bl6

Contrairement aux résultats obtenus chez le rat, l'activité de la Gl6-Pase hépatique est induite chez les souris nourries par le régime protéique (**Figure 19A**). Cette augmentation, de 45% environ, est significative après 4 jours de régime protéique, et reste identique après 12 jours de régime. De plus, les stocks de glycogène hépatique des souris nourries par le régime protéique sont diminués ($10,9 \pm 1,2$ mg/g de tissus par rapport à $22,9 \pm 1,6$ chez les souris nourries par le régime standard) (**Figure 19B**). Ces résultats observés au niveau du rein et du foie diffèrent de nos résultats précédents, montrant une « épargne » du glycogène hépatique chez les rats nourris par le régime riche en protéines.

DISCUSSION : validation du modèle pour l'étude du comportement alimentaire

En accord avec nos précédentes données chez le rat (Mithieux *et al.*, 2005), nos résultats indiquent que les protéines alimentaires induisent une hypophagie chez les deux lignées de souris (C57/bl6 et SV129). De plus, nos résultats montrent une induction de la Glc6Pase intestinale chez la souris nourrie par le régime protéique, ce qui suggère une induction de la PIG et confirmerait ainsi l'existence d'un mécanisme d'action des protéines alimentaires sur la satiété similaire à celui démontré chez le rat (Mithieux *et al.*, 2005). Ceci constitue un ensemble d'arguments en faveur de la faisabilité et de l'intérêt de l'étude qui sera

réalisée chez la souris en utilisant les deux modèles d'inactivation (inactivation des gènes de la POMC ou de MC4R).

Par ailleurs, pour confirmer les données moléculaires et s'il existe ou non une redistribution de la PEG, il sera nécessaire d'effectuer des mesures directes de la PRG, de la PIG et de la PEG chez les souris nourries par le régime riche en protéines, par rapport aux souris nourries par le régime standard.

En outre, nous avons précédemment associé l'amélioration de la sensibilité à l'insuline à une épargne du glycogène hépatique chez les rats nourris par le régime riche en protéines. Cependant, chez les souris nourries par le régime protéique, les stocks de glycogène sont plus faibles que chez les souris nourries par le régime standard, ce qui est en accord avec l'observation concomitante de l'augmentation de l'activité basale de la Glc6Pase (**Figure 19**). Il serait intéressant d'étudier ce paramètre « stockage de glycogène » à la fin d'un clamp hyperinsulinémique euglycémique chez la souris nourrie en régime protéique, afin de le corréler à la sensibilité à l'insuline de la PHG. Des données récentes du laboratoire ont été obtenues chez des souris ayant subi une chirurgie de type « bypass ». Elles montrent en effet une amélioration de la sensibilité à l'insuline consécutive à l'induction de la production intestinale de glucose. La détection portale du glucose, ainsi libéré par l'intestin, serait responsable de l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (Troy et al. 2008). Dans notre modèle de souris nourries par le régime protéique, la néoglucogenèse intestinale est également induite, suggérant la mise en place du signal glucose portal, et ainsi une possible amélioration de la sensibilité à l'insuline.

La mise en place de clamps hyperinsulinémiques euglycémiques chez la souris s'avère donc nécessaire dans l'étude de l'action des protéines alimentaires sur la sensibilité à l'insuline.

II. Impact du régime protéique sur l'expression des gènes hypothalamiques du système mélanocortinergique chez les souris C57/Bl6

Dans l'hypothalamus de souris C57/Bl6 nourries pendant 4 jours par un régime protéique, la quantité relative d'ARNm de la POMC est diminuée de plus de 50% ($8,4 \pm 1$ en régime protéique versus $23,6 \pm 2,6$ en régime standard) tandis que la quantité relative

d'ARNm de l'AgRP est augmentée ($25,4 \pm 6$ en régime protéique versus $10 \pm 1,8$ en régime standard) (**Figure 20**). Le rapport POMC/AgRP est ainsi réduit chez les souris nourries par le régime protéique par rapport aux souris témoins, en dépit de l'hypophagie mesurée précédemment. Par ailleurs, la quantité relative d'ARNm de MC4-R reste inchangée (**Figure 20**).

Ces résultats suggèrent que les variations d'expression des gènes du système mélanocortinergique après 4 jours de régime sont consécutives à la diminution rapide de la prise alimentaire des animaux au moment du changement de régime (standard-protéique). Elles correspondraient à un effet « contre-régulateur », pour freiner la phase d'anorexie des animaux. Les données de la littérature montrent, chez le rat, une légère augmentation de l'expression de la POMC, par rapport au régime standard, après 4 semaines de régime protéique, quand la prise alimentaire s'est stabilisée (Kinzig et al. 2007). Ainsi, chez les souris, l'effet contre-régulateur du système mélanocortinergique, spécifique au début de régime, pourrait s'estomper lorsque le régime protéique se prolonge. Cela n'exclut pas qu'à long terme le système mélanocortinergique puisse donc être impliqué dans l'effet de satiété induit par le régime protéique.

Pour déterminer le rôle du système mélanocortinergique dans cet effet anorexigène à long terme, nous avons choisi d'utiliser des modèles d'inactivation de deux gènes du système mélanocortinergique : POMC et MC4R.

III. Variation de la prise alimentaire et du poids chez les souris SV129 invalidées pour le gène codant POMC en réponse au régime protéique

Les souris SV129 témoins nourries en régime standard et traitées aux glucocorticoïdes mangent en moyenne 3,9g contre 3,3g par jour chez les souris SV129 témoins non traitées, suggérant que l'effet orexigène de l'administration de glucocorticoïdes reste limité. Ces données permettent de valider la méthode d'administration des glucocorticoïdes nécessaire chez les souris invalidées pour le gène codant la POMC. La prise alimentaire des souris invalidées pour le gène codant POMC est significativement plus élevée (5,8g par jour) indiquant une hyperphagie due à l'absence de POMC.

Par ailleurs, les souris SV129 traitées aux glucocorticoïdes ont des variations de poids globalement semblables à celles des souris SV129 non traitées (**Figure 22**) avec, cependant,

en régime standard, un poids d'environ 1g plus élevé, en accord avec une prise alimentaire également légèrement plus élevée. Cependant, les souris traitées aux glucocorticoïdes et nourries par le régime protéique semblent avoir plus de difficulté à récupérer un poids proche de leur poids initial. Les glucocorticoïdes sont apportés par l'eau de boisson et ne sont donc plus libérés de manière cyclique chez ces souris traitées. Cet apport exogène de glucocorticoïdes inhibe théoriquement la production endogène et rend négligeables les régulations de cette dernière. Le faible regain de poids chez les souris traitées aux glucocorticoïdes et nourries à long terme par le régime protéique pourrait ainsi s'expliquer par l'absence d'une régulation, induite en temps normal par le régime protéique, au niveau de la libération de glucocorticoïdes endogènes.

La prise alimentaire des souris invalidées pour le gène codant POMC et nourries par le régime protéique est identique à celle des souris SV129 témoins nourries en régime protéique, avec une prise alimentaire plus faible de 20% environ par rapport au régime standard (**Figure 21**). Ces dernières données tendent à suggérer que l' -MSH via la POMC n'est pas directement impliquée dans l'effet anorexigène des protéines alimentaires.

Le poids des souris invalidées pour le gène codant POMC reste stable pendant 2-3 jours après le changement de régime puis augmente à nouveau régulièrement. Cette augmentation est cependant moins importante que pendant le régime standard ($2,0 \pm 0,7$ pour les souris POMC^{-/-} vs. $4,5 \pm 0,4$ pour les souris standards). Le régime protéique freine la prise de poids des souris POMC^{-/-} mais ne suffit cependant pas à arrêter totalement cette augmentation du poids, comme c'est pourtant le cas chez les souris témoins. Cette persistance de la prise de poids peut s'expliquer par l'hyperphagie due à l'absence de POMC.

IV. Variation de la prise alimentaire et du poids chez les souris C57/bl6 invalidées pour le gène codant MC4R en réponse au régime protéique

Les souris invalidées pour le gène codant MC4R et nourries par le régime standard mangent en moyenne 6,5g par jour. Cette valeur est significativement plus élevée que chez les souris C57/Bl6 témoins nourries en régime standard (3,2g), en accord avec les données de la littérature qui rapportent l'effet hyperphagique consécutive à l'invalidation du gène de MC4R.

La prise alimentaire des souris invalidées pour le gène codant MC4R est cependant plus faible (environ 20%) en régime protéique qu'en régime standard. Ce profil d'évolution de la prise alimentaire est donc semblable à celle des souris C57/B16 témoins nourries par le régime protéique (**Figure 23**). Cependant, au changement de régime (standard-protéique) la prise alimentaire chute de 80% (contre 50% en moyenne chez les souris C57/bl6 témoins) et remonte de façon plus progressive, consolidant l'hypothèse que l'intégrité du système mélanocortinergique est nécessaire pour assurer un mécanisme de « contre-régulation » face à la chute de prise alimentaire en début de régime.

En accord avec une prise alimentaire plus élevée chez les souris invalidées pour le gène codant MC4-R, par rapport aux souris témoins, le poids des souris MC4-R^{-/-} augmente plus rapidement, en régime standard, que le poids des souris témoins ($2,2 \pm 0,4$ pour les souris MC4-R^{-/-} vs. $1,0 \pm 0,1$ pour les souris témoins) (**Figure 24**). Par ailleurs, la courbe d'évolution du poids des souris MC4-R^{-/-} est semblable à celle des souris témoins, avec une diminution d'un peu plus de 5% du poids pendant 3-4 jours à partir du changement de régime, suivit d'un regain de poids.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Des perturbations du comportement alimentaire sont associées au développement de l'obésité et des pathologies qui lui sont inhérentes, telles que le diabète de type 2. Ainsi, la prise en charge de ces pathologies associe souvent, aux traitements thérapeutiques, des stratégies nutritionnelles de mieux en mieux adaptées, notamment une augmentation de la fraction protéique du contenu des repas. Bien que les protéines alimentaires induisent effectivement une hypophagie, le mécanisme d'action reste encore à élucider.

1) Les protéines induisent une modification de la répartition de la production endogène de glucose

Chez le rat, la production rénale de glucose (PRG) est fortement induite par le régime riche en protéines. En effet, chez les rats nourris par un régime riche en protéines, les enzymes néoglucogéniques sont induites et la production de glucose du rein augmente pour atteindre, après 3 jours de régime protéique, près de 45% de la PEG, contre 15-20% de la PEG chez les rats nourris en régime standard (*En annexe*: Pillot et al., 2009). Les précédents travaux du laboratoire ont montré que, dans les mêmes conditions, la PIG des rats est fortement induite pour atteindre environ 20% de la PEG, tandis que cette dernière reste inchangée (Mithieux et al. 2005). L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure à une diminution concomitante de la PHG, qui participerait dans ces conditions à moins de 50% de la PEG. Le régime protéique induit donc chez le rat une redistribution de la PEG au profit du rein et de l'intestin. Cette situation est proche de l'état de jeûne très prolongé, pendant lequel les PRG et PIG sont induites tandis que les stocks de glycogène hépatique augmentent à nouveau, à 72h de jeûne (Croset et al. 2001 ; Minassian et al. 1994). L'environnement hormonal est cependant bien différent, puisque les rats à jeun ont un rapport insuline/glucagon très faible, alors que le régime riche en protéines n'induit pas de modifications très significatives des taux circulants de ces hormones (Mithieux et al. 2005), confirmant l'implication de mécanismes différents.

La dénervation des afférences vagues chez le rat abolit l'effet des protéines sur la prise alimentaire mais pas sur l'induction des gènes néoglucogéniques rénaux, suggérant que la régulation de la PRG par les protéines alimentaires serait indépendante du signal glucose portal. Cette hypothèse est confirmée par l'absence d'induction des gènes néoglucogéniques rénaux par une perfusion de glucose en veine porte chez des rats nourris en régime standard. Cette hypothèse explique par ailleurs l'absence d'induction des gènes néoglucogéniques rénaux chez des souris dont la PIG semble pourtant induite par le régime protéique.

Un repas riche en protéines entraîne un afflux important d'acides aminés dans la circulation sanguine et se traduit par une acidose qui pourrait en partie expliquer l'induction des gènes rénaux observée chez les rats nourris par le régime protéique. En effet, des études préliminaires du laboratoire montrent qu'une acidose induite par l'ajout de NH₄⁺ dans l'eau de boisson des rats provoque une augmentation de l'activité PEPCCK rénale. Cependant, ces travaux indiquent que l'acidose n'affecte pas la Glc6Pase rénale (données non publiées). Ces résultats confirment d'anciennes données de la littérature qui suggéraient que l'acidose induit le gène de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCCK) rénale (Hwang *et al.* 1991), sans induire celui de la Glc6Pase (Burch *et al.* 1978). Ainsi, d'autres voies de régulation, par exemple une régulation transcriptionnelle par certains acides aminés circulants, seront à étudier afin de mettre en évidence les différents mécanismes impliqués dans l'induction de la néoglucogenèse rénale par le régime protéique. Le régime caséine, particulièrement riche en glutamine, est le plus efficace pour induire les gènes néoglucogéniques rénaux. Nous mesurerons donc en particulier l'effet d'une perfusion de glutamine sur la néoglucogenèse rénale.

Chez les souris nourries par un régime protéique, bien que la néoglucogenèse intestinale soit induite, l'activité de la Glc6Pase n'est pas affectée dans le rein et est induite dans le foie. Etant donné que la Glc6Pase ne répond pas de la même façon au régime protéique chez le rat et la souris, la comparaison des deux modèles sera utilisée pour caractériser les mécanismes impliqués dans les régulations de ces gènes.

2) Le régime protéique améliore la sensibilité à l'insuline, probablement via le signal glucose portal

Nous avons montré, chez le rat, que le régime enrichi en protéines induit, en plus de la PIG, une augmentation de la sensibilité à l'insuline de la PEG, associée à une épargne du glycogène hépatique (*En annexe*: Pillot et al., 2009). D'autres travaux réalisés chez l'Homme par Gannon et coll. montrent également une amélioration des paramètres glycémiques de patients diabétiques de type 2 alimentés par un régime riche en protéines (Gannon *et al.*, 2003). Nos expériences de dénervation portale chez le rat, afin de déterminer le mécanisme à l'origine de l'augmentation de la sensibilité à l'insuline, n'ont pas été concluantes. Cependant, il a été montré, pour une autre situation dans laquelle la PIG est également induite (souris

« By-pass » ; Troy et al. 2008), un rôle causal du signal glucose portal sur l'amélioration de la sensibilité à l'insuline.

Chez le chien, une perfusion de glucose spécifiquement en veine porte et à un débit équivalent à la PEG induit une rapide augmentation du captage de glucose par le foie (Moore et al. 2004). Chez la souris, une perfusion semblable de glucose en veine porte stimule l'utilisation de glucose en périphérie, favorisant le maintien de l'équilibre des paramètres glycémiques (Burcelin *et al.*, 2000). Cependant, la mise en place d'un clamp hyperinsulinémique euglycémique a permis de mettre en évidence que l'amélioration de la sensibilité à l'insuline observée chez les souris « by-pass », et consécutive à une induction de la PIG, consiste en une meilleure suppression de la PEG et pas en un meilleur captage du glucose par les tissus périphériques. Les effets du glucose portal sur la sensibilité à l'insuline pourraient donc dépendre de la quantité de glucose libéré dans la veine porte.

Dans ce travail de thèse, nous avons montré que les modifications induites par le régime protéique au niveau hépatique semblent très différentes entre rat et souris, avec induction des enzymes néoglucogéniques et diminution du stockage de glycogène chez la souris. La mise en place d'un clamp hyperinsulinémique euglycémique chez ces souris permettra de montrer si, comme chez les souris by-pass, l'induction de la PIG est associée à une augmentation de la sensibilité à l'insuline, et également de confirmer si cette augmentation de la sensibilité à l'insuline par les protéines est liée à la PEG ou à une augmentation du captage de glucose par les tissus périphériques. Par la suite, l'application du clamp chez des souris ayant subi au préalable une dénervation portale et nourries par le régime protéique permettra de mettre en évidence, ou non, l'existence d'un lien causal entre le signal glucose portal et l'amélioration de la sensibilité à l'insuline induite par les protéines alimentaires.

3) L'effet anorexigène des protéines alimentaires : régulation directe de la PIG ?

Chez la souris, le régime protéique semble ne pas induire la même redistribution de la PEG que chez le rat (au profit du rein et de l'intestin et au détriment du foie). Par contre, dans les deux espèces étudiées (rat et souris), l'effet anorexigène des protéines est toujours associé à une induction de la néoglucogénèse intestinale. Les travaux du laboratoire, auxquels j'ai participé pendant mon master, ont permis de proposer, chez le rat, le modèle d'action suivant : un régime protéique induit la PIG. Le glucose, ainsi libéré dans la veine porte où il est détecté, induit l'apparition du signal glucose portal transitant via le nerf vague jusqu'aux aires

hypothalamiques de contrôle de la prise alimentaire qui sont activées (Mithieux et al. 2005). L'étude de l'effet du régime protéique sur la prise alimentaire de souris invalidées pour la Glc6Pase intestinale permettrait de démontrer que la PIG est indispensable pour l'inhibition de la prise alimentaire par les protéines.

Le régime riche en caséine semble plus efficace qu'un régime riche en protéines de viande ou en protéines de soja pour induire les néoglucogénèses intestinale et rénale. Des travaux chez le rat indiquent que l'extraction de leucine par l'organisme à partir d'un régime riche en caséine est significativement plus importante qu'à partir d'un régime riche en soja (Luiking et al., 2005). Par ailleurs, des travaux de la littérature suggèrent que la leucine contenue dans les régimes protéiques pourrait être impliquée dans la diminution de la prise alimentaire. Il a notamment été montré que l'ajout de leucine à un régime standard entraîne une diminution de la prise alimentaire similaire à celle mesurée dans le cas d'un régime riche en caséine (Ropelle et al., 2008). Ces données suggèrent que la leucine pourrait jouer un rôle dans l'induction de la PIG par les protéines alimentaires, et induire ainsi la satiété par le signal glucose portal. Cependant, la validation d'une telle hypothèse nécessite des études plus approfondies, en particulier l'étude de l'effet d'une perfusion de leucine sur la PIG chez des rats nourris en régime standard.

De plus, le groupe Ropelle et coll. a montré, par des injections icv de leucine notamment, que le mécanisme de la leucine impliquerait, au niveau de l'hypothalamus, une induction de l'activité de mTOR associée à une inhibition de l'activité l'AMPK (Ropelle et al. 2008), deux senseurs du statut énergétique cellulaire jouant un rôle dans la régulation de la prise alimentaire (Anderson et al., 2004 ; Woods et al., 2008). Ces régulations aboutiraient à l'inhibition de l'expression de NPY et à l'augmentation de l'expression de POMC dans l'hypothalamus des rats (Ropelle et al., 2008). Il avait en effet été montré que la leucine, plus que les autres acides aminés, était capable d'activer mTOR (Shigemitsu et al. 1999) et que l'activité de celui-ci serait étroitement liée à l'activité de l'AMPK (Kimura et al. 2003 ; Tokunaga et al. 2004). Des injections de leucine d'une part et des perfusions de glucose en veine porte d'autre part, deux signaux consécutifs à une alimentation riche en protéines, sont capables d'induire la satiété. L'effet du régime protéique sur la prise alimentaire, chez l'animal, pourrait s'expliquer par un rôle inducteur de la leucine sur la PIG. Des mesures d'activité des enzymes néoglucogéniques intestinales chez des animaux nourris par un régime standard enrichi en leucine permettront de confirmer cette hypothèse. De plus, des mesures de prise alimentaire après dénervation des afférences vagues chez des animaux nourris en

régime standard enrichi en leucine permettront de préciser le rôle majeur du signal glucose portal dans l'action de la leucine sur la prise alimentaire.

Par ailleurs, un mécanisme impliquant l'hormone intestinale « PYY » a été proposé par l'équipe de Batterham pour expliquer l'effet anorexigène des protéines (Batterham et al. 2006). Ces travaux montrent que chez l'Homme et la souris, la concentration plasmatique de PYY est plus élevée après un régime riche en protéines qu'après un régime riche en hydrates de carbone ou en lipides. De plus, l'effet anorexigène des protéines semble totalement aboli chez les souris invalidées pour le gène codant le PYY. Ces données suggèrent que le PYY est nécessaire à l'effet anorexigène des protéines et qu'il pourrait être un signal en amont, ou en aval, du signal glucose portal. Afin de caractériser le mécanisme, nous pourrions 1) vérifier l'induction de la PIG par le régime protéique chez les souris invalidées pour le gène codant le PYY (PYY en amont du signal glucose portal), 2) mesurer la prise alimentaire chez des souris invalidées pour le gène codant le PYY perfusées en veine porte par du glucose (signal glucose portal en amont du PYY).

4) Implication du système mélanocortinergique dans les effets du régime protéique sur la prise alimentaire

Comme précédemment montré chez le rat, le régime protéique induit, chez la souris, une diminution de la prise alimentaire de l'ordre de 20% comparée au régime standard. Par le biais de l'utilisation de modèles de souris transgéniques, nous avons montré que ni l'invalidation du gène codant MC4-R, ni l'invalidation du gène codant la POMC, ne provoquaient la perte de cet effet hypophagique du régime protéique. Ces données suggèrent que le système mélanocortinergique ne serait pas impliqué directement dans l'effet anorexigène des protéines. Cependant, s'agissant de modèles KO non inductibles, nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse de la mise en place, en particulier au stade néonatal, de systèmes de compensation responsables de la persistance d'un effet hypophagique des protéines alimentaires chez les souris dont le gène codant MC4-R a été invalidé. D'autres expériences, en particulier à l'aide d'injections icv d'oligonucléotides antisens ciblées contre la POMC ou l'AgRP chez la souris nourrie en régime protéique, permettraient peut-être de répondre également à la question, tout en s'affranchissant de l'absence de glucocorticoïdes chez les souris POMC^{-/-} et de la mise en place de systèmes de compensation.

De plus, l'injection icv d'un antagoniste des récepteurs aux mélanocortines (de type 4 plus spécifiquement) avant et pendant le régime protéique chez la souris permettrait aussi, par

une autre approche, de répondre à la question de l'implication du système aux mélanocortines dans l'effet satiétogène des protéines tout en s'affranchissant de la mise en place de systèmes de compensation.

Par ailleurs, le modèle invalidé pour le gène codant MC4-R dont nous disposons offre la possibilité, par croisement avec des souris exprimant la recombinaison « Cre » (de manière tissu-spécifique selon le choix du promoteur de la recombinaison), de ré-induire l'expression du gène codant MC4-R par clivage de la cassette « stop » placé en amont du gène. Le suivi de la prise alimentaire de souris MC4-R^{-/-} nourries en régime protéique et dont on ré-induit le gène après plusieurs jours de régime protéique permettra de mieux comprendre l'implication du système mélanocortinergique dans l'effet anorexigène des protéines alimentaires.

5) Rôle majeur du système mélanocortinergique dans la contre-régulation mise en place face à la chute de la prise alimentaire au moment du changement de régime.

Des mesures de l'expression de la POMC et de l'AgRP hypothalamiques à 4 jours de régime protéique chez des souris témoins indiquent un rapport POMC/AgRP plus faible que chez les souris témoins nourries en régime standard. Ce rapport serait plutôt en faveur d'un effet orexigène du régime protéique. Par ailleurs, cet effet s'estomperait lorsque le régime protéique se prolonge, puisqu'à 12 jours déjà la différence d'expression de la POMC entre les souris des régimes standard et protéique est bien plus faible qu'à 4 jours. Ces données nous permettent de faire l'hypothèse qu'il s'agirait d'un effet « contre-régulateur » du système mélanocortinergique, à court terme, face à l'hypophagie brutale provoquée par le changement de régime. Confirmant cette hypothèse, des données obtenues chez un modèle de souris invalidées pour le gène codant MC4R (qui ne disposent plus de ce système de contre-régulation) montrent une chute de la prise alimentaire plus marquée chez ces souris au moment du changement de régime, associée à une reprise de la prise alimentaire plus lente que chez les souris témoins.

Dans ce travail, nous avons observé que la chute de prise alimentaire en réponse au changement de régime s'accompagne d'une perte de poids des souris. Ceci pourrait être associé à une diminution de la leptine circulante. Les données de la littérature indiquent qu'une perfusion de leptine induit une augmentation de l'expression de la POMC hypothalamique (Gout et al. 2008) et une diminution de la libération d'AgRP (Breen et al. 2005). Cependant, la leptine induit également une augmentation de l'expression de MC4-R (Gout et al. 2008), non affectée à 4 jours de régime protéique chez nos souris. Des dosages de

la leptine chez les souris nourries à 4 jours, puis 30 jours, de régime protéique doivent être effectués pour mettre en évidence des variations de leptine corrélées aux variations de l'expression de POMC et d'AgRP hypothalamiques. Ces expériences apporteront des éléments de réponse concernant le rôle de la leptine dans la mise en place de la contre-régulation par le système mélanocortinergique.

Par ailleurs, il a été montré qu'en situation de jeûne le rapport POMC/AgRP est en faveur d'une forte diminution, semblable à celle observée chez nos souris nourries en régime protéique (Breen et al. 2005). D'autre part, des travaux de Makimura et coll. montrent qu'une adrénalectomie, supprimant ainsi la synthèse des glucocorticoïdes, provoque l'abolition de la régulation des gènes hypothalamiques de la POMC et de l'AgRP par le jeûne (Makimura et al. 2003). Ces travaux indiquent que les glucocorticoïdes sont nécessaires dans la régulation du système mélanocortinergique induite par le jeûne. Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle la « contre-régulation » que nous observons au moment du changement de régime implique également les glucocorticoïdes, il serait intéressant de vérifier la perte de cette contre-régulation en absence de glucocorticoïdes (mise en évidence par une chute de prise alimentaire drastique au moment du changement de régime). Des données préliminaires obtenues chez les souris invalidées pour le gène codant la POMC (et non traitées par la corticostérone) semblent confirmer cette hypothèse.

Article 1 :

Portal sensing of intestinal gluconeogenesis is a mechanistic link in the diminution of food intake induced by diet protein

Gilles Mithieux, Pierre Misery, Christophe Magnan, **Bruno Pillot**,
Amandine Gautier-Stein, Christine Bernard, Fabienne Rajas, and
Carine Zitoun

Portal sensing of intestinal gluconeogenesis is a mechanistic link in the diminution of food intake induced by diet protein

Gilles Mithieux,^{1,3,4,*} Pierre Misery,^{1,3,4} Christophe Magnan,^{5,6} Bruno Pillot,^{1,3,4} Amandine Gautier-Stein,^{1,3,4} Christine Bernard,^{2,4} Fabienne Rajas,^{1,3,4} and Carine Zitoun^{1,3,4}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U449, Lyon, F-69372, France

²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U45, Lyon, F-69372, France

³Institut National de la Recherche Agronomique, U1235, Lyon, F-69372, France

⁴Université Claude Bernard Lyon I, Lyon, F-69372, France

⁵Centre National de la Recherche Scientifique, U7059, Paris, F-75251, France

⁶Université Paris 7, Paris, F-75251, France

*Correspondence: mithieux@sante.univ-lyon1.fr

Summary

Protein feeding is known to decrease hunger and subsequent food intake in animals and humans. It has also been suggested that glucose appearance into portal vein, as occurring during meal assimilation, may induce comparable effects. Here, we connect these previous observations by reporting that intestinal gluconeogenesis (i.e., *de novo* synthesis of glucose) is induced during the postabsorptive time (following food digestion) in rats specifically fed on protein-enriched diet. This results in glucose release into portal blood, counterbalancing the lowering of glycemia resulting from intestinal glucose utilization. Comparable infusions into the portal vein of control postabsorptive rats (fed on starch-enriched diet) decrease food consumption and activate the hypothalamic nuclei regulating food intake. Similar hypothalamic activation occurs on protein feeding. All these effects are absent after denervation of the portal vein. Thus, portal sensing of intestinal gluconeogenesis may be a novel mechanism connecting the macronutrient composition of diet to food intake.

Introduction

The disorders of food intake have a major impact on the worldwide expansion of obesity and type 2 diabetes mellitus (Flier, 2004; Friedman, 2000). This urges the scientific community to seek novel mechanisms of control of the sensations of hunger and satiety. The brain, particularly specific hypothalamic nuclei, plays a crucial role in this control. It ceaselessly senses nutrients and hormones provided by the periphery, and adapts energy intake and expenditure to the needs of the body (Obici et al., 2003; Schwartz and Morton, 2002).

In this context, it is well known that protein feeding decreases hunger sensation and subsequent food intake in animals and human (Barkeling et al., 1990; Booth et al., 1970; Jean et al., 2001; Rolls et al., 1988). However, the mechanism by which proteins induce their specific hypophagia effects is still unsolved (Barkeling et al., 1990; Booth et al., 1970; Jean et al., 2001; Rolls et al., 1988). Actually, the major hormones decreasing food intake produced by the body are either unaffected (leptin) or even slightly decreased (insulin) if the proportion of protein in the diet is increased (Jean et al., 2002). Similarly, the participation of the two main gut-derived hormones possibly involved in food intake i.e., cholecystokinin (Moran, 2000) and PYY₃₋₃₆ (Batterham et al., 2002; Halatchev and Cone, 2005) seems excluded. In fact, PYY₃₋₃₆ is unspecifically secreted in response to food in proportion to the calories ingested (Pedersen-Bjergaard et al., 1996; Schwartz and Morton, 2002) and the cholecystokinin release is stimulated by proteins as well as by lipids in animals (Backus et al., 1995; Douglas et al., 1990) and humans (Hopman et al., 1985), whereas lipids

have a much lower suppressing effect on food intake than proteins (Rolls et al., 1988).

Besides hormones, glucose per se is a key signaling molecule able to suppress food intake (Thorens and Larsen, 2004). Contrasting with most of the circulating hormonal signals (for instance, leptin or insulin), which are supposed to be directly sensed by the brain (hypothalamus) through the median eminence (Flier, 2004; Schwartz and Morton, 2002), the sensing of glucose-induced effects takes place in the portal vein (Langhans et al., 2001; Thorens and Larsen, 2004; Tordoff and Friedman, 1986; Tordoff et al., 1989). It is dependent on glucose-sensitive cells present in the wall of the portal vein, the signal being transmitted to the brain via afferences of the vagus nerve (Adachi et al., 1984; Schmitt, 1973; Shimizu et al., 1983; Thorens and Larsen, 2004). As a related point, we previously reported that gluconeogenesis genes are expressed in the small intestine (SI) in rats and humans (Rajas et al., 1999, 2000). This confers on this tissue the capacity to form glucose and release it into the portal blood, this capacity actually taking place only when these genes are induced, such as in fasting and diabetes (Croset et al., 2001; Mithieux et al., 2004a). Because portal glucose is able to induce hypophagia, this raised the attractive hypothesis that intestinal gluconeogenesis might have the capacity to decrease hunger sensation and food intake. Moreover, it has been previously reported that rats fed on a high-protein and carbohydrate-free diet can adapt very rapidly by inducing hepatic gluconeogenesis, the induction of the main liver gluconeogenesis enzymes is even more rapid than during the adaptation to fasting (Boisjoly et al., 1986). Thence, we tested the hypothesis that protein feeding might induce gluco-

neogenesis in the SI, which gives the possibility of detecting glucose release by the portal glucose sensor, and thus of decreasing food intake.

Results and discussion

Protein feeding induces hypophagia, SI gluconeogenesis, and portal glucose release during the postabsorptive period

In agreement with previous results (Jean et al., 2001), rats fed on a diet moderately enriched in protein (50% by weight as protein) ate and grew less than rats fed on a control starch enriched diet (SED) (17% as protein). Rats ate slightly less the first day they were given the PED, but this was rapidly compensated within a couple days, as previously reported (Jean et al., 2001). Food intake, monitored over 6 successive days from the third day on PED feeding, was 17.4 ± 0.6 g/day/rat in PED-fed rats versus 20.5 ± 0.7 g/day/rat in SED-fed rats (mean \pm SEM, $n = 6$ per group, $p < 0.05$, Student's *t* test for unpaired value). This represented a 15% lower food intake in PED-fed rats, very comparable to that previously reported (Jean et al., 2001). This resulted in a weight gain of 49.8 ± 2.6 g in rats fed on the protein-enriched diet (PED) versus 60.6 ± 3.1 g in SED-fed rats (mean \pm SEM, $n = 6$ per group) after 7 days, and 84.7 ± 3.4 g versus 102.4 ± 2.9 g, respectively, after 15 days (differences were significant at $p < 0.01$, Student's *t* test for unpaired value), whereas rats were perfectly matched for weight at the beginning of the experiment: 201.0 ± 1.4 g for SED-fed and 200.7 ± 1.6 g for PED-fed rats. Because rats fed on PED weighed progressively less, we also expressed the results as kcal ingested per kg per day during the monitoring period of 6 days. PED-fed rats ingested 278.0 ± 2.2 kcal/kg/day whereas SED-fed rats ingested 319.2 ± 2.6 kcal/kg/day. The difference was slightly lower compared to the expression of results as g of food ingested/day/rat, but still significant ($p < 0.05$, Student's *t* test for unpaired values). It is interesting to mention that the composition of the protein diet given herein was chosen on the basis that rats allowed to self-select the macronutrient composition of their diet choose a very comparable protein-enriched diet (Jean et al., 2002). It seems therefore unlikely that the protein-induced hypophagia might be due to lesser palatability of the diet or malaise. Also in disagreement with the latter hypothesis, it has been previously reported that protein-feeding decreases food intake by inducing satiety phenomena and not malaise or taste aversion (L'Heureux-Bouron et al., 2004; Westertep-Plantenga, 2003). However, because the role of palatability was not addressed here, it could not be formally excluded that differences in palatabilities of SED and PED may account at least in part for the effects observed.

In line with our hypothesis, the expression of the two major regulatory genes of gluconeogenesis in the SI, i.e., glucose-6 phosphatase (Glc6Pase) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) (Mithieux et al., 2004b) was dramatically induced in rats fed on the PED compared to those fed on the SED. A double induction was observed on the amount of protein detected by immunoblotting (Figures 1A and 1B) and on the enzyme activity determined under conditions of maximal velocity (Figure 1C). Moreover, there was a marked induction by about 80% of the expression of the glutaminase gene in rats fed on the PED (Figure 1). The latter gene was strongly suggested to have a crucial potentiating role in SI gluconeogenesis (Mithieux

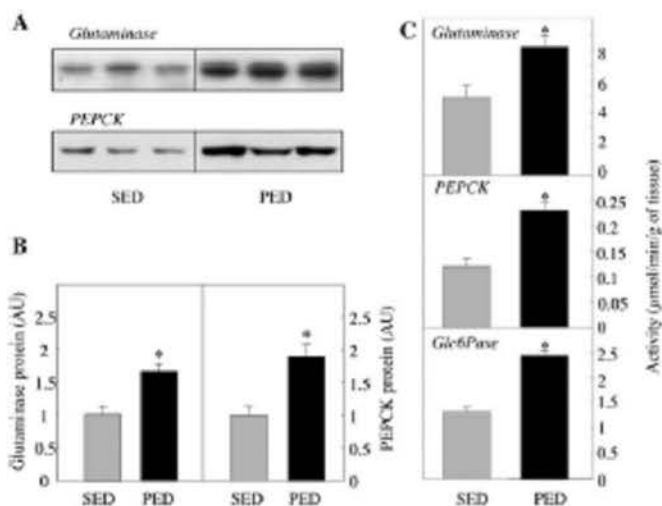


Figure 1. Induction of gluconeogenesis genes in the rat SI upon PED feeding

A) Representative Western blot analysis of glutaminase and PEPCK in the proximal jejunum for three rats fed on the SED (left) and 3 rats fed on the PED (right) for 7 days.

B) Densitometric analysis performed from six rats per group. The results are expressed as arbitrary units (AU), *, $p < 0.05$, Student's *t* test for unpaired samples.

C) Enzymatic activities assayed under conditions of maximal velocity ($n = 6$ per group) (Mithieux et al., 2004a; Rajas et al., 1999, 2000). The results are expressed as $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ of wet tissue, *, $p < 0.05$, Student's *t* test for unpaired values.

et al., 2004a). The experiments shown in Figure 1 were performed on day 7, but separate experiments clearly indicated that induction occurred from the first 24 hr of PED feeding (data not shown). Moreover, results from the proximal jejunum are shown in Figure 1, but comparable induction occurred in all parts of the SI, from duodenum up to ileum. It is of note that in previous studies in which carbohydrates were totally replaced by protein, induction of gluconeogenesis enzymes was reported in the liver (Boisjoly et al., 1986). In contrast, no induction of either gluconeogenesis genes occurred in the liver with the diet moderately enriched in protein used herein (data not shown). In the liver, this was consistent with the fact that no change in plasma insulin occurred (Table 1) and, in the SI, with our previous observation that more than the insulin status was crucial to determine Glc6Pase gene induction in this tissue (Mithieux et al., 2004a, 2004b). It must be mentioned that the induction of gene expression by protein diets in the SI is not unique to genes of gluconeogenesis. The gene of the intestinal oligopeptide transporter PepT1 for example was shown to be markedly induced under such nutritional conditions (Adibi, 2003). In line with the induction of intestine specific genes by proteins *in vivo*, protein hydrolysates were shown to activate *in vitro* the transcription of cholecystokinin and proglucagon genes, via cAMP-dependent activation of the nuclear factor CREB (cAMP response element binding protein) (Gevrey et al., 2002, 2004). Interestingly, the latter factor was also shown to be essential in the transcriptional control of Glc6Pase and PEPCK genes by cAMP (Gautier-Stein et al., 2005; Quinn et al., 1988).

We then tested whether gluconeogenic gene induction re-

Table 1. Plasma glucidic parameters in SED- and PED-fed rats

Feeding pattern	[3- ³ H] glucose specific activity (dpm/ μ mol)		Plasma glucose (mmol/l)		Fractional extraction	Plasma insulin (pmol/l)
	artery	vein	artery	vein		
SED	10,539 \pm 661	10,739 \pm 610	9.3 \pm 0.6	6.6 \pm 0.5*	0.06 \pm 0.01	304 \pm 42
PED 1 days	12,299 \pm 556	11,874 \pm 616*	9.5 \pm 0.9	9.2 \pm 0.9	0.06 \pm 0.02	266 \pm 182
PED 2 days	10,394 \pm 555	9,777 \pm 492*	9.4 \pm 0.5	9.6 \pm 0.5	0.04 \pm 0.01	294 \pm 99
PED 3 days	10,902 \pm 484	10,273 \pm 442*	10.5 \pm 0.4	10.6 \pm 0.5	0.04 \pm 0.01	352 \pm 136
PED 7 days	11,143 \pm 297	10,401 \pm 209*	9.4 \pm 0.3	9.5 \pm 0.2	0.05 \pm 0.01	334 \pm 55
PED 15 days	9,659 \pm 477	9,011 \pm 482*	10.3 \pm 0.4	10.1 \pm 0.4	0.07 \pm 0.02	312 \pm 90
PED 2 days + SED 1 day	10,601 \pm 800	10,353 \pm 609	6.9 \pm 0.9	6.3 \pm 0.7*	0.07 \pm 0.02	329 \pm 91

Rats ($n = 8$ per group) were either fed on the control SED or fed on SED and then on the PED for 1, 2, 3, 7, and 15 days or the PED for 2 days and the SED for 1 more day. The results are expressed as mean \pm SEM. *^aValue in vein different from that in artery, $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Student's *t* test for paired values).

sulted in the release of glucose into the portal vein, as demonstrated in fasting or diabetes (Croset et al., 2001; Mithieux et al., 2004a). Because the SI is also a strong glucose-utilizing organ, we used the previous combination of arterio-venous balance determination and glucose tracer dilution analysis to separate the uptake and release of glucose by the SI (Croset et al., 2001; Mithieux et al., 2004a). Though rats ate slightly less the first day they were given the PED (see above), this was not sufficient to significantly alter plasma glucose and insulin concentrations in comparison with rats fed on the SED (Table 1). The SI blood flow in rats fed on the PED for one day (6.2 ± 0.7 ml/min) was not different from that in SED-fed rats (5.9 ± 0.9 ml/min), and it was not further modified during the following days. Rats were deprived of food for 6 hr, anesthetized, and fitted with catheters. This was a time when the SI was completely cleared up to the very distal ileum in both SED-fed and PED-fed rats. This prevented glucose absorbed from the intestinal lumen from giving ambiguous results. It should be noted that the plasma concentration of cholecystokinin, i.e., the main candidate hormone putatively affected by protein ingestion (Jean et al., 2002), was identical in PED-fed rats (for 7 days) (2.85 ± 0.8 pg/ml, mean \pm SEM, $n = 6$) and in SED-fed rats (3.82 ± 1.14 pg/ml). Blood was then sampled after 90 min of [3-³H]-glucose infusion (Croset et al., 2001). The [3-³H]-glucose specific activity (SA) was the same in portal and arterial blood in SED-fed rats (Table 1). This was an indication that there was no release of glucose into the portal blood in these rats. This also confirmed that food digestion was completed (see above). There was a significant decrease in plasma glucose concentration in the portal vein as compared to the artery (Table 1), reflecting glucose utilization by the tissue. The intestinal glucose balance (IGB), calculated from these glucose concentrations, was in the same order range as that of the intestinal glucose uptake (IGU), which was deduced from the arterial glucose concentration and the [3-³H]-glucose removal by the SI (i.e., fractional extraction or FX) (Tables 1 and 2). Consequently, the calculated intestinal glucose release (IGR) was not different from nought (-3.4 ± 2.7 μ mol/kg/min, mean \pm SEM, $n = 8$) (Table 2). These data were in agreement with our previous data in postabsorptive and/or short-term fasted rats previously fed a starch-based diet (Croset et al., 2001; Mithieux et al., 2004a). In contrast, in rats fed on the PED, the glucose SA was significantly lower (-3.4%) in the portal compared to arterial blood from the first day of PED feeding (Table 1). This revealed a

significant release of unlabeled glucose into the portal blood. Consequently, the decrease in glycemia observed in the portal blood was almost negligible as compared to that in SED-fed rats. From the second day and up to 15 days of PED feeding, the decrease in glucose SA between the portal vein and the artery was deeper (around -6%), and there was no more difference in plasma glycemia between vein and artery (Table 1). Accordingly, the calculated intestinal glucose balance (IGB) was lower than that in SED-fed rats from one day of PED feeding onward and then approached zero between 2–15 days (Table 2). The intestinal glucose uptake (IGU) was the same in PED- and SED-fed rats (Table 2) with no alteration throughout the feeding period. These data revealed a significant intestine glucose release (IGR) of 6.9 ± 2.1 μ mol/kg/min, representing 12% of the endogenous glucose production (EGP) the first day of PED feeding. The glucose release increased twice (13.1 ± 2.8 μ mol/kg/min or 19% of PEG) from day 2 and underwent no further change thereafter (Table 2). In PED-fed rats infused with [U-¹⁴C] glutamine, there was a significant ($p < 0.05$) increase ($+3.6\%$) in the ¹⁴C-glucose SA in the portal vein compared to the artery. This indicated that glucose molecules released by the SI had incorporated ¹⁴C-glutamine. This was in agreement with the increased expression of the glutaminase gene (Figure 1) and with the fact that glutamine is the main, if not the only, substrate of SI gluconeogenesis (Croset et al., 2001; Mithieux, 2001). It was noticeable that the total endogenous glucose production (EGP) was not altered in PED-fed compared to SED-fed rats, while an intestinal component appeared with PED feeding. This was in agreement with the observation that glucose production by the liver is proportionally inhibited by portal glucose appearance (Sindelar et al., 1997). Interestingly, intestine glucose production was highly characteristic of PED. It was in fact equal to nought in rats fed on the PED for 2 days and refed on the SED for 1 day (Tables 1 and 2), or in rats fed on a high-fat diet as previously described (Mithieux et al., 2002) (data not shown). These data strongly suggested that the induction of gluconeogenic genes in the SI resulted in the portal release of glucose during the postabsorptive period in rats specifically fed on the PED.

Portal glucose appearance induces hypophagia per se

Next, the question arose of whether such intestinal glucose fluxes delivered to the portal vein, which were quantitatively low but continuous, were capable of decreasing food intake in

Table 2. Intestinal glucose fluxes in SED- and PED-fed rats

Feeding pattern	IGU	IGB	IGR (% of EGP)	EGP
SED	12.9 ± 5.5	16.3 ± 6.0	-3.4 ± 2.7	72.9 ± 4.5
PED 1 days	14.7 ± 5.6	7.9 ± 3.9	6.9 ± 2.1 (12%)	61.9 ± 2.7
PED 2 days	9.0 ± 2.2	-4.1 ± 4.2	13.1 ± 2.9 (19%)	70.7 ± 3.6
PED 3 days	9.7 ± 2.9	-2.6 ± 2.7	12.5 ± 1.9 (17%)	74.5 ± 1.9
PED 7 days	10.4 ± 4.0	-3.9 ± 1.2	14.3 ± 4.1 (21%)	69.9 ± 1.8
PED 15 days	16.5 ± 4.9	4.0 ± 4.4	12.3 ± 2.9 (17%)	73.7 ± 2.4
PED 2 days + SED 1 day	11.7 ± 3.9	6.9 ± 4.3	2.9 ± 3.7	63.6 ± 5.0

Rats were either fed on the control SED or fed on the SED and then on the PED for 1, 2, 3, 7, and 15 days or the PED for 2 days and the SED for 1 more day. All procedures required for the determination of IGU, IGB, IGR, and EGP are fully described in Experimental Procedures. The results are expressed as $\mu\text{mol/kg/min}$ and are the mean \pm SEM ($n = 9$).

a way similar to the previously studied glucose fluxes, which were quantitatively higher but more transient (the latter being merely designed to match postprandial glucose absorption) (Langhans et al., 2001; Tordoff and Friedman, 1986; Tordoff et al., 1989). Rats were fitted with indwelling catheters into the portal vein. After one week, allowing complete recovery after surgery, rats were infused with glucose at 12 and 25 $\mu\text{mol/kg/min}$, i.e., matching the mean and maximal values of IGR determined individually in PED-fed rats respectively. It must be noted that this rather high scatter in IGR values (Table 2) may be either intrinsically inherent in IGR or at least partly attributable to the lack of precision of the tracer approach (this point is discussed in Croset et al., 2001). In separate experiments (data not shown), we checked that there was no modification of either plasma glucose or insulin in peripheral blood induced by such low portal glucose infusions. This was in keeping with the coordinate suppression of hepatic glucose production (see above). In a first approach, we studied rats fed on the control SED (i.e., they exhibited none of the alterations putatively induced by PED-feeding). This allowed us to rule out that any other parameter altered on PED feeding could hide the effects induced by portal glucose appearance. Glucose infusion with both the above fluxes significantly decreased the rats food intake compared to saline infusion (Figure 2). The decrease amounted to about 16% and 22% at 12 and 25 $\mu\text{mol/kg/min}$, respectively, at the beginning of the dark period, i.e., the time of preferential feeding in rodents (Figure 2A). The suppression of intake was even more pronounced at the beginning of the light period: -30% and -36% at 12 and 25 $\mu\text{mol/kg/min}$, respectively (Figure 2A). This was a specific effect of glucose because there was no decrease in food intake caused by portal infusions of other nutrient metabolites such as lactate (25 $\mu\text{mol/kg/min}$) or alanine (25 $\mu\text{mol/kg/min}$) (data not shown). These data strongly suggested that portal glucose appearance, as occurring on PED feeding during the postabsorptive period, was able per se to account for the decreased food intake induced by the diet.

In a second approach, we studied rats fed on the PED (i.e., they exhibited all the alterations putatively induced by PED feeding including endogenous IGR). In line with the results of continuous food consumption monitored over several successive days (see above), food intakes tended to be lower than those in the previous protocol involving the SED diet under the three conditions of infusion (Figure 2A). However, the differences were not significant ($p > 0.1$) in this short-term fasting-refeeding transition study. This might possibly be due to subtle

differences in the food behavior adaptation to this type of transition, which were out of the scope of the present study. It was of note that portal glucose infusion at both rates was still able to further decrease food intake compared to saline infusion (Figure 2A). The decreases in regard to the control saline infusion value were in the same order range as those in the protocol involving the SED diet. These data strongly suggested that among the various parameters putatively altered by PED feeding during the postabsorptive period, portal glucose appearance has a dominant effect in relation to the control of food intake.

Because the role of the portal glucose sensor in deriving either the central response to hypoglycemia (Hevener et al., 2000; Thorens and Larsen, 2004) or the activation of the central areas involved in the response to portal glucose is established (Adachi et al., 1984; Schmitt, 1973; Shimizu et al., 1993), we further focused on the role of the portal nervous system in the decreased food intake induced by glucose infusion. Rats were

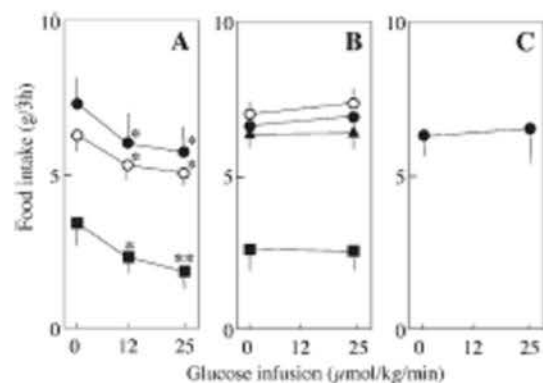


Figure 2. Effect of glucose infusions on food intake in SED-fed (filled symbols) and PED-fed (open symbols) rats

A) Effect of infusions of saline (0) or glucose (12 or 25 $\mu\text{mol/kg/min}$) into the portal vein in SED-fed (data from six rats, filled circles) and PED-fed rats (data from 6 rats, open circles) at the beginning of the dark phase; and in SED-fed rats at the beginning of the light phase (data from eight rats, filled squares). The results are the mean \pm SEM; *, **, different from respective saline infusion $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Student's *t* test for paired values). B) Effect of similar portal infusions in rats with capsacin-treated portal vein (data from five rats under each condition, symbols as above). Filled triangles refer to an experiment of mechanical denervation of the portal vein (data from four rats). C) Effect of infusions into peripheral blood (data from four rats, symbol as above).

treated by local application of capsaicin around the portal vein at the time when portal catheters were inserted into the portal vein (Jancso et al., 1980). Capsaicin is a neurotoxic agent inducing the selective inactivation of weakly myelinated or unmyelinated autonomic afferent fibers (Blackshaw et al., 2000; Holzer, 1991). After recovery, rats were studied for their food intake in response to portal infusions as above. There was no effect of portal glucose infusion on food intake in capsaicin-treated rats, either during the dark or the light phase. This absence of effect was noted in SED-fed as in PED-fed rats (Figure 2B). It is known that, even if extreme care is taken during the application, capsaicin might impact neighboring tissues and/or nerve fibers (Zafra et al., 2004). Thus, portal vein denervation was also mechanically performed (by gentle scrapping). The results were identical to those in capsaicin-treated animals (Figure 2B). However, one must bear in mind that nerve fibers from the liver travel along the same way than those from the portal vein. Therefore, it cannot be formally excluded that they might also be impacted by the denervation treatment and that a part of the glucose signal may be detected in the liver. Also, because we did not check the neuroanatomical result of denervation, it is possible that not all nerve fibers were impacted by the treatment. However, it seems obvious that at least those involved in the glucose signal transmission were inactivated. At last, rats were fitted with indwelling catheters placed into the right jugular vein instead of the portal vein. They were also studied for food intake in response to saline or glucose infusions. Again in line with the key role of portal vagal afferences in the central control of food intake by portal glucose, there was no alteration of food intake induced by glucose infusions into this peripheral vein (Figure 2C).

We further ascertained that the hypophagia effect induced by PED (see above) was dependent on the presence of a functional portal glucose sensor. With this aim, rats were either denervated around the portal vein as above (without catheter insertion) or sham-operated (i.e., treated by local application of saline instead of capsaicin around the portal vein). After recovery for 7 days under SED feeding, they were further given either the SED or the PED. After two days for familiarization with the PED (see above), the growing rate of rats was studied during 5 more days. In line with former data, sham-operated rats fed on the PED ate and grew less during the study period than their counterparts fed on the SED. In contrast, in rats with inactivated portal glucose sensor, there was no effect of PED on food intake and the animals ate and grew as sham-operated rats fed on the SED (Figure 3). This strongly suggested that the PED-induced hypophagia was dependent on a functional portal glucose sensor. It is interesting to note that the reversal of PED effect by capsaicin disagreed with the hypothesis that a lower palatability might account for the induced decrease in food intake (see above). It was noteworthy that there was no significant effect of portal denervation of the growing rate of rats fed on the SED (Figure 3). The latter had the possibility to sense portal glucose deriving from food assimilation and not glucose deriving from gluconeogenesis (see Figure 1 and Table 2). This strongly suggested that the decreasing effect on food intake promoted by portal glucose might not evidenced during the periods of active food assimilation, possibly because of redundant potent mechanisms of control of food intake concomitantly taking place (e.g., mechanical distension). Conversely, these results also emphasized that the control of food

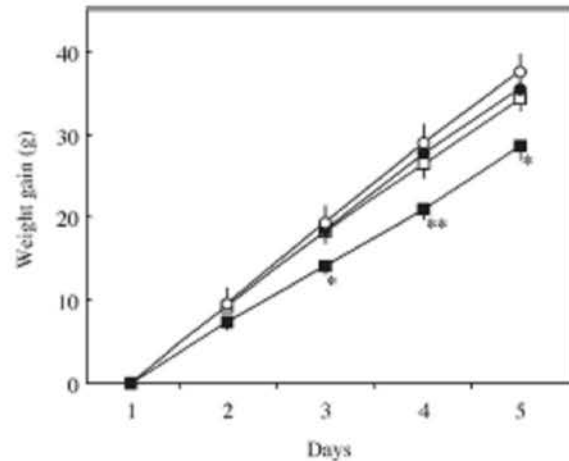


Figure 3. Dependency of the sensitivity to PED feeding on the portal vein innervation

The growing rate of sham-operated rats fed on the PED (filled squares) was compared to rats with denervated portal vein fed on the same diet (open squares) and to sham-operated rats (filled circles) and denervated rats (open circles) fed on the SED. The results are the mean \pm SEM from six rats per group. *, **, different from value in counterparts with denervated portal vein, $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Student's *t* test for unpaired values).

intake depending on portal glucose sensing should be a mechanism essential in the periods of low portal appearance and specific of glucose from intestinal gluconeogenic origin (a situation taking place in the postabsorptive period in rats fed on the PED and/or when food assimilation is close to ending). Interestingly, our data are in keeping with previous results suggesting that portal glucose infusion is important in determining future food intake rather than in terminating ongoing meal (Baird et al., 1997). It is likely that, when available, animals with selective blockade of intestinal gluconeogenesis (e.g., mice with targeted inactivation of *Glc6Pase* gene in the *S/I*) will allow not only to confirm our data, but also to address more in depth these questions.

Activation of hypothalamic nuclei induced by portal glucose appearance matches that induced by protein feeding

Finally, we studied whether the hypophagia effects evidenced in postabsorptive rats fed on PED, or in postabsorptive rats fed on SED and infused with glucose into the portal vein, were both consistent with the occurrence of central events taking place in the main hypothalamic nuclei known to be involved in the regulation of food intake. Because *c-fos* expression is a well-recognized marker of neuronal activation (Halatchev and Cone, 2005; Pocai et al., 2005), we studied *c-fos* expression in the arcuate nucleus (ARC), the ventromedian nucleus (VMN), the dorsomedian/paraventricular nucleus (DM/PVN), and lateral hypothalamus (LH). The results shown in Figure 4 were from the PVN, but it was noteworthy that infusions of glucose into the portal vein or protein feeding elicited very similar *c-fos* expressions in all aforementioned hypothalamic areas. The selectivity of *c-fos* activation in these hypothalamic areas was ascertained from photomicrographs showing larger brain areas

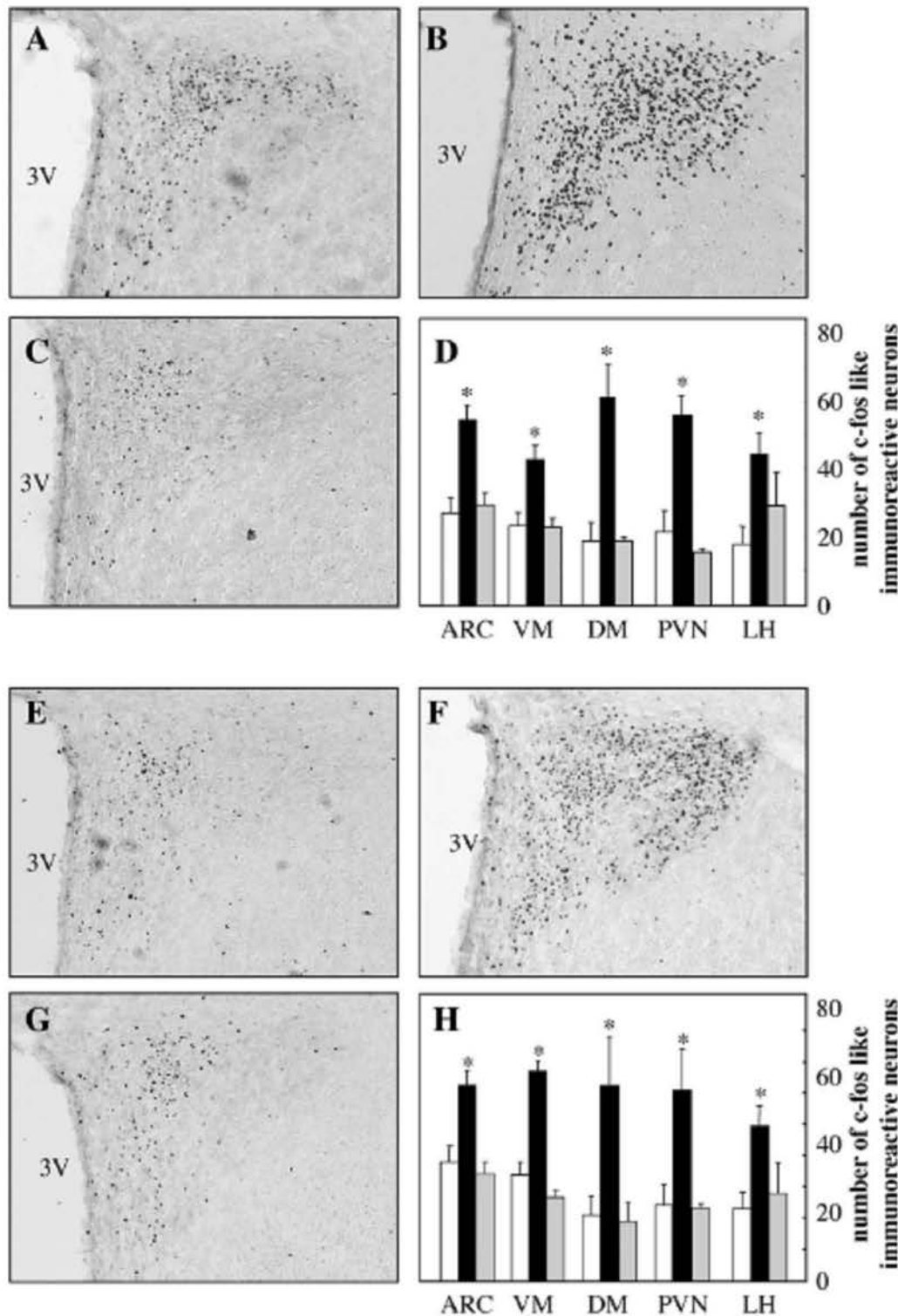


Figure 4. Induction of c-fos expression by portal glucose infusion or PED-feeding in rat hypothalamus

A–C) Photomicrographs showing c-fos-like immunoreactive neurons in PVN of normal rats infused into the portal vein with saline (A) or glucose at 25 $\mu\text{mol/kg/min}$ (B), and of denervated rats infused with glucose (C). Magnification = 100 \times . 3V refers to third ventricle.

D) Number of c-fos-like immunoreactive neurons in arcuate nucleus (ARC), ventromedian hypothalamus (VM), dorsomedian hypothalamus (DM), paraventricular nucleus (PVN), and lateral hypothalamus (LH). Saline and glucose infusions in normal rats: open and filled columns, respectively; Glucose infusion in denervated rats: gray column. The results are expressed as the mean \pm SEM of three rats per group; * different from saline, $p < 0.05$ (Student's *t* test for unpaired values).

E–G) Photomicrographs showing c-fos-like immunoreactive neurons in PVN of normal rats fed on SED (E) or PED (F) and of denervated rats fed on PED (G).

H) Number of c-fos-like immunoreactive neurons in ARC, VM, DM, PVN, and LH. SED-fed and PED-fed normal rats: open and filled columns, respectively; PED-fed denervated rats: gray columns. Magnification and expression of results as above.

(Figure S1 in the Supplemental Data available with this article online). The number of *c-fos* immunoreactive neurons was increased by a factor of 2 to 3 in all areas in postabsorptive rats infused with glucose compared to control rats infused with saline (Figures 4A, 4B, and 4D). The increases were quantitatively comparable in postabsorptive rats fed on PED in regard to control rats fed on SED (Figures 4E, 4F, and 4H). In contrast, there was no increase in *c-fos* labeling in any of these areas in rats in which the portal vein had been denervated (Figure 4C, 4D, 4G, and 4H). It may appear paradoxical that activation took place in the LH, especially because the latter has been classically considered as a feeding center (global destruction of the LH leading to hypophagia) and because reciprocal relationships between activities of the LH and VMH (conversely assumed to be a satiety center) were previously reported (Anand, 1961; Oomura et al., 1964). However, changes in the neuronal activity in the LH promoted by portal glucose were already reported (Schmitt, 1973; Shimizu et al., 1983). Moreover, one cannot predict from *c-fos* activation the final effect of those neurons that were selectively activated by PED or portal glucose in the LH. Further identifications of the neuromediators expressed in the *c-fos*-activated neurons by double labeling experiments would allow to specify the mechanisms induced by glucose and/or diet proteins. However that may be, our data strongly suggested that the central hypothalamic events elicited either by portal glucose infusion or PED-feeding were similar, and as a whole resulted in decreasing food intake.

In conclusion, we report in this study that protein feeding markedly increases the expression of the regulatory genes of gluconeogenesis in the SI in rats. This promotes endogenous glucose synthesis and release into the portal blood, a phenomenon lasting during the postabsorptive time, i.e., after the period of assimilation of food glucose. This portal glucose flux, sensed by the portal glucose sensor, is able per se to activate the hypothalamic nuclei involved in the regulation of food intake and to cause a decrease in subsequent food consumption. As such, these results provide an answer to the question of how protein-enriched meals decrease hunger and induce hypophagia, unsolved up to now (Barkeling et al., 1990; Booth et al., 1970; Jean et al., 2001; Rolls et al., 1988; Westerterp-Plantenga, 2003). Together with other recent results (Abbott et al., 2005; Gutierrez-Juarez et al., 2004; Peters et al., 2005; Poci et al., 2005), our data further point out the connection between the central nervous system and the integrated digestive system, and the crucial role of the vagal transmission in the central control of energy homeostasis. Moreover, they bring to light a novel concept of control of food intake, involving the SI glucose metabolism as a key relay from the macronutrient composition of the diet to the amount of food ingested. Because gluconeogenesis is present in the human intestine (Battezzati et al., 2004; Mithieux et al., 2004b; Rajas et al., 1999, 2000), and protein-induced diminution of hunger concerns human beings (Barkeling et al., 1990; Booth et al., 1970; Rolls et al., 1988), the SI glucose metabolism may be a new target in the treatment of food intake disorders.

Experimental procedures

Animals and tissues sampling

Rats weighing 260–280 g were acclimated to our animal house under controlled temperature (22°C) and light conditions (light/dark, 12 hr/12 hr) with free access to water and SED diet. The composition of the diets was essen-

tially based on that of a standard chow diet, as previously described (Mithieux et al., 2002), with modifications in the ratio starch-glucose/protein, that was 50%/17% in SED and 17%/50% in the PED (weight basis), respectively. Protein was a mixture of soya protein and casein (50/50). All experiments intended for tissue sampling were performed in the postabsorptive state, i.e., 6 hr after food removal, a time when food absorption was completed. The intestine was sampled essentially as described (Mithieux et al., 2004a). All procedures for gene expression analyses were previously described in detail (Mithieux et al., 2004a; Rajas et al., 1999, 2000).

Glucose flux measurements

Rats in the postabsorptive state were anaesthetized with pentobarbital (70 mg/kg), fitted with catheters and infused with [$^3\text{-H}$] glucose as previously described (Croset et al., 2001; Mithieux et al., 2004a). After infusion for 10 min, a laparotomy was performed, the inferior mesenteric circulation was stopped by ligatures to exclude the blood flow coming from the cecum and the colon. After 90 min, a time where a steady state of glucose SA was obtained (Croset et al., 2001), blood was gently sampled simultaneously in the carotid artery and in the portal vein, using a catheter inserted into a superior mesenteric vein and pushed up to the junction with pancreaticoduodenal vein. Total EGP was obtained from the [$^3\text{-H}$] glucose infusion rate and the SA of arterial glucose (Croset et al., 2001; Mithieux et al., 2002). The FX represents the fraction of [$^3\text{-H}$] glucose removed by the SI. It was calculated as $\frac{([\text{^3-H}] \text{ glucose SA}_{\text{artery}} \times \text{glucose concentration}_{\text{artery}}) - ([\text{^3-H}] \text{ glucose SA}_{\text{ven}} \times \text{glucose concentration}_{\text{ven}})}{([\text{^3-H}] \text{ glucose SA}_{\text{artery}} \times \text{glucose concentration}_{\text{artery}})}$. The intestinal glucose uptake (IGU) was deduced from this FX, the arterial plasma glucose and the intestinal blood flow (IBF): $\text{IGU} = \text{IBF} \times \text{plasma glucose concentration}_{\text{artery}} \times \text{FX}$. The determination of IBF using radiolabeled microsphere technique was previously described (Croset et al., 2001). The intestinal glucose balance (IGB) is the net result of both the uptake and release of glucose by the SI. It was calculated from the difference between the arterial and venous glucose concentrations and IBF, as $\text{IGB} = \text{IBF} \times (\text{glucose concentration}_{\text{artery}} - \text{glucose concentration}_{\text{ven}})$. Finally, the intestinal glucose release (IGR) was derived from IGB and IGU by resolving: $\text{IGB} = \text{IGU} - \text{IGR}$.

All procedures used for determinations of plasma glucose, insulin, and glucose SA were described in detail previously (Croset et al., 2001; Mithieux et al., 2004a). Plasma CCK concentration was determined by radioimmunoassay after ethanol extraction, as previously described (Misizza et al., 1985). The crossreactivity of the antibody used with gastrin was less than 1%.

Studies in conscious animals

To equip them with indwelling catheters, rats were anaesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (70 mg/kg). In rats intended for infusions into portal blood, a laparotomy was performed. A polyethylene catheter was inserted into a superior mesenteric vein, pushed up to the junction with pancreaticoduodenal vein, and secured with biological glue. A passage under the skin up to the basis of the neck was done to recover the other end of the catheter, which was secured with a dacron mesh button tether (Harvard apparatus). In rats intended for inactivation of portal vein innervation, a gauze compress moistened with 80 μl of a solution of capsaicin (10 mg/ml) in water:ethanol:Tween 20 (8:1:1, vol/vol), was applied around the portal vein for 15 min at the time of surgery. In rats intended for infusions in peripheral blood, the indwelling catheter was inserted into the right jugular vein, and the other end recovered at the basis of the neck as above. After sewing up the incisions, rats were allowed to recover from surgery for one week with free access to SED and water. A solution of polyvinylpyrrolidone (7% (w/w) in saline, 200 μl) was infused each day to prevent coagulation.

In food intake experiments, 4 hr before the food consumption period, rats were placed into individual cages without food, with free access to water, and were infused with either saline or glucose (12 or 25 $\mu\text{mol/kg/min}$). At the time when the conditions of illumination changed (beginning of dark or light), they were given SED (or PED) for 3 hr while infusion was maintained. The latter time was supposed to match the transition from postprandial to postabsorptive period. The amount of food ingested was monitored at the end of this 3 hr time. Each rat was studied at least two to three times with either solution, infused in a random order. Mean values were first calculated for each solution in each rat taken individually. These values were then used

to calculate a mean value for each solution in each group, and to carry out statistical analysis.

To *c-fos* immunohistochemistry experiments, rats were infused under the same conditions as above, except that they were not given food when illumination changed. Infusions were prolonged for 2 additional hr before anesthesia and further brain postfixation (see below).

All protocols used in this work were performed according to the recommendations of our local animal ethics committee for animal experimentation.

c-fos immunohistochemistry

To allow valuable comparison with rats with portal infusions (see above), animals fed either on SED or PED were anesthetized 6 hr after removal of food. When portal vein denervation was involved, it was performed 7 days before the experiments as in the study relative to Figure 3. After anesthesia, rats were transcardially infused with ice-cold 0.9% saline for 10 min, followed by 4% paraformaldehyde in PBS (phosphate-buffered saline) infusion for 20 min. The brains were removed, postfixed in ice-cold 4% paraformaldehyde for 2 hr and cryoprotected in 30% sucrose in PBS for 2–3 days, at 4°C. They were then frozen and cut into 40 μ m coronal sections using a freezing cryostat. The sections were exposed to 0.3% hydrogen peroxide for 30 min. They were then preincubated in PBS containing 3% normal goat serum and 0.25% Triton (blocking solution) for 2 hr, and further incubated for 48 hr with rabbit polyclonal *c-fos* antiserum (1/20,000 dilution; Ab-5, Oncogene Sciences, San Diego, California) in blocking solution. Subsequently, the sections were incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgG diluted at 1/600 (Vector Laboratories, Burlingame, California) for 1 hr, and with streptavidin horseradish peroxidase for 30 min, both in blocking solution. *c-fos* expression was visualized for *fos*-like immunoreactivity (FLI) using diaminobenzidine and hydrogen peroxide. A BH2 microscope (Olympus Corp, Melville, New York) connected via a color video camera to a PC computer using the Imagenia 2000 software (Biocom, Les Ulis, France) was used for cell counting. Each stained section was screened for visualization of FLI in neurons. In the regions of interest, *fos*-positive nuclei were counted following the area outlined, on numerous sections and on both sides, according to The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates (Paxinos and Watson, 1998).

Supplemental data

Supplemental Data include one figure and can be found with this article online at <http://www.oxfordjournals.org/doi/full/10.1093/ajph/100.11.1981>.

Acknowledgments

The authors thank the INSERM and INRA for funding their work, and the CNRS (G.M., F.R.), INRA (A.G.-S.), INSERM (C.B., C.Z.) and University Paris 7 (C.M.) for funding their position. The authors declare there is no conflict of interest in relation to this work.

Received: May 4, 2005

Revised: August 1, 2005

Accepted: September 30, 2005

Published: November 8, 2005

References

Abbott, C.R., Monteiro, M., Small, C.J., Sajedi, A., Smith, K.L., Parkinson, J.R., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2005). The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY(3–36) and glucagon-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem-hypothalamic pathway. *Brain Res.* 1044, 127–131.

Adachi, A., Shimizu, N., Oomura, Y., and Kobashi, M. (1984). Convergence of hepatoportal glucose-sensitive afferent signals to glucose-sensitive units within the nucleus of the solitary tract. *Neurosci. Lett.* 46, 215–218.

Adibi, S.A. (2003). Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) in health and disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285, G779–G788.

Anand, B.K. (1961). Nervous regulation of food intake. *Planta Med.* 41, 677–708.

Backus, R.C., Rosenquist, G.L., Rogers, Q.R., Calam, J., and Morris, J.G. (1995). Elevation of plasma cholecystikinin (CCK) immunoreactivity by fat, protein, and amino acids in the rat, a carnivore. *Regul. Pept.* 57, 123–131.

Baird, J.P., Grill, H.J., and Kaplan, J.M. (1997). Intake suppression after hepatic portal glucose infusion: all-or-none effect and its temporal threshold. *Am. J. Physiol.* 272, R1454–R1460.

Barkeling, B., Rossner, S., and Bjorvell, H. (1990). Effects of a high-protein meal (meat) and a high-carbohydrate meal (vegetarian) on satiety measured by automated computerized monitoring of subsequent food intake, motivation to eat and food preferences. *Int. J. Obes.* 14, 743–751.

Batterham, R.L., Cowley, M.A., Small, C.J., Herzog, H., Cohen, M.A., Dakin, C.L., Wren, A.M., Brynes, A.E., Low, M.J., Ghatei, M.A., et al. (2002). Gut hormone PYY(3–36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 418, 650–654.

Battezzati, A., Caumo, A., Martino, F., Sereni, L.P., Coppa, J., Romito, R., Ammatuna, M., Regalia, E., Matthews, D.E., Mazzaferro, V., and Luzi, L. (2004). Nonhepatic glucose production in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286, E129–E135.

Blackshaw, L.A., Page, A.J., and Partoosedarso, E.R. (2000). Acute effects of capsaicin on gastrointestinal vagal afferents. *Neuroscience* 96, 407–416.

Boisjolyeux, B., Chanez, M., Azzout, B., and Peret, J. (1995). Comparison between starvation and consumption of a high protein diet: plasma insulin and glucagon and hepatic activities of gluconeogenic enzymes during the first 24 hours. *Diabetes Metab.* 12, 21–27.

Booth, D.A., Chase, A., and Campbell, A.T. (1970). Relative effectiveness of protein in the late stages of appetite suppression in man. *Physiol. Behav.* 5, 1299–1302.

Croset, M., Rajas, F., Zitoun, C., Hurot, J.M., Montano, S., and Mithieux, G. (2001). Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes* 50, 740–746.

Douglas, B.R., Jensen, J.B., de Jong, A.J., and Lamers, C.B. (1990). Effect of various triglycerides on plasma cholecystikinin levels in rats. *J. Nutr.* 120, 686–690.

Flier, J.S. (2004). Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116, 337–350.

Friedman, J.M. (2000). Obesity in the new millennium. *Nature* 404, 632–634.

Gautier-Stein, A., Mithieux, G., and Rajas, F. (2005). A distal region involving hepatocyte nuclear factor 4 α and CAAT/enhancer binding protein markedly potentiates the protein kinase A stimulation of the glucose-6-phosphatase promoter. *Mol. Endocrinol.* 19, 163–174.

Gevrey, J.C., Cordier-Bussat, M., Nemoz-Gaillard, E., Chayvialle, J.A., and Abello, J. (2002). Co-requirement of cyclic AMP- and calcium-dependent protein kinases for transcriptional activation of cholecystikinin gene by protein hydrolysates. *J. Biol. Chem.* 277, 22407–22413.

Gevrey, J.C., Malapel, M., Philippe, J., Mithieux, G., Chayvialle, J.A., Abello, J., Cordier-Bussat, M., and Nemoz-Gaillard, E. (2004). Protein hydrolysates stimulate proglucagon gene transcription in intestinal endocrine cells via two elements related to cyclic AMP response element. *Diabetologia* 47, 926–936.

Gutierrez-Juarez, R., Obici, S., and Rossetti, L. (2004). Melanocortin-independent effects of leptin on hepatic glucose fluxes. *J. Biol. Chem.* 279, 49704–49715.

Halatchev, I.G., and Cone, R.D. (2005). Peripheral administration of PYY3–36 produces conditioned taste aversion in mice. *Cell Metab.* 1, 159–168.

Hevener, A.L., Bergman, R.N., and Donovan, C.M. (2000). Portal vein afferents are critical for the sympathoadrenal responses to hypoglycemia. *Diabetes* 49, 8–12.

Holzer, P. (1991). Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol. Rev.* 43, 143–201.

Hopman, W.P., Jensen, J.B., and Lamers, C.B. (1985). Comparative study

of the effects of equal amounts of fat, protein, and starch on plasma cholecystokinin in man. *Scand. J. Gastroenterol.* 20, 843–847.

Jancso, G., Kiraly, E., and Jancso-Gabor, A. (1990). Direct evidence for an axonal site of action of capsaicin. *Naunyn-Schmiedberg Arch. Pharmacol.* 313, 91–94.

Jean, C., Fromentin, G., Tome, D., and Larue-Achagiotis, C. (2002). Wistar rats allowed to self-select macronutrients from weaning to maturity choose a high-protein, high-lipid diet. *Physiol. Behav.* 76, 65–73.

Jean, C., Rome, S., Mathe, V., Huneau, J.F., Aattouri, N., Fromentin, G., Achagiotis, C.L., and Tome, D. (2001). Metabolic evidence for adaptation to a high protein diet in rats. *J. Nutr.* 131, 91–98.

Langhans, W., Grossemann, F., and Geary, N. (2001). Intrameal hepatic-portal infusion of glucose reduces spontaneous meal size in rats. *Physiol. Behav.* 73, 499–507.

L'Heureux-Bouron, D., Tome, D., Bensaid, A., Morens, C., Gaudichon, C., and Fromentin, G. (2004). A very high 70% protein diet does not induce conditioned taste aversion in rats. *J. Nutr.* 134, 1512–1515.

Miazza, B., Palma, R., Lachance, J.R., Chayvialle, J.A., Jomard, R.P., and Modigliani, R. (1985). Jejunal secretory effect of intraduodenal food in humans. A comparison of mixed nutrients, proteins, lipids, and carbohydrates. *Gastroenterology* 88, 1215–1222.

Mithieux, G. (2001). New data and concepts on glutamine and glucose metabolism in the gut. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 4, 267–271.

Mithieux, G., Bady, I., Gautier, A., Crosset, M., Rajas, F., and Zitoun, C. (2004a). Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286, 370–375.

Mithieux, G., Guignot, L., Bordet, J.C., and Wiernsperger, N. (2002). Intra-hepatic mechanisms underlying the effect of metformin in decreasing basal glucose production in rats fed a high-fat diet. *Diabetes* 51, 139–143.

Mithieux, G., Rajas, F., and Gautier-Stein, A. (2004b). A novel role for glucose 6-phosphatase in the small intestine in the control of glucose homeostasis. *J. Biol. Chem.* 279, 44231–44234.

Moran, T.H. (2000). Cholecystokinin and satiety: current perspectives. *Nutrition* 16, 858–865.

Obici, S., Feng, Z., Arduini, A., Conti, R., and Rossetti, L. (2003). Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. *Nat. Med.* 9, 756–761.

Omura, Y., Kimura, K., Ooyama, H., Maeno, T., Iki, M., and Kuniyoshi, M. (1984). Reciprocal activities of the ventromedial and lateral hypothalamic areas of cats. *Science* 143, 484–485.

Paxinos, G., and Watson, C. (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Fifth Edition (London, UK: Academic Press).

Pedersen-Bjergaard, U., Host, U., Kelbæk, H., Schifter, S., Rehfeld, J.F., Faber, J., and Christensen, N.J. (1996). Influence of meal composition on

postprandial peripheral plasma concentrations of vasoactive peptides in man. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 56, 497–503.

Peters, J.H., McKay, B.M., Simasko, S.M., and Ritter, R.C. (2005). Leptin-induced satiation mediated by abdominal vagal afferents. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288, R879–R884.

Pocai, A., Obici, S., Schwartz, G.J., and Rossetti, L. (2005). A brain liver circuit regulates glucose homeostasis. *Cell Metab.* 1, 53–61.

Quinn, R.G., Wong, T.W., Magnuson, M.A., Shabb, J.B., and Granner, D.K. (1988). Identification of basal and cyclic AMP regulatory elements in the promoter of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol. Cell. Biol.* 8, 3467–3475.

Rajas, F., Bruni, N., Montano, S., Zitoun, C., and Mithieux, G. (1999). The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology* 117, 132–139.

Rajas, F., Crosset, M., Zitoun, C., Montano, S., and Mithieux, G. (2000). Induction of PEPCK gene expression in insulinopenia in rat small intestine. *Diabetes* 49, 1165–1168.

Rolls, B.J., Hetherington, M., and Burley, V.J. (1988). The specificity of satiety: the influence of foods of different macronutrient content on the development of satiety. *Physiol. Behav.* 43, 145–153.

Schmitt, M. (1973). Influences of hepatic portal receptors on hypothalamic feeding and satiety centers. *Am. J. Physiol.* 225, 1089–1095.

Schwartz, M.W., and Morton, G.J. (2002). Obesity: keeping hunger at bay. *Nature* 416, 595–597.

Shimizu, N., Oomura, Y., Novin, D., Grijalva, C.V., and Cooper, P.H. (1983). Functional correlations between lateral hypothalamic glucose-sensitive neurons and hepatic portal glucose-sensitive units in rat. *Brain Res.* 265, 49–54.

Sindelar, D.K., Chu, C.A., Neal, D.W., and Cherrington, A.D. (1997). Interaction of equal increments in arterial and portal vein insulin on hepatic glucose production in the dog. *Am. J. Physiol.* 273, E972–E980.

Thorens, B., and Larsen, P.J. (2004). Gut-derived signaling molecules and vagal afferents in the control of glucose and energy homeostasis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 7, 471–478.

Tordoff, M.G., and Friedman, M.I. (1986). Hepatic portal glucose infusions decrease food intake and increase food preference. *Am. J. Physiol.* 251, R192–R196.

Tordoff, M.G., Tluczek, J.P., and Friedman, M.I. (1989). Effect of hepatic portal glucose concentration on food intake and metabolism. *Am. J. Physiol.* 257, R1474–R1480.

Westertep-Plantenga, M.S. (2003). The significance of protein in food intake and body weight regulation. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 6, 635–638.

Zafra, M.A., Molina, F., and Puerto, A. (2004). Effects of perivagal administration of capsaicin on food intake in animals after noxious gastric surgery. *Auton. Neurosci.* 116, 84–88.

Article 2:

Protein feeding promotes redistribution of endogenous glucose production to the kidney and potentiates its suppression by insulin

Bruno Pillot, Maud Soty, Amandine Gautier-Stein, Carine Zitoun and Gilles Mithieux

Protein Feeding Promotes Redistribution of Endogenous Glucose Production to the Kidney and Potentiates Its Suppression by Insulin

Bruno Pillot,* Maud Soty,* Amandine Gautier-Stein, Carine Zitoun, and Gilles Mithieux

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 855 and Université de Lyon, Lyon F-69008, France, and Université Lyon 1, Villeurbanne F-69622, France

The aim of this study was to assess in rats the effect of protein feeding on the: 1) distribution of endogenous glucose production (EGP) among gluconeogenic organs, and 2) repercussion on the insulin sensitivity of glucose metabolism. We used gene expression analyses, a combination of glucose tracer dilution and arteriovenous balance to quantify specific organ release, and hyperinsulinemic euglycemic clamps to assess EGP and glucose uptake. Protein feeding promoted a dramatic induction of the main regulatory gluconeogenic genes (glucose-6 phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase) in the kidney, but not in the liver. As a consequence, the kidney glucose release was markedly increased, compared with rats fed a normal starch diet. Protein feeding ameliorated the suppression of EGP by insulin and the sparing of glycogen storage in the liver but had no effect on glucose uptake. Combined with the previously reported induction of gluconeogenesis in the small intestine, the present work strongly suggests that a redistribution of glucose production among gluconeogenic organs might occur upon protein feeding. This phenomenon is in keeping with the improvement of insulin sensitivity of EGP, most likely involving the hepatic site. These data shed a new light on the improvement of glucose tolerance, previously observed upon increasing the amount of protein in the diet, in type 2 diabetic patients. (*Endocrinology* 150: 616–624, 2009)

Insulin resistance is the hallmark of the so-called metabolic syndrome and of its associated pathology type 2 diabetes. Among various altered metabolic functions, increased endogenous glucose production (EGP) has long been recognized to be a crucial step in the metabolic staging of the illness from insulin resistance toward impaired glucose tolerance and further to diabetes (1, 2). Until recently it was considered that only the liver and kidney are capable of releasing glucose in blood because both are the only organs considered to express glucose-6 phosphatase (Glc6Pase), the key enzyme of glucose production. In contradiction to this dogma, we demonstrated that the small intestine (SI) is a third gluconeogenic organ, expressing Glc6Pase and other genes required for gluconeogenesis, and is able to contribute to EGP in the fasting situation and insulinopenic diabetes (3–6) (for review, see Ref. 7).

As a first analysis, one may suppose that the induction of glucose production in any of the three gluconeogenic organs, in

the postabsorptive state, should result in a global augmentation of EGP, thereby favoring a possible deleterious action on glucose homeostasis. However, previous data from our group have suggested that the reality is probably more complex. For instance, in insulin-resistant high-fat fed rats, we reported that the beneficial decreasing effect of the antidiabetic agent metformin on EGP takes place despite the concomitant appearance of a small component of glucose production by the intestine (8). Furthermore, the induction of gluconeogenesis in the SI of rats fed a protein-enriched diet (PED) does not correlate with any increase of EGP in these animals (9). This suggests that a compensatory decrease of the contribution of either the liver or the kidney to glucose production should occur in these situations. Actually, a decrease of glucose production principally taking place in the liver might be favored because of the well-known inhibitory effect of portal glucose on hepatic glucose release (10).

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170

Printed in U.S.A.

Copyright © 2009 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/en.2008-0601 Received April 25, 2008. Accepted September 30, 2008.

First Published Online October 9, 2008

* B.P. and M.S. contributed equally to the work.

Abbreviations: EGP, Endogenous glucose production; FX, fractional extraction; Glc6Pase, glucose-6 phosphatase; IGP, Intestinal glucose production; PED, protein-enriched diet; PEPCK, cytosolic phosphoenolpyruvate; PEPCK-c, cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase; RBF, renal blood flow; RGB, renal glucose balance; RGR, renal glucose release; RGU, renal glucose uptake; SA, specific activity; SED, starch-enriched diet; SI, small intestine.

High-protein feeding represents a special nutritional situation, deserving further characterization. It is well known that food protein ingestion may play an indirect beneficial role in glucose homeostasis, via the induction of satiety effects and weight loss in both animals and humans (11). We recently reported that the induction of intestinal gluconeogenesis, by way of the portal sensing of intestinal glucose released, and activation of the hypothalamic areas regulating energy homeostasis, is a mechanism by which food proteins induce the diminution of food intake in rats (9). Moreover, recent results also indicate that the parameters of glucose tolerance, including the level of glycated hemoglobin, are markedly improved in the short-term in type 2 diabetic patients after increasing the proportion of dietary proteins for a few weeks, independently of any effect on body weight (12, 13) (for review, see Ref. 14). However, over the long term, it is considered that the improvement of insulin sensitivity in diabetic patients is the result of weight loss (11). Given the importance of EGP in glucose homeostasis (1, 2), and possibly in the initiation of type 2 diabetes, we raised the question of the effect of protein feeding on both liver and kidney gluconeogenesis. To this aim we used gene expression analysis to evaluate whether protein act as a regulatory signal on gluconeogenic genes in both tissues, and a combination of glucose tracer dilution and arteriovenous glucose balance determination to evaluate whether this translates in glucose release by the targeted tissues (5, 9). It must be noted that gluconeogenesis may proceed from different precursors, e.g. alanine, lactate, glutamine, or glycerol, the utilization of which may vary according to the organ considered. Specific gluconeogenic pathway from these substrates could be quantified using relevant carbon-labeled precursors (5, 15). The question addressed herein (repartition of EGP among gluconeogenic organs) makes it relevant to use the tritiated glucose approach. Indeed, the latter allows one to quantify the whole glucose release from the organ considered, regardless of the precursor. In combination with these studies, we addressed the question of the effect of protein feeding on insulin sensitivity of both EGP and total glucose uptake, using the classical hyperinsulinemic euglycemic clamp approach (16).

Materials and Methods

Animals and diets

Seven-week-old male Sprague Dawley rats (Charles River, L'Arbresle, France), weighing about 230–250 g, were acclimated to our animal house under controlled temperature (22 C) and light (12-h light, 12-h dark) conditions, with free access to water and to a control starch-enriched diet (SED). The composition of the SED was as follows: starch (50%), protein (23.5%), lipids (4%), water (12%), mineral salts (5.5%), cellulose (4%), vitamins (1%), weight basis. The composition of the PED (isocaloric regarding the SED) was essentially the same with a modification of the starch/glucose to protein ratio, i.e. starch/glucose (23.5%) and protein (50%). Protein used was a mixture of soya protein and casein (50/50). Fasted rats ($n = 5$ per group) always had free access to water. PED-fed rats ($n = 8$) were switched on the PED for 3 d before studies. All experiments in fed rats were performed in the postabsorptive state, i.e. 6 h after food removal.

All protocols used in this work were performed according to the recommendations of our local animal ethics committee for animal experimentation.

Tissue sampling, metabolites, and gene expression analyses

Rats were anesthetized using an injection of pentobarbital (7 mg/100 g body weight). A laparotomy was performed to expose the liver and one kidney, which were rapidly removed and frozen using tongs previously chilled in liquid N_2 . The frozen tissues were kept at -80 C until use. They were powdered at the temperature of liquid N_2 and homogenized by ultrasonication in 10 mmol/liter HEPES, 0.25 mol/liter sucrose (pH 7.3) (9 vol/g tissue).

Glycogen was determined according to the method described by Bergmeyer and Gawehn (17). Glc6Pase activity was assayed at maximal velocity (20 mmol/liter glucose-6 phosphate) at 30 C, by complex formation of the phosphate produced. The contribution of nonspecific phosphatase activities was estimated through hydrolysis of β -glycerophosphate, as previously described (3). Cytosolic phosphoenolpyruvate (PEPCK) carboxykinase (PEPCK-c) activity was assayed under conditions of maximal velocity at 30 C in the 100,000 \times g supernatant of tissue homogenates, using the decarboxylation assay described by Rajas *et al.* (4) and Jomain-Baum and Schramm (18). Glutamine activity (π -dependent) was assayed in kidney homogenates under conditions of maximal velocity, according to previously described procedures (6, 19).

For Western blotting studies, 30 μ g protein was separated by electrophoresis in 9% polyacrylamide gels in the presence of sodium dodecyl sulfate. After electrotransfer to polyvinylidene fluoride immobilized membranes (Millipore Corp., Billerica, MA), immunodetection was performed using anti-Glc6Pase and anti-PEPCK (kindly provided by Dr. Granner, Vanderbilt University Medical School, Nashville, TN) antibodies at dilutions of 1:1500 and 1:7000, respectively (4, 20). Membranes were reblotted with anti- β -tubulin (use at 1:2000; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA.) for standardization.

Total RNA was extracted following the protocol described by Sambrook *et al.* (21). cDNA synthesis was performed from 500 ng mRNA using Moloney murine leukemia virus Reverse Transcriptase ribonuclease H Minus (Promega Corp., Charbonnières, France) and poly(deoxythymidine) oligonucleotides, incubated for 1 h at 40 C. Real-time PCR was performed using a LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). A standard curve was systematically generated with different amounts of a purified target cDNA fragment. Ribosomal protein rL19 transcript was used as a reference, and the results were expressed as a ratio referred to the expression of rL19. PCR was performed with a 1:100 dilution of the reverse transcription product in the Master SYBR Green I mixture (Roche Diagnostics) with specific primers (0.25 μ M final of each primer). The following specific primers used were: 5'-TTACGAAGACTCCAGGACTG-3' (sense) and 5'-TGACTATTACAGCAACAGCTC-3' (antisense) for the rat Glc6Pase, 5'-AGTGCCCTGTGGGAAAACCAA-3' (sense) and 5'-CACCATCTTCACCAACGTGGCT-3' (antisense) for the rat PEPCK, 5'-AGATTGACCGTCATATGTATCACA-3' (sense) and 5'-TCTAAGACCAAGGAAGCAGCAA-3' (antisense) for the rat L19, and 5'-GCACATTCCCTACCAAGT-3' (sense) and 5'-TCTTTCCTGGTCCATCAACC-3' (antisense) for the rat G6PC3.

Determination of kidney glucose fluxes

Anesthetized rats were fitted with polyethylene catheters inserted into the right jugular vein for 3^3H glucose infusion and into the left carotid artery for blood sampling, as previously described (5, 9). The body temperature was maintained at 37.5 C by a rectal probe-monitored heating blanket. Rats were infused for 90 min. In preliminary experiments we checked that a steady state of glucose-specific activity (SA) was obtained in the venous and arterial blood from 40–50 min and afterwards under our conditions of infusion. At the end of the infusion time, blood was sampled from the carotid artery and one renal vein simultaneously, as previously described (5, 9). Blood plasma was separated and used for determinations of glucose concentration and SA. Total EGP was calculated from the 3^3H glucose infusion rate and glucose SA (16). The fractional extraction (FX) of glucose was calculated as: $(3^3\text{H}]\text{glucose SA}_{\text{artery}} \times \text{glucose concentration}_{\text{artery}} - (3^3\text{H}]\text{glucose SA}_{\text{vein}} \times \text{glucose concentration}_{\text{vein}}) / (3^3\text{H}]\text{glucose SA}_{\text{artery}} \times \text{glucose con-}$

centration_{artery}). The renal glucose uptake (RGU) was deduced from this FX, the arterial plasma glucose and the renal blood flow (RBF), as: $RGU = RBF \times \text{plasma glucose concentration}_{\text{artery}} \times FX$. The determination of RBF using a radiolabeled microsphere technique was performed as previously described, from separate groups of rats (5). The RBFs determined were: 11.2 ± 0.8 , 9.4 ± 0.6 , 7.5 ± 1.0 , 8.19 ± 0.5 , 11.3 ± 1.0 ml/min in SED-fed, and 24-h, 48-h, 72-h fasted and PED-fed rats, respectively. The renal glucose balance (RGB) was calculated from the difference between arterial and renal glucose concentration and RBF, as: $RGB = RBF (\text{glucose concentration}_{\text{artery}} - \text{glucose concentration}_{\text{vein}})$. Finally, the renal glucose release (RGR) was deduced from RGB and RGU, using the equality $RGB = RGU - RGR$.

Determination of insulin effect on EGP and glucose utilization

PED and SED-fed rats were anesthetized using pentobarbital. Rats were equipped with catheters as described previously, in the left carotid artery for blood sampling and in the right jugular vein for infusion of $3[^3\text{H}]\text{glucose}$, of insulin at either 240 or 2880 pmol/h, and of glucose (1.67 mmol/liter) at an adapted rate to maintain euglycemia (8, 16, 20). Glycemia was monitored every 15 min with a glucometer (OneTouch Ultra; LifeScan, Inc., Milpitas, CA) to adapt the infusion of glucose if necessary. After 90 min infusion, a laparotomy was performed to remove a freeze-clamp liver lobe. A blood sample was taken for plasma insulin and glucose SA determinations. Plasma insulin was assayed using a RIA procedure with an ultrasensitive rat insulin ELISA kit (Crystal Chem Inc., Downers Grove, IL). The glucose appearance and disappearance rates were calculated from the $3[^3\text{H}]\text{glucose}$ SA data (8, 16, 20). EGP was calculated from the appearance rate by subtracting the exogenous glucose infusion rate.

Statistical analyses

Data are presented as means \pm SEM, and statistical analyses were performed using the Student's *t* tests (for paired or unpaired values as indicated). When appropriate, ANOVA tests were performed beforehand.

Results

Protein feeding stimulates gluconeogenesis gene expression in the kidney, but not in the liver

The Glc6Pase was increased about 2-fold in the kidney of PED-fed rats ($n = 5$), compared with SED-fed rats ($n = 5$). This took place at the level of mRNA, protein, and enzymatic activity assayed at the maximal velocity (Fig. 1, A–C). The induction of the PEPCK gene expression was even more marked. The PEPCK-c mRNA abundance was augmented by about 6-fold in the kidney of PED-fed rats compared with SED-fed rats (Fig. 1D). Similar increases at the protein and enzymatic activity levels were also observed (Fig. 1, E and F). Glutaminase activity was increased by 50% at the end point of maximal velocity (data not shown). A ubiquitously expressed nongluconeogenic Glc6Pase-related protein (called UGRP or G6PC3) is expressed in the kidney. No change was found in the kidney mRNA content of this protein in PED-fed rats compared with their SED-fed counterparts [2.9 ± 0.6 vs. 2.7 ± 0.5 Arbitrary Units (normalized with r119 mRNA abundance), means \pm SEM, $n = 5$], in agreement with previous results from others (22).

Unlike the results obtained in the kidney, no increase was noted either for the Glc6Pase or PEPCK in the liver of rats fed with the PED (Fig. 2). In keeping with the results at a protein

level, no change was observed at a mRNA level (data not shown). No change was observed in the hepatic triglyceride content in PED-fed rats compared with SED-fed rats (7.6 ± 0.7 vs. 6.2 ± 0.6 mg/g liver, respectively, means \pm SEM, $n = 5$).

Protein feeding markedly augments kidney glucose release

Next, we raised the question of the effect of PED-induced gluconeogenesis gene expression on glucose fluxes in the kidney. We used a combination of glucose tracer dilution analysis and arteriovenous glucose balance determination to separate the RGU and RGR, as previously used to quantify intestinal glucose fluxes (5, 9).

In SED-fed rats ($n = 5$), the $3[^3\text{H}]\text{glucose}$ SA was lower ($P < 0.05$) in the renal vein than in the artery ($\sim -3.5\%$), indicating that unlabeled glucose was released by the kidney (Table 1). However, the plasma glucose concentration was not different in the vein compared with the artery, suggesting that both kidney glucose release and uptake were comparable. Accordingly, from the FX and RBF (11.2 ± 0.7 ml/min, mean \pm SEM, $n = 4$), the RGR derived from the calculated RGB and RGU amounted to $12.5 \pm 1.9 \mu\text{mol/kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Table 1). This represented about 17% of total EGP.

Because a quantification of kidney glucose release has never been performed using this approach in fed and fasted rats, we characterized kidney glucose production along fasting. In 24-h fasted rats ($n = 5$), the decrease in glucose SA in the renal vein was greater ($P < 0.05$) than that in 6-h post-absorptive rats (-9.5%) (Table 1). As in fed rats, there was no difference in plasma glucose concentrations in the renal vein and the artery. However, the FX was higher ($P < 0.05$) than that in fed rats (Table 1). In line with this FX increase, the RGU and RGB calculated from these data and from the RBF (9.8 ± 1.5 ml/min), RGR was markedly higher ($P < 0.05$) in 24-h fasted rats than in SED-fed rats, *i.e.* $22.3 \pm 2.1 \mu\text{mol/kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. This represented about 50% of EGP, the latter being lower in fasted rats than fed rats, in agreement with previous data (5, 20). Similar results were obtained from rats fasted for a longer time, *i.e.* 48 and 72 h (Table 1). In agreement with the rapid increase in kidney glucose release in the fasting situation, we observed a marked increase (by about six times) of the renal PEPCK amount from 24 h fasting (data not shown). Moreover, we previously reported the induction of the renal Glc6Pase gene in the fasted state (23).

In PED-fed rats ($n = 8$), there was a decrease ($\sim -6.5\%$) in glucose SA between the artery and the renal vein ($P < 0.05$) (Table 1). Arterial plasma glucose concentration was higher ($+6\%$; $P < 0.05$) than the venous glucose concentration. The FX was close to zero and not different from that in SED-fed rats (Table 1). The RGR, derived from RGB and RGU, was equal to $28.2 \pm 4.5 \mu\text{mol/kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, *i.e.* 2-fold higher than that found in SED-fed rats ($P < 0.05$). This represented about 45% of total EGP, the latter being not significantly different than that in SED-fed rats (Table 1), in agreement with previous results (9).

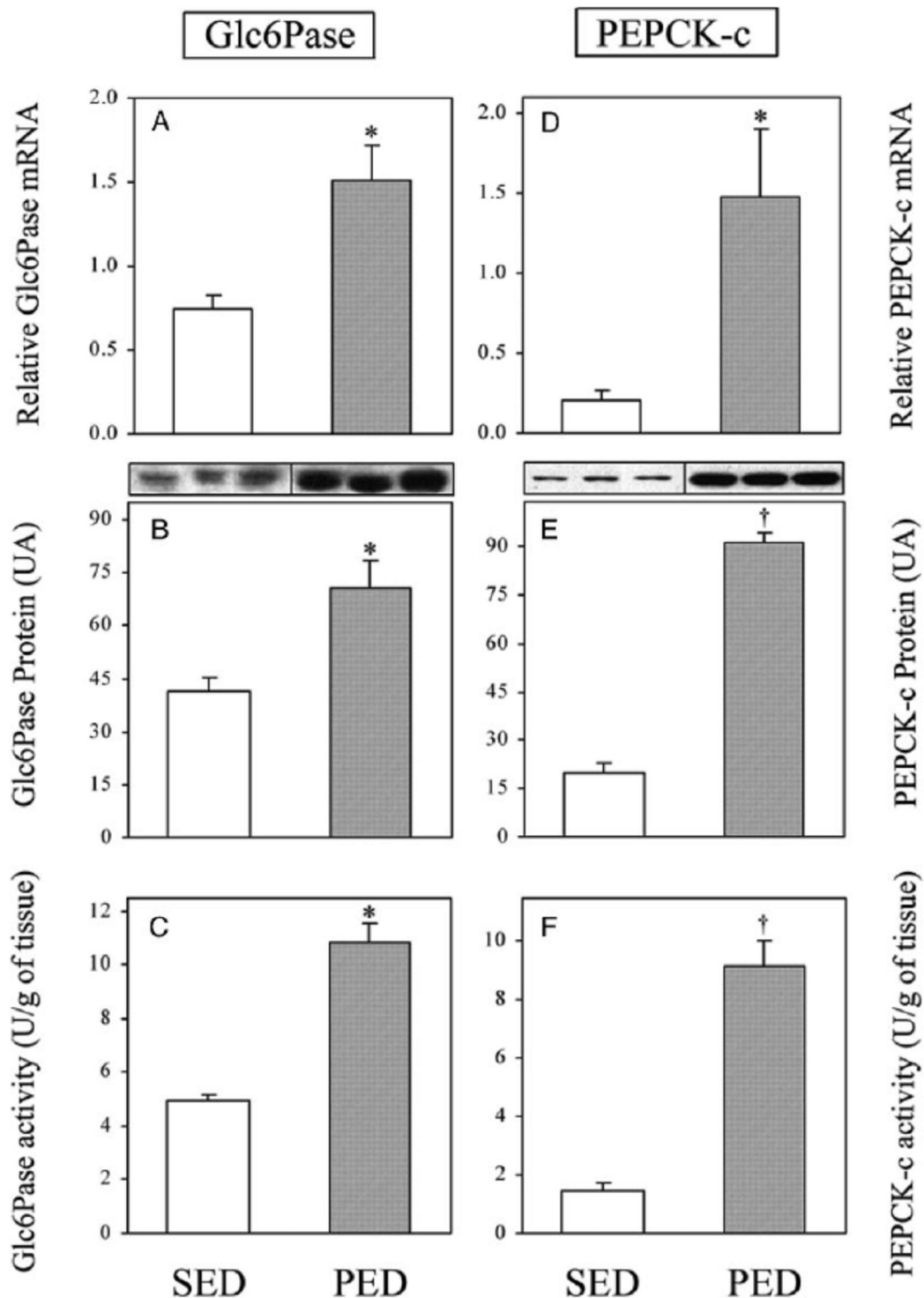


FIG. 1. Analysis of gluconeogenesis gene expression in the kidney of PED and SED-fed rats. A and D, Glc6Pase mRNA and PEPCK-c mRNA abundance, respectively, normalized with r19 mRNA abundance ($n = 4$). B and E, Densitometric Western blot analyses of Glc6Pase and PEPCK-c, respectively, obtained from five animals under each condition (*upper panels*, representative analysis from three animals in each group). C and F, Glc6Pase and PEPCK-c activity, respectively, assayed under maximal velocity condition ($n = 5$). Data are expressed as mean \pm SEM. *, †, Statistically different from SED value ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively, Student's *t* test for unpaired values).

Effect of insulin infusion on EGP and glucose utilization

We addressed the question of insulin action on both EGP and glucose utilization in rats fed the PED compared with those on the SED. A low dose of insulin (240 pmol/h) was previously

shown to partially inhibit EGP and a higher dose (2880 pmol/h) to obtain a maximal velocity of glucose utilization (16, 20, 24). There was no difference in basal EGP (saline infusion) in both groups (Fig. 3). EGP was suppressed by 25–30% by insulin in-

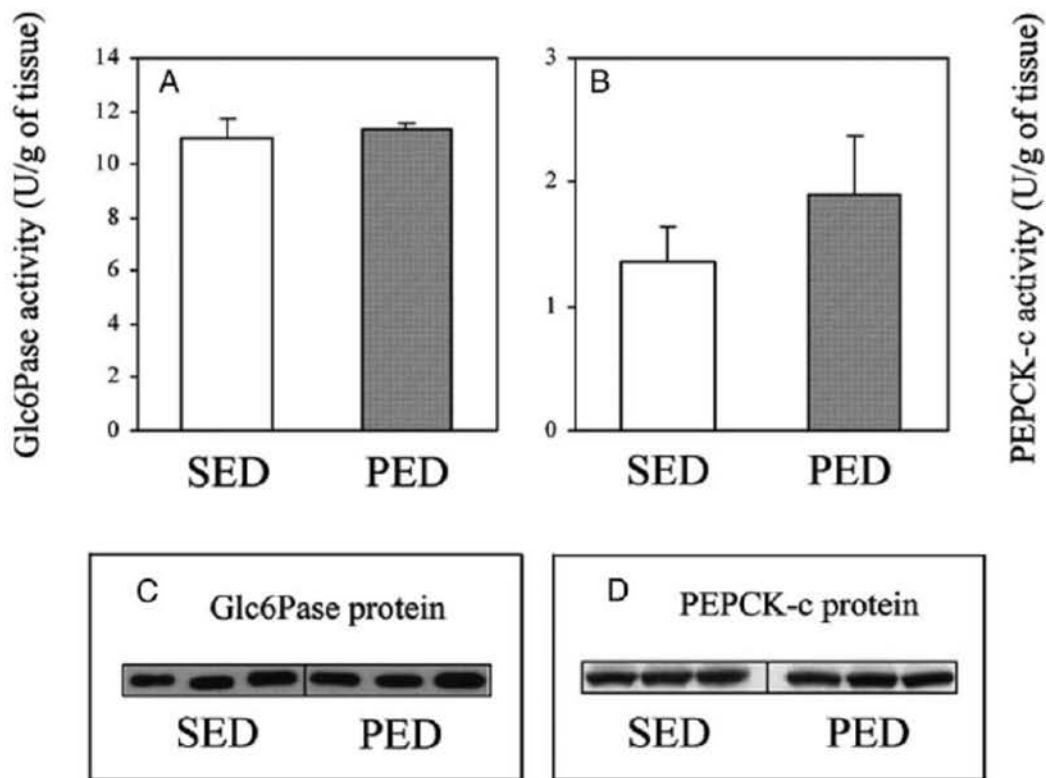


FIG. 2. Analysis of gluconeogenic enzyme activities in the liver of PED and SED-fed rats. A and B, Glc6Pase and PEPCK-c activity, assayed under conditions of maximal enzyme velocity (n = 5). Values are means ± SEM. C and D, Western blot analyses of Glc6Pase protein and PEPCK-c protein, respectively. Values are means ± SEM.

fusion (low dose) in rats fed the SED. The suppression was substantially stronger (~50%) in their counterparts fed the PED ($P < 0.05$ with regards to SED-fed rats). EGP was similarly suppressed (by at least 90%) in both groups of rats at the high-insulin dose (Fig. 3). There was no difference in glucose utilization at either dose of insulin infused. Plasma insulin levels at the end of clamp experiments were comparable in SED and PED-fed rats in either basal or insulin-infused conditions (Table 2).

Glycogen stores were studied in the liver of SED and PED-fed rats infused with 240 pmol/h at the end of the clamp experiment. The hepatic glycogen content was markedly higher in PED than SED-fed rats (18 ± 3.5 vs. 4.7 ± 3.2 mg/g wet liver; $P < 0.05$)

(Fig. 4). Glycogen was not detectable in the kidney of either groups of rats.

Discussion

The dysregulation of EGP is known to be a crucial alteration of glucose homeostasis, likely involved in the development of type 2 diabetes. However, the mechanisms regulating the release of glucose from the organs responsible for EGP are still poorly characterized, especially regarding their control in various nutritional states (6, 25). A recent study has reported that PEDs

TABLE 1. Renal glucose fluxes in SED-fed, fasted, and PED-fed rats

Diet/fast	$3[^3\text{H}]\text{glucose SA (dpm}/\mu\text{mol)}$		Glucose concentration (mmol/liter)		FX	$\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$			
	Artery	Vein	Artery	Vein		RGB	RGU	RGR	EGP
SED	39,647 ± 2,467	38,244 ± 2,330 ^a	8.6 ± 0.4	8.7 ± 0.4	0.02 ± 0.01	-6.3 ± 4.6	6.2 ± 3.2	12.5 ± 1.9	75.0 ± 4.9
Fasted									
24 h	39,748 ± 1,332	35,975 ± 1,296 ^a	5.5 ± 0.1	5.5 ± 0.1	0.09 ± 0.02 ^b	-1.8 ± 5.5	20.5 ± 5.4	22.3 ± 2.1 ^b	40.2 ± 1.4 ^c
48 h	43,080 ± 3,280	39,036 ± 3,008 ^a	6.0 ± 0.1	6.0 ± 0.1	0.08 ± 0.03 ^b	-1.8 ± 6.1	18.0 ± 5.9	19.8 ± 1.4 ^b	39.1 ± 1.6 ^c
72 h	40,673 ± 2,107	37,294 ± 2,093 ^a	7.3 ± 0.2	7.6 ± 0.2 ^a	0.04 ± 0.01	-13.2 ± 2.0	11.6 ± 2.5	24.8 ± 1.4 ^c	45.0 ± 2.3 ^c
PED	32,526 ± 873	30,255 ± 931 ^a	9.0 ± 0.3	9.6 ± 0.2 ^a	0.00 ± 0.02	-26.1 ± 6.3	2.1 ± 6.4	28.2 ± 4.5 ^b	63.3 ± 1.1

The results are expressed as means ± SEM (n = 5 for SED-fed and fasted rats; n = 8 for PED-fed rats).

^a Different from value in artery ($P < 0.01$, Student's two-tailed t test for paired values).

^b Different from value in SED-fed rats ($P < 0.05$, ANOVA test, followed by Student's t test for unpaired values).

^c Different from value in SED-fed rats ($P < 0.01$, ANOVA test, followed by Student's t test for unpaired values).

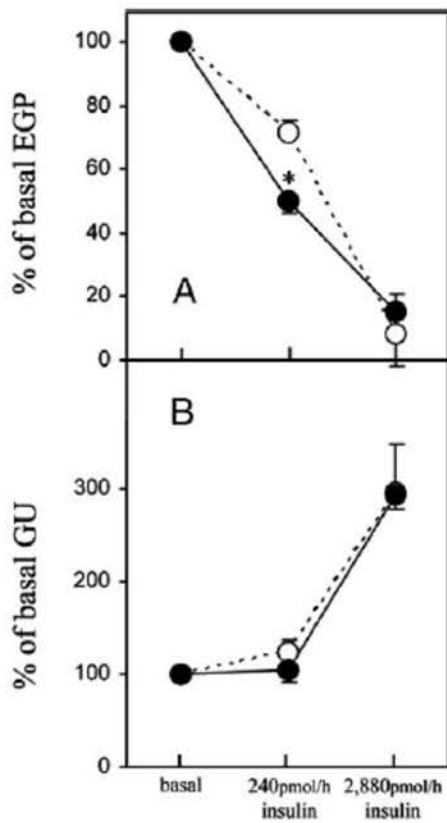


FIG. 3. Effect of insulin on glucose fluxes in SED (dotted line) and PED-fed (full line) rats maintained in euglycemia. A and B, EGP and glucose uptake (GU) were determined as described in the text. Basal EGP and glucose uptake were $75 \pm 2 \mu\text{mol/kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ and $80 \pm 5 \mu\text{mol/kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, in SED and PED-fed rats, respectively. Values are means \pm SEM. *, Statistically different from SED value ($P < 0.05$, Student's *t* test for unpaired values).

increase intestinal glucose release, without global variation of total glucose production. This has suggested a compensatory decrease of the contribution to EGP of at least one of the other gluconeogenic organs (*i.e.* the liver or kidney) (9). To study further this hypothesis, we characterized in this work the contribution of both the liver and kidney to glucose production under the same diet. To this aim we used both gene expression studies, and a combination of glucose tracer dilution and arteriovenous glucose balance determinations to quantify the organ glucose release.

We report herein that the rat kidney might contribute to a significant part of EGP (15–20%) in the postabsorptive state in rats fed a standard chow diet. Our results are in agreement with previous studies in fed postabsorptive dogs (26) and humans

TABLE 2. Plasma insulin concentration in SED-fed and PED-fed rats after a hyperinsulinemic euglycemic clamp

Insulin infusion rate (pmol/h)	Plasma insulin (pmol/liter)	
	SED	PED
0	204 \pm 26	291 \pm 54
240	895 \pm 203	922 \pm 66
2,880	16,907	17,463 \pm 1,868

Values are the means \pm SEM (n = 4).

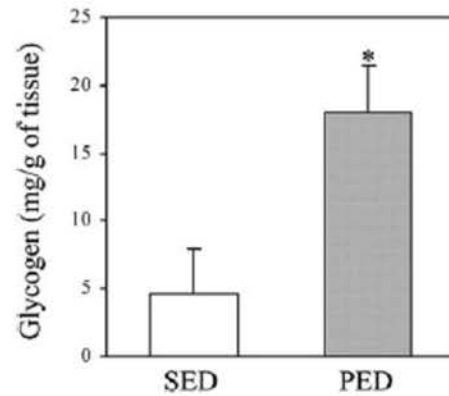


FIG. 4. Glycogen content in the liver of SED and PED-fed rats after a hyperinsulinemic euglycemic clamp performed with 240 pmol/h insulin (n = 4). Values are means \pm SEM. *, Statistically different from SED value ($P < 0.05$, Student's *t* test for unpaired values).

(27). Interestingly, the kidney glucose release rapidly increases during fasting and might contribute about one half of EGP after 24 h. This sustained production then plateaus if fasting is prolonged. It must be noted that a similar contribution of the kidney to EGP was previously reported in fasted rats, based on either a liver removal approach (28), or when kidney vessels were ligated (29), and in long-term fasted humans (30).

It should be noted that despite evidence for kidney glucose release in both the postabsorptive and fasted states, there is no alteration of the renal net glucose balance (but in PED-fed rats), and, therefore, no net increase in glycemia in blood exiting the kidney. Thus, one may legitimately ask the question of the usefulness of this glucose release for the whole body. This relevant question has been raised by Malcolm Watford (15) in a comprehensive critical analysis of our previous works related to gluconeogenesis in the gut, which exhibits the same characteristics. Both the SI and kidney exhibit the other common feature to be high glucose-consuming organs (27–29). Without their gluconeogenic capacity, the blood plasma glucose concentration would certainly be strongly decreased by passage across these organs. This would be detrimental to other tissues of the body. Therefore, that both the kidney and SI are able, via their regulated gluconeogenic function, to counterbalance the lowering of glycemia resulting from glucose utilization, is of major usefulness for systemic glucose homeostasis, especially during fasting.

It is obvious that a critical data set in the approach we used relates to the estimation of glucose SA in the artery and vein. This has previously been pointed out by us (5, 8) and others (15, 27, 31). Because of interindividual differences among rats, which may be complicated by the relative inaccuracy of radioactivity determination and the high blood flow, there is a large dispersion in the mean SA data. This may cast doubts about what data are analyzed and how, when significance is established from such dispersed data sets, as pointed out (15). Regarding this particular point, venous and arterial glucose is obtained from the same animal. Thus, statistical analyses may be performed using paired test analyses (5, 6, 8, 9). This allows one to evidence differences between arterial and venous glucose SA, even if the means are very close and obtained from variable data (Table 1), because the sense of variation is tested and not the mean (9). An additional

difficulty is that these small differences have to be multiplied or divided by other values (e.g. blood flow), which themselves are inaccurate, to be converted into glucose fluxes. Moreover, because the gold method microsphere technology necessarily introduces perturbations of the blood microcirculation, the blood flow cannot be determined in the rats infused with $3[{}^3\text{H}]\text{glucose}$. Thus, RBFs were determined in separate groups of animals, and a single mean value was used for all animals within a group. The resulting calculated glucose fluxes, thus, display large variations (5, 8, 15). As a related point, FX values sometimes are not different from zero, which is theoretically impossible for glucose-consuming organs. This problem has been encountered by us herein (Table 1) and in previous studies (5), and by others, which are renowned experts in the field (27, 31). As a consequence, even when differences in arterial and venous glucose SA are significant (and so attest of a release of glucose), the final calculated glucose fluxes constitute estimations and not, from a quantitative point of view, definitive values. It should be noted that we determined very comparable values of kidney and gut glucose fluxes from a vessel-ligating approach, which allowed us to free of the difficulties linked to the high blood flow and to the determination of arterial and venous glucose SA (29). An interesting observation relates to the higher glucose removal (as revealed from FX) in fasted rats compared with SED-fed rats (Table 1). The fasting state is characterized by increased lipolysis and proteolysis, which are both associated with increased acidosis and ammoniogenesis. This may warrant a higher metabolic demand for the kidney in fasted states compared with the fed states.

It must be mentioned that a recent study questioned both *in vitro* and *in vivo* the occurrence of the release of glucose by the SI in 72-h fasted rats (32). It was concluded that glutamine gluconeogenesis is undetectable in the SI of 72-h fasted rats. The *in vitro* approach involved a SI ring mixture composed of samples taken along the whole SI length (including the distal ileum), with the aim to mimic the *in vivo* structure of the SI (32). We previously highlighted that the ileum exhibits at best a very weak expression of the gluconeogenic enzymes with regards to the duodenum and proximal jejunum (3, 5). This experimental choice could result in a high proportion of glucose-consuming cells, making it possible *in vitro* a reuse of glucose potentially produced. Despite this possible reuse, a glucose production, considered as “very small” by the authors, was detected after incubation in the presence of glutamine (by enzymatic determination) (32). This is in agreement with previous data from numerous *in vitro* studies reporting glucose production from either jejunal mucosa or perfused intestines obtained from rodents or humans (33–36). However, ${}^{13}\text{C}$ -glucose was not detected after incubation of the SI ring mixture with ${}^{13}\text{C}$ -glutamine, using a ${}^{13}\text{C}$ -nuclear magnetic resonance approach (32). Because of the necessity of a sophisticated treatment of the ${}^{13}\text{C}$ -nuclear magnetic resonance signal, to eliminate the background noise, it is known that a weakness of the approach is its low capacity to detect low concentrations of ${}^{13}\text{C}$ -metabolites. This may explain the discrepancy with the detection of glucose by the enzymatic method. In the *in vivo* study, the authors failed to evidence a net glucose release. They even observed a significant net glucose extraction, *i.e.* the portal vein glucose concentration was lowered compared

with the arterial one. This was interpreted as a discrepancy with our net glucose balance data: we measured a net balance equal to zero, *i.e.* plasma glucose concentrations were the same in the portal vein and the artery in 72-h fasted rats (6). This slight discrepancy could be explained as follows. To optimize the determination of tracer dilution and, thus, of intestinal glucose release, we removed the blood flow irrigating the large intestine by ligaturing the related vessels (5, 6). The latter exhibits the capacity of glucose utilization, but not that of glucose production (3). Another choice was done in Ref. 32, *i.e.* to not remove this blood from the determinations. As a consequence, the capacity of glucose utilization of the gut system studied in Ref. 32 was higher than that we studied (6). This may warrant why a net glucose extraction by the SI was observed in Ref. 32, and not in Ref. 6. It is well known that the metabolic complexity of the SI makes it able to either use or produce glucose, sometimes simultaneously (for reviews, see Refs. 7 and 36). A similar reasoning may be applied to glutamine and various precursors (36). Therefore, reasoning about the utilization and release of glucose in the SI (a comparable rationale may be applied to the kidney) cannot be based solely on net glucose balance determinations. It definitively requires the separation of the actual uptake and the actual production of glucose, which is possible by combining net balance determination and tracer dilution (see herein and Refs. 5 and 9). This was not performed in the study by Martin *et al.* (32). Moreover, we previously showed that a net glucose uptake is quite compatible with the occurrence of a glucose release, *e.g.* in the SI of 48-h fasted rats (5).

Despite the limitations of our approach, we here report that kidney glucose release of PED-fed rats is increased and might account (with the cautions exposed previously) for about 45% of EGP in the postabsorptive state. Moreover, this results in a small net glucose release. In agreement with this result, the mRNA expression and the activity of renal gluconeogenic enzymes (PEPCK, Glc6Pase) are dramatically increased in PED-fed rats compared with SED-fed rats (results of Fig 1). In contrast, the protein activities of hepatic PEPCK and Glc6Pase measured at maximal velocity are not modified by the PED. We recently reported in rats that the same PED induces intestinal glucose production (IGP) by increasing the activities of gluconeogenic enzymes (9). In this previous work, we estimated that IGP might account for about 20% of EGP in PED-fed rats. Moreover, EGP was altered by PED in neither the previous nor the current study. Together, our data suggest that protein feeding induces redistribution of glucose fluxes among gluconeogenic organs. Because both RGP and IGP are induced without global increase of EGP, this suggests a blunting of liver glucose production. By combining RGP to IGP, one might infer that the production of glucose by the liver might represent less than 50% of EGP in PED-fed rats. This might appear unlikely because the liver is generally considered as the main glucose-producing organ of the body in the postabsorptive situation (1, 2). However, one must keep in mind that in another special situation, *e.g.* long-term fasting (72 h in the rat), the same inference could be made, as we previously suggested that the SI glucose release might possibly account for about one third of EGP (6, 7) (Table 1). Obviously, these assumptions should be regarded in light of the cautions about ac-

curacy exposed previously. However, arguing for a minor role of the liver in long-term fasting, we previously reported that hepatic Glc6Pase gene decreases from 48 h fasting, which is associated with a marked rebound of their glycogen stores (37, 38). Interestingly, we observed in separate unpublished studies that the hepatic glycogen stores are higher ($P < 0.05$) in the liver of PED-fed rats than SED-fed rats (36 ± 3 vs. 26 ± 2 mg/g liver, means \pm SEM, $n = 4$). Thus, the blunting of hepatic glucose release might occur and benefit of hepatic glycogen storage in PED-fed rats as in long-term fasting rats. It must be mentioned that a recent study dealt with the effect of protein feeding on gluconeogenic genes in the liver, kidney, and SI in the rat. The respective tissue mRNA contents of PEPCK, Glc6Pase, and G6PC3 [a ubiquitous Glc6Pase-related protein, known to be nongluconeogenic (39)] were studied. Interestingly, PEPCK and Glc6Pase mRNA contents were higher in the SI of high-protein fed rats than in the SI of low-protein fed rats, and the glycogen content was also higher in the liver of overnight-fasted high-protein fed rats (22). Both observations corroborate our own data (see herein and Ref. 9).

We then raised the question to know whether a PED may improve insulin sensitivity in rats. We chose to perform hyperinsulinemic euglycemic clamp. This is the gold method, compared with glucose and/or insulin tolerance tests, because it allows us to assess insulin sensitivity, separating the effect on either production or utilization of glucose. We demonstrate that protein feeding markedly ameliorates the suppression of EGP by insulin (results of Fig. 3 and Table 2), whereas having no effect on peripheral glucose uptake. Gluconeogenesis is considered less sensitive to inhibition by insulin than glycogenolysis. Thus, one may hypothesize that the improvement of insulin suppression of EGP in PED-fed rats might mainly concern the glycogenolysis pathway. In keeping with this proposal, hepatic glycogen stores are higher in PED-fed rats at the end of the clamp experiments compared with SED-fed rats (results of Fig. 4). The liver is a main contributor to glucose production in various situations and the sole among gluconeogenic tissues to be capable of glycogen storage. Therefore, it is likely that the improvement of insulin sensitivity of liver glycogenolysis should have major beneficial effects on glucose homeostasis, not only in rats but also in normal and/or insulin-resistant human subjects. As a related point, recent human studies show that protein feeding in type 2 diabetic patients markedly improves glucose tolerance (12–14). Conversely, impaired liver glycogen storage due to uncurbed hepatic glycogenolysis has been a key feature involved in the anomalies of regulation of EGP in type 2 diabetic patients (40).

Including our results herein, there now exists a body of arguments arguing for the beneficial effects of food protein in glucose homeostasis in obese and diabetic patients. We previously reported in the rat that protein diet induces glucose release by the intestine, initiating satiety signals to the brain (9). This is in line with the satiety effects induced by food protein in humans (11). Moreover, it is known that the presence of glucose and insulin in the portal blood is necessary and sufficient to suppress hepatic glucose release and promote glycogen storage (10, 20). This is in agreement with our results of a blunting of glucose production in the liver on the benefit of the two other gluconeogenic tissues.

This is also in keeping with the improvement of the suppression of EGP and the promotion of hepatic glycogen storage by insulin reported herein. Finally, our results might explain at least in part the rapid and spectacular improvement of glucose homeostasis observed in type 2 diabetic patients, upon increasing the proportion of protein in their diet (12–14).

In conclusion, we have better defined here the mechanisms regulating EGP under the specific nutritional condition that represents a protein-rich diet. Our results highlight the key importance of a redistribution of glucose production among gluconeogenic organs in the improvement of glucose homeostasis. Thus, targeting specific sites of gluconeogenesis either by pharmaceutical or nutritional approaches might constitute an attractive approach to correct the defaults of glucose metabolism in type 2 diabetic patients.

Acknowledgments

We thank Jean-Claude Bordet for his advice in statistical studies, and Fabienne Rajas, Martine Begeot, and Danielle Naville for precious help in the preparation of the manuscript. We are grateful to Dr. Granner for providing the cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase antibody.

Address all correspondence and requests for reprints to: Gilles Mithieux, Faculté de médecine Laennec, rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon cedex 8, France. E-mail: mithieux@sante.univ-lyon1.fr.

B.P. is the recipient of a grant from the Institute Appert and of the Société Française de Nutrition, and M.S. of a doctoral fellowship from the French "Ministère de la Recherche et de l'Enseignement supérieur."

Disclosure Statement: The authors have nothing to disclose.

References

- Granner DK, O'Brien RM 1992 Molecular physiology and genetics of NIDDM. Importance of metabolic staging. *Diabetes Care* 15:369–395
- Ferrannini E, Groop LC 1989 Hepatic glucose production in insulin-resistant states. *Diabetes Metab Rev* 5:711–726
- Rajas F, Bruni N, Montano S, Zitoun C, Mithieux G 1999 The glucose-6-phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology* 117:132–139
- Rajas F, Croset M, Zitoun C, Montano S, Mithieux G 2000 Induction of PEPCK gene expression in insulinopenia in rat small intestine. *Diabetes* 49:1165–1168
- Croset M, Rajas F, Zitoun C, Hurot JM, Montano S, Mithieux G 2001 Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes* 50:740–746
- Mithieux G, Bady I, Gautier A, Croset M, Rajas F, Zitoun C 2004 Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E370–E375
- Mithieux G, Rajas F, Gautier-Stein A 2004 A novel role for glucose 6-phosphatase in the small intestine in the control of glucose homeostasis. *J Biol Chem* 279:44231–44234
- Mithieux G, Rajas F, Zitoun C 2006 Glucose utilization is suppressed in the gut of insulin-resistant high fat-fed rats and is restored by metformin. *Biochem Pharmacol* 72:198–203
- Mithieux G, Misery P, Magnan C, Pillot B, Gautier-Stein A, Bernard C, Rajas F, Zitoun C 2005 Portal sensing of intestinal gluconeogenesis is a mechanistic link in the diminution of food intake induced by diet protein. *Cell Metab* 2:321–329
- Sindelar DK, Chu CA, Neal DW, Cherrington AD 1997 Interaction of equal increments in arterial and portal vein insulin on hepatic glucose production in the dog. *Am J Physiol* 273(5 Pt 1):E972–E980
- Westerterp-Plantenga MS 2003 The significance of protein in food intake and body weight regulation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 6:635–638

12. Gannon MC, Nuttall FQ, Saeed A, Jordan K, Hoover H 2003 An increase in dietary protein improves the blood glucose response in persons with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 78:734–741
13. Gannon MC, Nuttall FQ 2004 Effect of a high-protein, low-carbohydrate diet on blood glucose control in people with type 2 diabetes. *Diabetes* 53:2375–2382
14. Nuttall FQ, Gannon MC 2004 Metabolic response of people with type 2 diabetes to a high protein diet. *Nutr Metab (Lond)* 1:6
15. Watford M 2005 Is the small intestine a gluconeogenic organ. *Nutr Rev* 63:356–360
16. Mithieux G, Guignot L, Bordet JC, Wiernsperger N 2002 Intrahepatic mechanisms underlying the effect of metformin in decreasing basal glucose production in rats fed a high-fat diet. *Diabetes* 51:139–143
17. Keppler D, Decker K 1974 In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of enzymatic analysis*. Vol 3. New York: VCH Publishers; 1127–1131
18. Jomain-Baum M, Schramm VL 1978 Kinetic mechanism of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) from rat liver cytosol. Product inhibition, isotope exchange at equilibrium, and partial reactions. *J Biol Chem* 253:3648–3659
19. Passonneau J, Lowry OH 1993 Specific methods and procedures. In: Passonneau J, ed. *Enzymatic analysis. A practical guide*. Totowa, NJ: Humana; 260–261
20. Guignot L, Mithieux G 1999 Mechanisms by which insulin, associated or not with glucose, may inhibit hepatic glucose production in the rat. *Am J Physiol* 277(6 Pt 1):E984–E989
21. Sambrook J, Frittsch EF, Maniatis T 1989 *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
22. Azzout-Marniche D, Gaudichon C, Blouet C, Bos C, Mathé V, Huneau JF, Tomé D 2007 Liver gluconeogenesis: a pathway to cope with postprandial amino acid excess in high-protein fed rats? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:1400–1407
23. Mithieux G, Vidal H, Zitoun C, Bruni N, Daniele N, Minassian C 1996 Glucose-6-phosphatase mRNA and activity are increased to the same extent in kidney and liver of diabetic rats. *Diabetes* 45:891–896
24. Minassian C, Daniele N, Bordet JC, Zitoun C, Mithieux G 1995 Liver glucose-6 phosphatase activity is inhibited by refeeding in rats. *J Nutr* 125:2727–2732
25. Mithieux G 2005 The new functions of the gut in the control of glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8:445–449
26. Adroque HJ 1992 Glucose homeostasis and the kidney. *Kidney Int* 42:1266–1282
27. Moller N, Rizza RA, Ford GC, Nair KS 2001 Assessment of postabsorptive renal glucose metabolism in humans with multiple glucose tracers. *Diabetes* 50:747–751
28. Kida K, Nakajo S, Kamiya F, Toyama Y, Nishio T, Nakagawa H 1978 Renal net glucose release in vivo and its contribution to blood glucose in rats. *J Clin Invest* 62:721–726
29. Mithieux G, Gautier-Stein A, Rajas F, Zitoun C 2006 Contribution of intestine and kidney to glucose fluxes in different nutritional states in rat. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 143:195–200
30. Owen OE, Felig P, Morgan AP, Wahren J, Cahill Jr GF 1969 Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. *J Clin Invest* 48:574–583
31. Ekberg K, Landau BR, Wajngot A, Chandramouli V, Efenidie S, Brunengraber H, Wahren J 1999 Contributions by kidney and liver to glucose production in the postabsorptive state and after 60 h of fasting. *Diabetes* 48:292–298
32. Martin G, Ferrier B, Conjard A, Martin M, Nazaret R, Boghossian M, Saadé F, Mancuso C, Durozard D, Baverel G 2007 Glutamine gluconeogenesis in the small intestine of 72 h-fasted adult rats is undetectable. *Biochem J* 401:465–473
33. Anderson JW, Rosendall AF 1973 Gluconeogenesis in jejunal mucosa of guinea pig. *Biochim Biophys Acta* 304:384–388
34. Ginsburg V, Hers HG 1960 On the conversion of fructose to glucose by guinea pig intestine. *Biochim Biophys Acta* 38:427–434
35. White LW, Landau BR 1965 Sugar transport and fructose metabolism in human intestine in vitro. *J Clin Invest* 44:1200–1213
36. Windmueller HG 1984 Metabolism of vascular glutamine by intestinal mucosa in vivo. In: Häussinger H, Sies D, eds. *Glutamine metabolism in mammalian tissues*. Berlin: Springer-Verlag; 61–77
37. Minassian C, Ajzannay A, Riou JP, Mithieux G 1994 Investigation of the mechanism of glycogen rebound in the liver of 72-hour fasted rats. *J Biol Chem* 269:16585–16588
38. Minassian C, Zitoun C, Mithieux G 1996 Differential time course of liver and kidney glucose-6-phosphatase activity during long-term fasting in rat correlates with differential time course of messenger RNA level. *Mol Cell Biochem* 155:37–41
39. Wang Y, Oeser JK, Yang C, Sarkar S, Hackl SI, Hasty AH, McGuinness OP, Pardee W, Hutton JC, Powell DR, O'Brien RM 2006 Deletion of the gene encoding the ubiquitously expressed glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein (UGRP)/glucose-6-phosphatase catalytic subunit- β results in lowered plasma cholesterol and elevated glucagon. *J Biol Chem* 281:39982–39989
40. Magnusson I, Rothman DL, Katz LD, Shulman RG, Shulman GI 1992 Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A ^{13}C nuclear magnetic resonance study. *J Clin Invest* 90:1323–1327

REFERENCES

- Abbott C. R., Monteiro M., Small C. J., Sajedi A., Smith K. L., Parkinson J. R., Ghatei M. A. & Bloom S. R. : The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY(3-36) and glucagon-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem-hypothalamic pathway. *Brain Res* 2005 ; 1044:127-31
- Adachi A. Electrophysiological study of hepatic vagal projection to the medulla. *Neurosci Lett.* 1981 ; 24(1):19-23
- Adachi A., Shimizu N., Oomura Y., Kobashi M. : Convergence of hepatoportal glucose-sensitive afferent signals to glucose-sensitive units within the nucleus of the solitary tract. *Neurosci Lett* 1984 ; 46(2):215-8
- Agati J.M., Yeagley D., Quinn P.G. : Assessment of the roles of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B, and protein kinase C in insulin inhibition of cAMP-induced phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. *J Biol Chem* 1998 ; 273(30):18751-9
- Ahima R.S., Prabakaran D., Mantzoros C., Qu D., Lowell B., Maratos-Flier E., Flier J.S. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature.* 1996 ; 382(6588):250-2
- Ahren, B; Taborsky, G; Porte, D. Neuropeptidergic versus cholinergic and adrenergic regulation of islet hormone secretion. *Diabetologia.* 1986;29:827-836.
- Ahrén B., Gudbjartsson T., Al-Amin A.N., Mårtensson H., Myrsén-Axcrona U., Karlsson S., Mulder H., Sundler F. Islet perturbations in rats fed a high-fat diet. *Pancreas.* 1999 Jan;18(1):75-83
- Aja S., Sahandy S., Ladenheim E.E., Schwartz G.J., Moran T.H. : Intracerebroventricular CART peptide reduces food intake and alters motor behaviour at a hindbrain site. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001 ; 281:R1862-7
- Akabayashi A., Koenig J.I., Watanabe Y., Alexander J.T., Leibowitz S.F. : Galanin-containing neurons in the paraventricular nucleus: a neurochemical marker for fat ingestion and body weight gain. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1994 ; 91(22):10375-9
- Al-Arabi A., Andrews J.F. : Thyrotropin releasing hormone (TRH) potentiates the metabolic effect of norepinephrine (NE) in warm-acclimated lean and obese rats. *Biochem Sci Instrum* 2003 ; 39:547-53
- Allen J. M., Fitzpatrick M. L., Yeats J. C., Darcy K., Adrian T. E., Bloom S. R. : Effects of peptide YY and neuropeptide Y on gastric emptying in man. *Digestion* 1984 ; 30:255-62
- Almind K, Bjorbaek C., Vestergaard H., Hansen T., Echwald S., Pedersen O. : Aminoacid polymorphisms of insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependant diabetes mellitus. *Lancet* 1993 ; 342(8875):828-32
- Alon T. and Friedman J.M. : Late-onset leanness in mice with targeted ablation of melanin concentrating hormone neurones. *J Neurosci* 2006 ; 26:389-97
- Anand B.K., Brobeck J.R. Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1951 ; 77(2):323-4
- Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR, Carling D, Small CJ. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem.* 2004 ; 279(13):12005-8
- Andreelli F., Foretz M., Knauf C., Cani P.D., Perrin C., Iglesias M.A., Pillot B., Bado A., Tronche F., Mithieux G., Vaulont S., Burcelin R., Viollet B. Liver adenosine monophosphate-activated kinase- α 2 catalytic subunit is a key target for the control of hepatic glucose production by adiponectin and leptin but not insulin. *Endocrinology.* 2006 May;147(5):2432-41
- Andrews R. C. and Walker B. R. : Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. *Clin Sci (Lond)* 1999 ; 96(5):513-23
- Appleyard S.M., Bailey T.W., Doyle M.W., Jin Y.H., Smart J.L., Low M.J., Andresen M.C. : Proopiomelanocortin neurons in nucleus tractus solitarius are activated by visceral afferents: regulation by cholecystokinin and opioids. *J Neurosci* 2005 ; 25(14):3578-85

- Arion W.J., Wallin B.K., Lange A.J., Ballas L.M. On the involvement of a glucose 6-phosphate transport system in the function of microsomal glucose 6-phosphatase. *Mol Cell Biochem.* 1975 ; 6(2):75-83
- Arion W.J., Lange A.J., Walls H.E., Ballas L.M. Evidence for the participation of independent translocation for phosphate and glucose 6-phosphate in the microsomal glucose-6-phosphatase system. Interactions of the system with orthophosphate, inorganic pyrophosphate, and carbamyl phosphate. *J Biol Chem.* 1980 ; 255(21):10396-406
- Ashmore J., Hastings A.B., Nesbett F.B., Renold A.E. Studies on carbohydrate metabolism in rat liver slices. VI. Hormonal factors influencing glucose-6-phosphatase. *J Biol Chem.* 1956 ; 218(1):77-88
- Auwerx J., Staels B. Leptin. *Lancet.* 1998 ; 351(9104):737-42
- Bady I., Zitoun C., Guignot L., Mithieux G. : Activation of liver G-6-Pase in response to insulin-induced hypoglycemia or epinephrine infusion in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002 ; 282(4):E905-10
- Bagnol D., Lu X.Y., Kaelin C.B., Day H.E., Ollmann M., Gantz I., Akil H., Barsh G.S., Watson S.J. : Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *J Neurosci* 1999 ; 19:1-7
- Barkeling B., Rössner S., Björvell H. : Effects of a high-protein meal (meat) and a high-carbohydrate meal (vegetarian) on satiety measured by automated computerized monitoring of subsequent food intake, motivation to eat and food preferences. *Int J Obes* 1990 ; 14(9):743-51
- Barzilai N., She L., Liu B.Q., Vuguin P., Cohen P., Wang J., Rossetti L. Surgical removal of visceral fat reverses hepatic insulin resistance. *Diabetes.* 1999 Jan;48(1):94-8
- Batterham R.L., Cowley M.A., Small C.J., Herzog H., Cohen M.A., Dakin C.L., Wren A.M., Brynes A.E., Low M.J., Ghatei M.A., Cone R.D., Bloom S.R. : Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 2002 418:650-4
- Batterham R.L., Cohen M.A., Ellis S.M., Le Roux C.W., Withers D.J., Frost G.S. : Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY (3-36). *N Engl J Med* 2003 ; 349:941-8
- Batterham R.L., Heffron H., Kapoor S., Chivers J.E., Chandarana K., Herzog H., Le Roux C.W., Thomas E.L., Bell J.D., Withers D.J. : Critical role for peptide YY in protein-mediated satiation and body-weight regulation. *Cell Metab* 2006 ; 4(3):223-33
- Battezzati A., Caumo A., Martino F., Sereni L.P., Coppa J., Romito R., Ammatuna M., Regalia E., Matthews D.E., Mazzaferro V., Luzi L. : Nonhepatic glucose production in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004 ; 286(1):E129-35
- Becskei C., Lutz T.A., Riediger T. : Glucose reverses fasting-induced activation in the arcuate nucleus of mice. *Neuroreport* 2008 ; 19(1):105-9
- Bellinger L.L., Williams F.E., Bernardis L.L. Effect of hypophysectomy, thyroidectomy, castration and adrenalectomy on diurnal food and water intake in rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1979 ; 161(2):162-6
- Benoit S.C., Air E.L., Coolen L.M., Strauss R., Jackman A., Clegg D.J., Seeley R.J., Woods S.C. : The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci* 2002 ; 22(20):9048-52
- Bernard C. : Sur une nouvelle fonction du foie chez l'Homme et les animaux. *Compte-Rendu, Académie des Sciences, Paris* 1850 ; 31:571-74
- Bernard C. : Sur le mécanisme physiologique de la formation de sucre dans le foie. *Compte-Rendu, Académie des Sciences, Paris* 1850 ; 44:578-86
- Bernard C. : Leçons sur le diabète et la glycogénie animale. Paris J.B. Baillière 1877 ; p.576

- Bernardis L.L., Bellinger L.L. The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update. *Brain Res.* 1987 ; 434(3):321-81
- Bernardis L.L., Bellinger L.L. The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* 1996 ; 20(2):189-287
- Bertile F., Raclot T. The melanocortin system during fasting. *Peptides* 2005 ; 27(2):291-300
- Bewick G.A., Gardiner J.V., Dhillon W.S., Kent A.S., White N.E., Webster Z., Ghatei M.A., Bloom S.R. Post-embryonic ablation of AgRP neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype. *FASEB J.* 2005 ; 19(12):1680-2
- Bicknell A.B., Lomthaisong K., Gladwell R.T., Lowry P.J. Agouti related protein in the rat adrenal cortex: implications for novel autocrine mechanisms modulating the actions of pro-opiomelanocortin peptides. *J Neuroendocrinol.* 2000 ; 12(10):977-82.
- Blondet A., Gout J., Durand P., Bégeot M., Naville D. Expression of the human melanocortin-4 receptor gene is controlled by several members of the Sp transcription factor family. *J Mol Endocrinol.* 2005 ; 34(2):317-29.
- Bojanowska E. : Physiology and pathophysiology of glucagon-like peptide-1 (GLP-1): the role of GLP-1 in the pathogenesis of diabetes mellitus, obesity, and stress. *Med Sci Monit* 2005 ; 11(8):RA271-8
- Bollen M., Keppens S., Stalmans W. Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem. J.* (1998) 336:19-31
- Booth D.A., Chase A., Campbell A.T. : Relative effectiveness of protein in the late stages of appetite suppression in man. : *Physiol Behav* 1970 ; 5(11):1299-302
- Bouret S.G., Draper S.J., Simerly R.B. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science.* 2004 ; 304(5667):108-10.
- Bowman R. H. : Gluconeogenesis in the isolated perfused rat kidney. *J Biol Chem* 1970 ; 245(7):1604-12
- Bray G.M. : Exenatide. *Am J Health Syst Pharm* 2006 ; 63:411-8
- Breit A., Wolff K., Kalwa H., Jarry H., Büch T., Gudermann T. The natural inverse agonist agouti-related protein induces arrestin-mediated endocytosis of melanocortin-3 and -4 receptors. *J Biol Chem.* 2006 ; 281(49):37447-56
- Breen TL, Conwell IM, Wardlaw SL. Effects of fasting, leptin, and insulin on AGRP and POMC peptide release in the hypothalamus. *Brain Res.* 2005 ; 1032(1-2):141-8
- Brodows R.G., Pi-Sunyer, Campbell R.G. Sympathetic control of hepatic glycogenolysis during glucopenia in man. *Metabolism.* 1975 ; 24(5):617-24
- Broglio F., Gottero C., Benso A., Prodam F., Destefanis S., Gauna C., Maccario M., Deghenghi R., van der Lely A.J., Ghigo E. Effects of ghrelin on the insulin and glycemic responses to glucose, arginine, or free fatty acids load in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 ; 88(9):4268-72
- Bruning J. C., Gautam D., Burks D. J., Gillette J., Schubert M., Orban P. C., Klein R., Krone W., Muller-Wieland D., Kahn C. R. : Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 2000 ; 289(5487):2122-5
- Burcelin R., Katz E. B., Charron M. J. : Molecular and cellular aspects of the glucagon receptor: role in diabetes and metabolism. *Diabetes Metab* 1996 ; 22(6):373-96
- Burcelin R., Dolci W., Thorens B. : Glucose sensing by the hepatportal sensor is GLUT2-dependent: in vivo analysis in GLUT2-null mice. *Diabetes* 2000 ; 49(10):1643-8

- Burcelin R., Da Costa A., Drucker D., Thorens B. : Glucose competence of the hepatoportal vein sensor requires the presence of an activated glucagon-like peptide-1 receptor. *Diabetes* 2001 ; 50(8):1720-8
- Burcelin R., Crivelli V., Perrin C., Da Costa A., Mu J., Kahn B.B., Birnbaum M.J., Kahn C.R., Vollenweider P., Thorens B. : GLUT4, AMP kinase, but not the insulin receptor, are required for hepatoportal glucose sensor-stimulated muscle glucose utilization. *J Clin Invest* 2003 ; 111(10):1555-62
- Burcelin R., Brunner H., Seydoux J., Thorens B., Pedrazzini T. Increased insulin concentrations and glucose storage in neuropeptide Y Y1 receptor-deficient mice. *Peptides*. 2001 ; 22(3):421-7.
- Burch H.B., Narins R.G., Chu C., Fagioli S., Choi S., McCarthy W., Lowry O.H. : Distribution along the rat nephron of three enzymes of gluconeogenesis in acidosis and starvation. *Am J Physiol* 1978 ; 235(3):F246-53
- Burchell A. : Molecular pathology of glucose-6-phosphatase. *The FASEB Journal* 1990 ; 4:2978-2988
- Cano V., Caicoya E., Ruiz-Gayo M. : Effect of peripheral cholecystokinin receptor agonists on c-Fos expression in brain sites mediating food consumption in rats. *Neurosci Lett* 2003 ; 343(1):13-6
- Catania A., Delgado R., Airaghi L., Cutuli M., Garofalo L., Carlin A., Demitri M.T., Lipton J.M. alpha-MSH in systemic inflammation. Central and peripheral actions. *Ann N Y Acad Sci*. 1999 ; 885:183-7
- Cersosimo E., Judd R.L., Miles J.M. : Insulin regulation of renal glucose metabolism in conscious dogs. *J Clin Invest* 1994 ; 93(6):2584-9
- Cersosimo E., Molina P. E., Abumrad N. N. : Renal glucose production during insulin-induced hypoglycemia. *Diabetes* 1997 ; 46(4):643-6
- Cersosimo E., Zaitseva I. N., Ajmal M. : Effects of beta-adrenergic blockade on hepatic and renal glucose production during hypoglycemia in conscious dogs. *Am J Physiol* 1998 ; 275:E792-7
- Cersosimo E., Garlick P., Ferretti J. : Insulin regulation of renal glucose metabolism in humans. *Am J Physiol* 1999 ; 276(1 Pt 1):E78-84
- Cersosimo E., Garlick P., Ferretti J. Renal substrate metabolism and gluconeogenesis during hypoglycemia in humans. *Diabetes*. 2000 ; 49(7):1186-93
- Chai BX, Neubig RR, Millhauser GL, Thompson DA, Jackson PJ, Barsh GS, Dickinson CJ, Li JY, Lai YM, Gantz I: Inverse agonist activity of agouti and agouti-related protein. *Peptides* 2003 ; 24:603– 609
- Chatelain F., Pégrier J.P., Minassian C., Bruni N., Tarpin S., Girard J., Mithieux G. : Development and regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in rat liver, intestine, and kidney: in vivo and in vitro studies in cultured fetal hepatocytes. *Diabetes* 1998 ; 47(6):882-9
- Chaudhri O., Small C., Bloom S. : Gastrointestinal hormones regulating appetite. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006 ; 361(1471):1187-209
- Chavez M., Seeley R.J., Green P.K., Wilkinson C.W., Schwartz M.W., Woods S.C. Adrenalectomy increases sensitivity to central insulin. *Physiol Behav*. 1997 ; 62(3):631-4
- Chen X., Iqbal N., Boden G. : The effects of free fatty acids on gluconeogenesis and glycogenolysis in normal subjects. *J Clin Invest* 1999 ; 103(3):365-72
- Chen A.S., Marsh D.J., Trumbauer M.E., Frazier E.G., Guan X.M., Yu H., Rosenblum C.I., Vongs A., Feng Y., Cao L., Metzger J.M., Strack A.M., Camacho R.E., Mellin T.N., Nunes C.N., Min W., Fisher J., Gopal-Truter S., MacIntyre D.E., Chen H.Y., Van der Ploeg L.H. : Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet* 2000 ; 26(1):97-102
- Cherrington A. D. : Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. *Diabetes* 1999 ; 48(5):1198-214

- Choi IY, Wu C, Okar DA, Lange AJ, Gruetter R. Elucidation of the role of fructose 2,6-bisphosphate in the regulation of glucose fluxes in mice using in vivo (13)C NMR measurements of hepatic carbohydrate metabolism. *Eur J Biochem.* 2002 Sep;269(18):4418-26
- Clément L., Cruciani-Guglielmacci C., Magnan C., Vincent M., Douared L., Orosco M., Assimacopoulos-Jeannet F., Pénicaud L., Ktorza A. ; Intracerebroventricular infusion of a triglyceride emulsion leads to both altered insulin secretion and hepatic glucose production in rats. *Pflugers Arch* 2002 ; 445:375-80
- Clore J.N., Glickman P.S., Helm S.T., Nestler J.E., Blackard W.G. Evidence for dual control mechanism regulating hepatic glucose output in nondiabetic men. *Diabetes* 1991. 40:1033-1040
- Clore J.N., Stillman J., Sugerman H. : Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes. *Diabetes* 2000 ; 49(6):969-74
- Cohen P. Dissection of the protein phosphorylation cascades involved in insulin and growth factor action. *Biochem Soc Trans.* 1993 ; (3):555-67
- Cohen M.M. Jr. Role of leptin in regulating appetite, neuroendocrine function, and bone remodeling. *Am J Med Genet A.* 2006 ; 140(5):515-24
- Cone R.D., Cowley M.A., Butler A.A., Fan W., Marks D.L., Low M.J. : The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obesity* 2001 ; 25:563-7.
- Coppack S. W., Jensen M. D., Miles J. M. : In vivo regulation of lipolysis in humans. *J Lipid Res* 1994 ; 35(2):177-93
- Cori G.T., Cori C.F., Schmidt : The role of glucose-1 phosphate in the formation of blood sugar and synthesis of glycogen in the liver. *J Biol Chem* 1939 ; 129:629-39
- Corssmit E. P., Romijn J. A., Sauerwein H. P. : Regulation of glucose production with special attention to nonclassical regulatory mechanisms: a review. *Metabolism* 2001 ; 50(7):742-55
- Corwin R.L., Rowe P.M., Carwley J.N. : Galanin and the galanin antagonist M40 do not change fat intake in a fat-chow choice paradigm in rats. *Am J Physiol* 1995 ; 269:R511-8
- Couceyro P.R., Fritz T. Production of recombinant CART peptides in *Escherichia coli* with agonist and antagonist effects on food intake in rats. *Protein Expr Purif.* 2003 ; 32(2):185-93
- Cowley M.A., Smart J.L., Rubinstein M., Cerdan M.G., Diano S., Horvath T.L., Cone R.D., Low M.J. : Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 2001 ; 411:480-4.
- Cowley M.A., Smith R.G., Diano S., Tschöp M., Pronchuk N., Grove K.L., Strasburger C.J., Bidlingmaier M., Esterman M., Heiman M.L., Garcia-Segura L.M., Nillni E.A., Mendez P., Low M.J., Sotonyi P., Friedman J.M., Liu H., Pinto S., Colmers W.F., Cone R.D., Horvath T.L. : The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 2003 ; 37(4):649-61
- Cox JE, Powley TL. Prior vagotomy blocks VMH obesity in pair-fed rats. *Am J Physiol* 1981 ; 240:E573– 83.
- Cox W.I., Holbrook N.J., Grasso R.J., Specter S., Friedman H. Suppression of the natural killer cell activity of murine spleen cell cultures by dexamethasone (41489). *Proc Soc Exp Biol Med.* 1982 ; 171(2):146-50
- Croniger C., Leahy P., Reshef L., Hanson R. W. : C/EBP and the control of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription in the liver. *J Biol Chem* 1998 ; 273(48):31629-32
- Croset M., Rajas F., Zitoun C., Hurot J.M., Montano S., Mithieux G. : Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes* 2001 ; 50(4):740-6

- Cruciani-Guglielmacci C., Hervalet A., Douared L., Sanders N.M., Levin B.E., Ktorza A., Magnan C. Beta oxidation in the brain is required for the effects of non-esterified fatty acids on glucose-induced insulin secretion in rats. *Diabetologia*. 2004 ; 47(11):2032-8
- Cruciani-Guglielmacci C., Vincent-Lamon M., Rouch C., Orosco M., Ktorza A., Magnan C. Early changes in insulin secretion and action induced by high-fat diet are related to a decreased sympathetic tone. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005 ; 288(1):E148-54
- Culbert A.A., Tavaré J.M. Multiple signalling pathways mediate insulin-stimulated gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2002 ; 1578(1-3):43-50
- Curthoys N.P., Watford M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu Rev Nutr*. 1995 ; 15:133-59
- Date Y., Murakami N., Toshinai K., Matsukura S., Niiijima A., Matsuo H., Kangawa K., Nakazato M.. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 2002
- Davidson M. B. : Autoregulation by glucose of hepatic glucose balance: permissive effect of insulin. *Metabolism* 1981 30(3):279-84
- de Duve C., Berthet J., Hers H.G., Dupret L. : Le système hexose-phosphatasique. I. Existence d'une glucose-6 phosphatase spécifique dans le foie. *Bull Soc Chim Biol* 1949 ; 31:1242-53
- Degen L., Oesch S., Casanova M., Graf S., Ketterer S., Drewe J., Beglinger C. : Effect of peptide YY3-36 on food intake in humans. *Gastroenterology* 2005 ; 129:1430-6
- Delarue J, Magnan C. Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007 ; 10(2):142-8
- Dhabhar F.S., Miller A.H., McEwen B.S., Spencer R.L. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. *J Immunol*. 1996 ; 157(4):1638-44.
- Dhillon W.S., Small C.J., Stanley S.A., Jethwa P.H., Seal L.J., Murphy K.G., Ghatei M.A., Bloom S.R. Hypothalamic interactions between neuropeptide Y, agouti-related protein, cocaine- and amphetamine-regulated transcript and alpha-melanocyte-stimulating hormone in vitro in male rats. *J Neuroendocrinol*. 2002 ; 14(9):725-30
- Dickens M., Svitek C.A., Culbert A.A., O'Brien R.M., Tavaré J.M. : Central role for phosphatidylinositol 3-kinase in the repression of glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin. *J Biol Chem* 1998 ; 273(32):20144-9
- Dinneen S., Alzaid A., Miles J., Rizza R. : Metabolic effects of the nocturnal rise in cortisol on carbohydrate metabolism in normal humans. *J Clin Invest* 1993 ; 92(5):2283-90
- Doghman M., Soltani Y., Rebuffet V., Naville D., Bégeot M. Role of Agouti-related protein in adrenal steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2007 ; 265-266:108-12
- Dong W., Day R. Gene expression of proprotein convertases in individual rat anterior pituitary cells and their regulation in corticotrophs mediated by glucocorticoids. *Endocrinology*. 2002 ; 143(1):254-62
- Drucker D.J. : The biology of incretin hormones. *Cell Metab* 2006 ; 3(3):153-65
- Dyer J., Daly K., Salmon K.S., Arora D.K., Kokrashvili Z., Margolskee R.F., Shirazi-Beechey S.P. : Intestinal glucose sensing and regulation of intestinal glucose absorption. *Biochem Soc Trans* 2007 ; 35:1191-4
- Duan J., Choi Y.H., Hartzell D., Della-Fera M.A., Hamrick M., Baile C.A. Effects of subcutaneous leptin injections on hypothalamic gene profiles in lean and ob/ob mice. *Obesity* 2007 ; 15(11):2624-33
- Edwards C. M., Stanley S. A., Davis R., Brynes A. E., Frost G. S., Seal L. J., Ghatei M. A., Bloom S. R. : Exendin-4 reduces fasting and postprandial glucose and decreases energy intake in healthy volunteers. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001 ; 281:E155-61

- Ehrstrom M., Gustafsson T., Finn A., Kirchgessner A., Gryback P., Jacobson H. : Inhibitory effect of exogenous orexin A on gastric emptying, plasma leptin, and the distribution of orexin and orexin receptors in the gut and pancreas in man. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 ; 90:2370-7
- Ekberg K., Landau B.R., Wajngot A., Chandramouli V., Efendic S., Brunengraber H., Wahren J. : Contributions by kidney and liver to glucose production in the postabsorptive state and after 60 h of fasting. *Diabetes* 1999 ; 48(2):292-8
- Englaro W., Rezzonico R., Durand-Clément M., Lallemand D., Ortonne J.P., Ballotti R. Mitogen-activated protein kinase pathway and AP-1 are activated during cAMP-induced melanogenesis in B-16 melanoma cells. *J Biol Chem.* 1995 ; 270(41):24315-20.
- el-Maghrabi M. R., Pilkis J., Marker A. J., Colosia A. D., D'Angelo G., Fraser B. A., Pilkis S. J., Claus T. H. : cDNA sequence of rat liver fructose-1,6-bisphosphatase and evidence for down-regulation of its mRNA by insulin. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988 ; 85(22):8430-4
- Falardeau P., Martineau A. Prostaglandin I2 and glucocorticoid-induced rise in arterial pressure in the rat. *J Hypertens.* 1989 ; 7(8):625-32
- Fan W., Ellacott K.L., Halatchev I.G., Takahashi K., Yu P., Cone R.D. : Cholecystokinin-mediated suppression of feeding involves the brainstem melanocortin system. *Nat Neurosci* 2004 ; 7(4):335-6
- Fauci A.S. Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations. I. Redistribution of circulating T and b lymphocytes to the bone marrow. *Immunology.* 1975 ; 28(4):669-80
- Fekete C., Marks D.L., Sarkar S., Emerson C.H., Rand W.M., Cone R.D. : Effect of Agouti-related protein in regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the melanocortin 4 receptor knockout mouse. *Endocrinology* 2004 ; 145:4813-5
- Fekete C., Sarkar S., Rand W.M., Harney J.W., Emerson C.H., Bianco A.C., Lechan R.M. Agouti-related protein (AGRP) has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis; comparisons between the effect of AGRP and neuropeptide Y on energy homeostasis and the HPT axis. *Endocrinology.* 2002 ; 143(10):3846-53.
- Felig P., Wahren J., Karl I., Cerasi E., Luft R., Kipnis D. : Glutamine and glutamate metabolism in normal and diabetic subjects. *Diabetes* 1973 ; 22(8):573-6
- Ferrannini E. and Groop L.C. : Hepatic glucose production in insulin-resistant states. *Diabetes Metab Rev* 1989 ; 5(8):711-26
- Ferrannini E., Barrett E. J., Bevilacqua S., DeFronzo R. A. : Effect of fatty acids on glucose production and utilization in man. *J Clin Invest* 1983 ; 72(5):1737-47
- Fery F., Plat L., Melot C., Balasse E.O. Role of fat derived substrates in the regulation of gluconeogenesis during fasting. *Am J Physiol* 1996. 270:E822-E830
- Finley J.C., Lindström P., Petrusz P. Immunocytochemical localization of beta-endorphin-containing neurons in the rat brain. *Neuroendocrinology.* 1981 ; 33(1):28-42.
- Flegal K.M, Carrol M.D., Ogden C.L., Johnson C.L. : Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *JAMA* 2002 ; 288:1723-7
- Flier J.S. : Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 2004 ; 116(2):337-50
- Floyd J.C. Jr, Fajans S.S., Knopf R.F., Rull J., Conn J.W. : Stimulation of insulin secretion by amino acids. *Clin Res* 1965 ; 13:322

- Floyd J.C. Jr, Fajans S.S., Conn J.W., Knopf R.F., Rull J. : Stimulation of insulin secretion by amino acids. *J Clin Invest* 1966 ; 45(9):1487-502
- Floyd J.C. Jr, Fajans S.S., Conn J.W., Knopf R.F., Rull J., : Insulin secretion in response to protein ingestion. *J Clin Invest* 1966 ; 45:1479
- Freyse E. J., Fischer U., Albrecht G., Marx S., Keilacker H. : The effect of prehepatic insulin administration on alanine flux rates in diabetic dogs. *Diabetologia* 1987 ; 30(6):402-8
- Friedman J.M. : Obesity in the new millennium. *Nature* 2000 ; 404(6778):632-4
- Fryer J. H., Moore N. S., Williams H. H., Young C. M. : A study of the interrelationship of the energy-yielding nutrients, blood glucose levels, and subjective appetite in man. *J Lab Clin Med* 1955 ; 45(5):684-96
- Gannon M.C., Nuttall F.Q., Saeed A., Jordan K., Hoover H. : An increase in dietary protein improves the blood glucose response in persons with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 2003 ; 78(4):734-41
- Garcia S.I., Landa M.S., Porto P.I., Alvarez A.L., Shuman M., Finkelmann S. : Thyrotropin-releasing hormone decreases leptin and mediates the leptin-induced pressor effect. *Hypertension* 2002 ; 39:491-5
- Garg M.L., Sabine J.R., Snoswell A.M. : A comparison of the influence of diets high in saturated versus unsaturated fatty acids on lipid composition and glucose-6-phosphatase activity of rat liver microsomes. *Biochem Int* 1985 ; 10(4):585-95
- Garland RC. Induction of glucose 6-phosphatase in cultured hepatoma cells by dexamethasone. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986 ; 139(3):1130-4
- Gautier-Stein A., Mithieux G., Rajas F. A distal region involving HNF4{alpha} and C/EBP markedly potentiates the protein kinase a stimulation of the glucose-6-phosphatase promoter. ; *Mol Endocrinol* 2005 19(1):163-74
- Gautier-Stein A., Zitoun C., Lalli E., Mithieux G., Rajas F. Transcriptional regulation of the glucose-6-phosphatase gene by cAMP/vasoactive intestinal peptide in the intestine. Role of HNF4alpha, CREM, HNF1alpha, and C/EBPalpha. *J Biol Chem.* 2006 ; 281(42):31268-78
- Gaysinskaya V.A., Karatayev O., Chang G.Q., Leibowitz S.F. : Increased caloric intake after a high-fat preload: relation to circulating triglycerides and orexigenic peptides. *Physiol Behav* 2007 ; 91(1):142-53
- Geary N. : Endocrine controls of eating: CCK, leptin, and ghrelin. *Physiol Behav* 2004 ; 81:719-33
- Gerich J. E., Meyer C., Woerle H. J., Stumvoll M. : Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes Care* 2001 ; 24(2):382-91
- Gold R.M. Hypothalamic obesity: the myth of the ventromedial nucleus. *Science* 1973 ; 182:488-90.
- Gosmain Y., Lefai E., Ryser S., Roques M., Vidal H. Sterol regulatory element-binding protein-1 mediates the effect of insulin on hexokinase II gene expression in human muscle cells. *Diabetes.* 2004 ; 53(2):321-9
- Gout J, Sarafian D, Tirard J, Blondet A, Vigier M, Rajas F, Mithieux G, Begeot M, Naville D. Leptin infusion and obesity in mouse cause alterations in the hypothalamic melanocortin system. *Obesity (Silver Spring).* 2008 ; 16(8):1763-9
- Graham M., Shutter J.R., Sarmiento .U, Sarosi I., Stark K.L. Overexpression of Agrt leads to obesity in transgenic mice *Nat Genet.* 1997 ; 17(3):273-4
- Granner D.K. and O'Brien R.M. : Molecular physiology and genetics of NIDDM. Importance of metabolic staging. *Diabetes Care* 1992 ; 15(3):369-95
- Green P.K., Wilkinson C.W., Woods S.C. Intraventricular corticosterone increases the rate of body weight gain in underweight adrenalectomized rats. *Endocrinology.* 1992 ; 130(1):269-75

- Guignot L. and G. Mithieux : Mechanisms by which insulin, associated or not with glucose, may inhibit hepatic glucose production in the rat. *Am J Physiol* 1999 ; 277:E984-9
- Guillam M.T., Burcelin R., Thorens B. Normal hepatic glucose production in the absence of GLUT2 reveals an alternative pathway for glucose release from hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 ; 95(21)
- Gustafson E. L., Smith K. E., Durkin M. M., Walker M.W., Gerald C., Weinsank R. & Branchek T. A. ; Distribution of the neuropeptide Y Y2 receptor mRNA in rat central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 1997 ; 46:223-35
- Gustavson S. M., Chu C. A., Nishizawa M., Neal D., Farmer B., Yang Y., Donahue E. P., Flakoll P., Cherrington A. D. : Effects of hyperglycemia, glucagon, and epinephrine on renal glucose release in the conscious dog. *Metabolism* 2004 53(7):933-41
- Gutzwiller J.P., Drewe J., Ketterer S., Hildebrand A., Krauthem A., Beglinger C. : Interaction between CCK and a preload on reduction of food intake is mediated by CCK-A receptors in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001 ; 279:R189-95
- Gutzwiller J. P., Goke B., Drewe J., Hildebrand P., Ketterer S., Handschin D., Winterhalder R., Conen D. & Beglinger C. : Glucagon-like peptide-1: a potent regulator of food intake in humans. *Gut* 1999a ; 44:81-6
- Gutzwiller J. P., Drewe J., Goke B., Schmidt H., Rohrer B., Lareida J., Beglinger C. : Glucagon-like peptide-1 promotes satiety and reduces food intake in patients with diabetes mellitus type 2. *Am J Physiol* 1999b ; 276:R1541-4
- Hahn T. M., Breininger J. F., Baskin D. G., Schwartz M. W. : Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* 1998 ; 1(4):271-2
- Halaas J. L., Boozer C., Blair-West J., Fidahusein N., Denton D. A., Friedman J. M. : Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 ; 94(16):8878-83
- Halatchev I.G., Ellacott K.L.J., Fan W., Cone R.D. : Peptide YY (3-36) inhibits food intake in mice through a melanocortin-4 receptor-independant mechanism. *Endocrinology* 2004 ; 145:2585-90.
- Hansen LH, Abrahamsen N, Nishimura E. Glucagon receptor mRNA distribution in rat tissues. *Peptides.* 1995;16(6):1163-6
- Hanson R.W., Reshef L. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Biochem* 1997 ; 66:581-611
- Harrold J.A., Widdowson P.S., Williams G.. Altered energy balance causes selective changes in melanocortin-4(MC4-R), but not melanocortin-3 (MC3-R), receptors in specific hypothalamic regions: further evidence that activation of MC4-R is a physiological inhibitor of feeding. *Diabetes.* 1999 ; 48(2):267-71.
- Haskell-Luevano C, Monck EK: Agouti-related protein functions as an inverse agonist at a constitutively active brain melanocortin-4 receptor. *Regul Pept* 2001 ; 99:1-7
- Havel P.J. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes.* 2004 ; 53 Suppl 1:S143-51
- Hayes M. R., Moore R. L., Shah S. M., Covasa M. : 5-HT3 receptors participate in CCK-induced suppression of food intake by delaying gastric emptying. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004 ; 287:R817-23
- Hevener A.L., Bergman R.N., Donovan C.M. Novel glucosensor for hypoglycemic detection localized to the portal vein. *Diabetes* 1997 ; 46:1521-5
- Hevener A.L., Bergman R.N., Donovan C.M. Hypoglycemic detection does not occur in the hepatic artery or liver: findings consistent with a portal vein glucosensor locus. *Diabetes.* 2001 ; 50(2):399-403

- Hillebrand J.J., de Wied D., Adan R.A. : Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* 2002 ; 23(12):2283-306
- Hinney A., Schmidt A., Nottebom K., Heibült O., Becker I., Ziegler A., Gerber G., Sina M., Görg T., Mayer H., Siegfried W., Fichter M., Remschmidt H., Hebebrand J. : Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1999 ; 84(4):1483-6
- Hiraiwa H., Chou J.Y. Glucocorticoids activate transcription of the gene for the glucose-6-phosphate transporter, deficient in glycogen storage disease type 1b. *DNA Cell Biol.* 2001 ; 20(8):447-53
- Hoffman R.P. Sympathetic mechanisms of hypoglycemic counterregulation. *Curr Diabetes Rev.* 2007 Aug;3(3):185-93
- Holst J. J. : Glucagon-like peptide-1: physiology and therapeutic potential. *Curr Opin Endocrinol Diab* 2005 ; 12:56–62
- Huang Q., Rivest R., Richard D. Effects of leptin on corticotropin-releasing factor (CRF) synthesis and CRF neuron activation in the paraventricular hypothalamic nucleus of obese (ob/ob) mice. *Endocrinology.* 1998 ; 139(4):1524-32.
- Huszar D., Lynch C.A., Fairchild-Huntress V., Dunmore J.H., Fang Q., Berkemeier L.R., Gu W., Kesterson R.A., Boston B.A., Cone R.D., Smith F.J., Campfield L.A., Burn P., Lee F. : Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 1997 Jan ; 88(1):131-41
- Hwang J.J., Curthoys N.P. : Effect of acute alterations in acid-base balance on rat renal glutaminase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *J Biol Chem* 1991 ; 266(15):9392-6
- Hollenbeck C.B., Chen Y.D., Reaven G.M. : A comparison of the relative effects of obesity and non-insulin-dependant diabetes mellitus on in vivo insulin-stimulated glucose utilization. *Diabetes* 1984 ; 33(7):622-6
- Ichai C., Guignot L., El-Mir M. Y., Nogueira V., Guigas B., Chauvin C., Fontaine E., Mithieux G., Leverve X. M. : Glucose 6-phosphate hydrolysis is activated by glucagon in a low temperature-sensitive manner. *J Biol Chem* 2001 ; 276(30):28126-33
- Ikedo H., West D. B., Pustek J. J. , Figlewicz D. P., Greenwood M. R., Porte D. Jr, Woods S. C. : Intraventricular insulin reduces food intake and body weight of lean but not obese Zucker rats. *Appetite* 1986 ; 7(4):381-6
- Inui A. Feeding behavior and gene expression of appetite-related neuropeptides in mice lacking for neuropeptide Y Y5 receptor subclass. *World J Gastroenterol* 2008 ; 14(41):6312-7
- Iynedjian P.B., Gjinovci A., Renold A.E. Stimulation by insulin of glucokinase gene transcription in liver of diabetic rats. *J Biol Chem* 1988 ; 263:740–744
- Iynedjian P.B., Roth R.A., Fleischmann M., Gjinovci A. Activation of protein kinase B/cAkt in hepatocytes is sufficient for the induction of expression of the gene encoding glucokinase. *Biochem J* 2000 ; 351:621–627
- Jean C., Rome S., Mathé V., Huneau J.F., Aattouri N. Fromentin G., Achagiotis C.L., Tomé D. : Metabolic evidence for adaptation to a high protein diet in rats. *J Nutr.* 2001 ; 131(1):91-8
- Jégou S., Blasquez C., Delbende C., Tranchand Bunel D., Vaudry H. : Regulation of α -melanocyte-stimulating hormone release from hypothalamic neurons. *Ann NY Acad Sci* 1993 ; 680:260-78.
- Jégou S., Boutelet I., Vaudry H. Melanocortin-3 receptor mRNA expression in pro-opiomelanocortin neurones of the rat arcuate nucleus. *J Neuroendocrinol* 2000 ; 12:501-5
- Jelinek L.J., Lok S., Rosenberg G.B., Smith R.A., Grant F.J., Biggs S., Bensch P.A., Kuijper J.L., Sheppard P.O., Sprecher C.A. *et al* : Expression cloning and signaling properties of the rat glucagon receptor. *Science* 1993 ; 259(5101):1614-6

- Jiang G. and Zhang B. B. : Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003 ; 284(4):E671-8
- Jitrapakdee S., St Maurice M., Rayment I., Cleland W.W., Wallace J.C., Attwood P.V. Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem J*. 2008 ; 413(3):369-87
- Kallwellis-Opara A, Zaho X, Zimmermann U, Unterman TG, Walther R, Schmoll D. Characterization of cis-elements mediating the stimulation of glucose-6-phosphate transporter promoter activity by glucocorticoids. *Gene*. 2003 ; 320:59-66
- Kanatani A., Mashiko S., Murai N., Sugimoto N., Ito J., Fukuroda T., Fukami T., Morin N., MacNeil D.J., Van der Ploeg L.H., Saga Y., Nishimura S., Ihara M. : Role of the Y1 receptor in the regulation of neuropeptide Y-mediated feeding: comparison of wild-type, Y1 receptor-deficient, and Y5 receptor-deficient mice. *Endocrinology* 2000 ; 141:1011-6
- Katsuki A., Sumida Y., Gabazza E.C., Murashima S., Tanaka T., Furuta M., Araki-Sasaki R., Hori Y., Nakatani K., Yano Y., Adachi Y. Plasma levels of agouti-related protein are increased in obese men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 ; 86(5):1921-4.
- Kellett G.L., Brot-Laroche E. : Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption. *Diabetes* 2005 ; 54(10):3056-62
- Kennedy G.C. : The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1953 ; 140(901):578-96
- Kida K., Nakajo S., Kamiya F., Toyama Y., Nishio T., Nakagawa H. Renal net glucose release in vivo and its contribution to blood glucose in rats. *J Clin Invest*. 1978 ; 62(4):721-6
- Kim M.S., Small C.J., Stanley S.A., Morgan D.G., Seal L.J., Kong W.M., Edwards C.M., Abusnana S., Sunter D., Ghatei M.A., Bloom S.R. The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. *J Clin Invest*. 2000 ; 105(7):1005-11.
- Kim S.Y., Kim H.I., Kim T.H., Im S.S., Park S.K., Lee I.K., Kim K.S., Ahn Y.H. SREBP-1c mediates the insulin-dependent hepatic glucokinase expression. *J Biol Chem*. 2004 Jul 16;279(29):30823-9
- Kimura N, Tokunaga C, Dalal S, Richardson C, Yoshino K, Hara K, Kemp BE, Witters LA, Mimura O, Yonezawa K: A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. *Genes Cells* 2003 ; 8:65-79
- King B.M. The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol Behav* 2006 ; 87:221-44
- Kinzig K.P., Hargrave S.L., Hyun J., Moran T.H. : Energy balance and hypothalamic effects of a high-protein/low-carbohydrate diet. *Physiology and behavior* 2007 ; 92:454-460
- Kissileff H. R., Pi-Sunyer F. X., Thornton J., Smith G. P. : C-terminal octapeptide of cholecystokinin decreases food intake in man. *Am J Clin Nutr* 1981 ; 34:154-60.
- Kissileff H. R., Carretta J. C., Geliebter A., Pi-Sunyer F. X. : Cholecystokinin and stomach distension combine to reduce food intake in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003 ; 285:R992-8
- Koda S., Date Y., Murakami N., Shimbara T., Hanada T., Toshinai K. The role of the vagal nerve in peripheral PYY 3-36-induced feeding reductions in rats. *Endocrinology* 2005 ; 146:2369-75
- Koda S., Date Y., Murakami N., Shimbara T., Hanada T., Toshinai K., Nijima A., Furuya M., Inomata N., Osuye K., Nakazato M. : The role of the vagal nerve in peripheral PYY3-36-induced feeding reduction in rats. *Endocrinology* 2005 ; 146(5):2369-75

- Kolaczynski J.W., Nyce M.R., Considine R.V., Boden G., Nolan J.J., Henry R., Mudaliar S.R., Olefsky J., Caro J.F. Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: Studies in vivo and in vitro. *Diabetes*. 1996 ; 45(5):699-701
- Komaki G., Matsumoto Y., Nishikata H., Kawai K., Nozaki T., Takii M., Sogawa H., and Kubo C. Orexin-A and leptin change inversely in fasting non-obese subjects. *European Journal of Endocrinology* ; 144(6):645-651
- Koylu E.O., Couceyro P.R., Lambert P.D., Ling N.C., DeSouza E.B., Kuhar M.J. Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. *J Neuroendocrinol*. 1997 ; 9(11):823-33.
- Krebs H.A., Bennett D.A.H., de Gasquet P., Gascoyne T., Yoshida T. : Renal gluconeogenesis. The effect of diet on the gluconeogenic capacity of rat-kidney-cortex slices. *Biochem J* 1963 ; 86:22-7
- Krebs M., Brehm A., Krssak M., Anderwald C., Bernroider E., Nowotny P., Roth E., Chandramouli V., Landau B. R., Waldhausl W., Roden M. : Direct and indirect effects of amino acids on hepatic glucose metabolism in humans. *Diabetologia* 2003 ; 46(7):917-25
- Kristensen P., Judge M. E., Thim L., Ribel U., Christjansen K. N., Wulff B. S., Clausen J. T., Jensen P. B., Madsen O. D., Vrang N., Larsen P. J., Hastrup S. : Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 1998 ; 393(6680):72-6
- Krude H., Grüters A. : Implications of proopiomelanocortin (POMC) mutations in humans: the POMC deficiency syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 2000 ; 11(1):15-22
- Kurland IJ, Pilkis SJ. Covalent control of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: insights into autoregulation of a bifunctional enzyme. *Protein Sci*. 1995 ; 4(6):1023-37
- Laakso M., Malkki M., Kekalainen P., Kuusisto J., Deeb S.S. : Inulin receptor substrate-1 variants in non-insulin-dependant diabetes. *J Clin Invest* 1994 ; 94(3):1141-6
- Lam T.K., Carpentier A., Lewis G.F., Van de werve G., Fantus I.G., Giacca A. : Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003 ; 284(5):E863-73
- Lambert PD, Couceyro PR, McGirr KM, Dall Vechia SE, Smith Y, Kuhar MJ. CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse*. 1998 ; 29(4):293-8
- Langhans W., Grossmann F., Geary N. : Intrameal hepatic-portal infusion of glucose reduces spontaneous meal size in rats. *Physiol Behav* 2001 ; 73(4):499-507
- Latner J.D. and Schwartz M. : The effects of a high-carbohydrate, high-protein or balanced lunch upon later food intake and hunger ratings. *Appetite* 1999 ; 33:119-28
- Lechan RM, Fekete C. The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Prog Brain Res*. 2006 ; 153:209-35
- Lee G. H., Proenca R., Montez J. M., Carroll K. M., Darvishzadeh J. G., Lee J. I., Friedman J. M. : Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 1996 ; 379(6566):632-5
- Lee Y.S., Poh L.K., Loke K.Y. : A novel melanocortin 3 receptor gene (MC3R) mutation associated with severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 ; 87(3):1423-6
- Leibowitz S.F. : Regulation and effects of hypothalamic galanin : relation to dietary fat, alcohol ingestion, circulating lipids and energy homeostasis. *Neuropeptides* 2005 ; 39:327-32
- Lewis G.F., Zinman B., Groenewoud Y., Vranic M., Giacca A. : Hepatic glucose production is regulated both by direct hepatic and extrahepatic effects of insulin in humans. *Diabetes* 1996 ; 45(4):454-62

- Lewis G. F., Carpentier A., Adeli K., Giacca A. : Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr* 2002 ; 23(2):201-29
- L'Heureux-Bouron D., Tomé D., Bensaid A., Morens C., Lacroix M., Huneau J.F., Fromentin G. : Preabsorptive factors are not the main determinants of intake depression induced by a high-protein diet in the rat. *Physiol Behav* 2004 ; 81(3):499-504
- L'Heureux-Bouron D., Tomé D., Bensaid A., Morens C., Gaudichon C., Fromentin G. : A very high 70%-protein diet does not induce conditioned taste aversion in rats. *J Nutr* 2004 ; 134(6):1512-5
- Liddle R. A., Goldfine I. D., Rosen M. S., Taplitz R. A., Williams J. A. : Cholecystokinin bioactivity in human plasma. Molecular forms, responses to feeding, and relationship to gallbladder contraction. *J Clin Invest* 1985 ; 75:1144-52
- Lieverse R.J., Jansen J.M.B, Masclee A.M., Lamers C.B.H.W. : Satiety effects of a physiological dose of cholecystokinin in human. *Gut* 1995 ; 36 : 176-9
- Lin B., Morris D.W., Chou J.Y. Hepatocyte nuclear factor 1{alpha} is an accessory factor required for activation of glucose-6-phosphatase gene transcription by glucocorticoids. *DNA Cell Biol* 1998 ; 17:967-974
- Linn T., Santosa B., Grönemeyer D., Aygen S., Scholz N., Busch M., Bretzel R.G. : Effect of long-term dietary protein intake on glucose metabolism in humans. *Diabetologia*. 2000 ; 43(10):1257-65
- Liu L., Karkanias G.B., Morales J.C., Hawkins M., Barzilai N., Wang J., Rossetti L. Intracerebroventricular leptin regulates hepatic but not peripheral glucose fluxes. *J Biol Chem*. 1998 ; 273(47):31160-7
- Lochhead P.A., Salt I.P., Walker K.S., Hardie D.G., Sutherland C. 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes*. 2000 Jun;49(6):896-903
- Logie L., Ruiz-Alcaraz A.J., Keane M., Woods Y.L., Bain J., Marquez R., Alessi D.R., Sutherland C. Characterization of a protein kinase B inhibitor in vitro and in insulin-treated liver cells. *Diabetes* 2007 ; 56(9):2218-27
- López M, Lage R, Saha AK, Pérez-Tilve D, Vázquez MJ, Varela L, Sangiao-Alvarellos S, Tovar S, Raghay K, Rodríguez-Cuenca S, Deoliveira RM, Castañeda T, Datta R, Dong JZ, Culler M, Sleeman MW, Alvarez CV, Gallego R, Lelliott CJ, Carling D, Tschöp MH, Diéguez C, Vidal-Puig A. Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metab*. 2008 ; 7(5):389-99
- Louis-Sylvestre J. and Le Magnen J. : Fall in blood glucose level precedes meal onset in free-feeding rats. *Neurosci Biobehav* 1980 ; 4(1):13-5
- Lawrence J.C. Jr, Roach P.J. New insights into the role and mechanism of glycogen synthase activation by insulin. *Diabetes*. 1997 ; 46(4):541-7
- Lu SC, Xu J, Chinooswong N, Liu S, Steavenson S, Gegg C, Brankow D, Lindberg R, Veniant M, Gu W. An Acyl-Ghrelin Specific Neutralizing Antibody Inhibits the Acute Ghrelin-Mediated Orexigenic Effects in Mice. *Mol Pharmacol*. 2009
- Lucidi P., Murdolo G., Di Loreto C., Parlanti N., De Cicco A., Fatone C. : Metabolic and endocrine effects of physiological increments in plasma ghrelin concentrations. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005 ; 15:410-7
- Luiking YC, Deutz NE, Jäkel M, Soeters PB. Casein and soy protein meals differentially affect whole-body and splanchnic protein metabolism in healthy humans. *J Nutr*. 2005 ; 135(5):1080-7
- Luquet S., Perez F.A., Hnasko T.S., Palmiter R. NPY/AgRP Neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science* 2006 ; 310:683-5
- Ma X., Zubcevic L., Ashcroft F.M. : Glucose regulates the effects of leptin on hypothalamic POMC neurons. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2008 ; 105(28):9811-6

- Magnan C., Collins S., Berthault M.F., Kassis N., Vincent M., Gilbert M., Pénicaud L., Ktorza A., Assimacopoulos-Jeannet F. : Lipid infusion lowers sympathetic nervous activity and leads to increased beta-cell responsiveness to glucose. *J Clin Invest.* 1999 Feb;103(3):413-9
- Makimura H, Mizuno TM, Isoda F, Beasley J, Silverstein JH, Mobbs CV. Role of glucocorticoids in mediating effects of fasting and diabetes on hypothalamic gene expression. *BMC Physiol.* 2003 ; 3:5
- Makimura H., Mizuno T.M., Roberts J., Silverstein J., Beasley J., Mobbs C.V. Adrenalectomy reverses obese phenotype and restores hypothalamic melanocortin tone in leptin-deficient ob/ob mice. *Diabetes.* 2000 ; 49(11):1917-23
- Mann F.C. and Magath T.B. : Die wirkunden der totalen leberexstirpation. *Ergebn Physiol* 1924 ; 23:212-73
- Marsh D.J., Hollopeter G., Kafer K.E., Palmiter R.D. Role of the Y5 neuropeptide Y receptor in feeding and obesity. *Nat Med.* 1998 ; 4(6):718-21
- Massillon D., Barzilai N., Hawkins M., Prus-Wertheimer D., Rossetti L. : Induction of hepatic glucose-6-phosphatase gene expression by lipid infusion. *Diabetes* 1997 ; 46(1):153-7
- McAlister E.D., Van Vugt D.A. Effect of leptin administration versus re-feeding on hypothalamic neuropeptide gene expression in fasted male rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2004 ; 82(12):1128-34
- McGuinness O. P., Shau V., Benson E. M., Lewis M., Snowden R. T., Greene J. E., Neal D. W., Cherrington A. D. : Role of epinephrine and norepinephrine in the metabolic response to stress hormone infusion in the conscious dog. *Am J Physiol* 1997 ; 273:E674-81
- Meeran K., O'Shea D., Edwards C.M., Turton M.D., Heath M.M., Gunn I. : Repeated intracerebroventricular administration of glucagon-like peptide-1-(7-36) Amide or exendin-(9-39) alters body weight in the rat. *Endocrinology* 1999 ; 140:244-50
- Mercer J. G., Hoggard N., Williams L. M., Lawrence C. B., Hannah L. T., Trayhurn P. : Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett* 1996 ; 387(2-3):113-6
- Metón I, Egea M, Anemaet IG, Fernández F, Baanante IV. Sterol regulatory element binding protein-1a transactivates 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene promoter. *Endocrinology.* 2006 Jul;147(7):3446-56
- Meyer C., Dostou J., Nadkarni V., Gerich J. : Effects of physiological hyperinsulinemia on systemic, renal, and hepatic substrate metabolism. *Am J Physiol* 1998 ; 275:F915-21
- Meyer C., Stumvoll M., Dostou J., Welle S., Haymond M., Gerich J. Renal substrate exchange and gluconeogenesis in normal postabsorptive humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002 ; 282(2)
- Migrenne S, Magnan C, Cruciani-Guglielmacci C. Fatty acid sensing and nervous control of energy homeostasis. *Diabetes Metab.* 2007 ; 33(3):177-82
- Minassian C., Mithieux G. : Differential time course of liver and kidney glucose-6 phosphatase activity during fasting in rats. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1994 ; 109(1):99-104
- Mink S., Haenig B., Klemmner K.H. : Interaction and functional collaboration of p300 and C/EBPbeta. *Mol Cell Biol* 1997 ; 17(11):6609-17
- Minokoshi Y., Kim Y.B., Peroni O.D., Fryer L.G., Müller C., Carling D., Kahn B.B. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature.* 2002 ; 415(6869):339-43.
- Mithieux G. : New knowledge regarding glucose-6 phosphatase gene and protein and their roles in the regulation of glucose metabolism. *Eur J Endocrinol* 1997 ; 136(2):137-45

- Mithieux G. : New data and concepts on glutamine and glucose metabolism in the gut. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2001 ; 4(4):267-71
- Mithieux G., Vidal H., Zitoun C., Bruni N., Daniele N., Minassian C. : Glucose-6-phosphatase mRNA and activity are increased to the same extent in kidney and liver of diabetic rats. *Diabetes* 1996 ; 45(7):891-6
- Mithieux G., Bady I., Gautier A., Croset M., Rajas F., Zitoun C. : Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004 ; 286(3):E370-5
- Mithieux G., Gautier-Stein A., Rajas F., Zitoun C. Contribution of intestine and kidney to glucose fluxes in different nutritional states in rat. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2006 ; 143(2):195-200
- Mittelman S., Bergman R.N. : Liver glucose production in health and diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 1998 ; 5:126-35
- Mittelman S.D., Fu Y.Y., Rebrin K., Steil G., Bergman R.N. : Indirect effect of insulin to suppress endogenous glucose production is dominant, even with hyperglucagonemia. *J Clin Invest* 1997 ; 100(12):3121-30
- Miyake K., Ogawa W., Matsumoto M., Nakamura T., Sakaue H., Kasuga M. : Hyperinsulinemia, glucose intolerance, and dyslipidemia induced by acute inhibition of phosphoinositide 3-kinase signaling in the liver. *J Clin Invest* 2002 ; 110(10):1483-91
- Moore M. C., Cherrington A. D., Wasserman D. H. : Regulation of hepatic and peripheral glucose disposal. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003 ; 17(3):343-64
- Moore MC, Cardin S, Edgerton DS, Farmer B, Neal DW, Lautz M, Cherrington AD. Unlike mice, dogs exhibit effective glucoregulation during low-dose portal and peripheral glucose infusion. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004 ; 286(2):E226-33
- Moran T. H. and Kinzig K. P. : Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004 ; 286:G183–G8
- Moran T. H. and McHugh P. R. : Gastric and nongastric mechanisms for satiety action of cholecystokinin. *Am J Physiol* 1988 ; 254:R628–32
- Moran T. H., Smedh U., Kinzig K. P., Scott K. A., Knipp S., Ladenheim E. E. : Peptide YY(3-36) inhibits gastric emptying and produces acute reductions in food intake in rhesus monkeys. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005 ; 288:R384–8
- Morand C., Remesy C., Demigne C. Fatty acids are potent modulators of lactate utilization in isolated hepatocytes from fed rats. *Am J Physiol* 1993. 264:E816-E823
- Morrison C.D., Morton G.J., Niswender K.D., Gelling R.W., Schwartz M.W. : Leptin inhibits hypothalamic Npy and Agrp gene expression via a mechanism that requires phosphatidylinositol 3-OH-kinase signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005 ; 289(6):E1051-7
- Morley J.E., Levine A.S., Gosnell B.A., Kneip J., Grace M. : Effect of neuropeptide Y on ingestive behaviors in the rat. *Am J Physiol* 1987 ; 252:R599-609
- Mounien L., Bizet P., Boutelet I., Vaudry H., Jégou S. : Expression of mélanocortin MC3 and MC4 receptor mRNA by neuropeptide Y neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* 2005 ; 82:164-170
- Mountjoy K.G., Mortrud M.T., Low M.J., Simerly R.B., Cone R.D. : Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol* 1994 ; 8(10):1298-308
- Mountjoy K.G., Kong P.L., Taylor J.A., Willard D.H., Wilkison W.O. Melanocortin receptor-mediated mobilization of intracellular free calcium in HEK293 cells. *Physiol Genomics.* 2001 ; 5(1):11-9.

Naslund E., Bogefors J., Skogar S., Gryback P., Jacobsson H., Holst J. J., Hellstrom P. M. : GLP-1 slows solid gastric emptying and inhibits insulin, glucagon, and PYY release in humans. *Am J Physiol* 1999 ; 277:R910-6

Nazarloo H.P., Nishiyama M., Tanaka Y., Asaba K., Hashimoto K. Down-regulation of corticotropin-releasing hormone receptor type 2beta mRNA expression in the rat cardiovascular system following food deprivation. *Regul Pept.* 2002 ; 105(2):121-9

Niswender K.D., Morrison C.D., Clegg D.J., Olson R., Baskin D.G., Myers M.G. Jr, Seeley R.J., Schwartz M.W. Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes.* 2003 ; 52(2):227-31

Nijenhuis W.A., Oosterom J., Adan R.A. AgRP(83-132) acts as an inverse agonist on the human-melanocortin-4 receptor. *Mol Endocrinol.* 2001 ; 15(1):164-71.

Nolles J.A., Van Straten E.M., Bremer B.I., Koopmanschap R.E., Verstegen M.W., Schreurs V.V. : Dietary amino acids fed in free form and as protein components do not differently affect postprandial plasma insulin, glucagon, growth hormone and corticosterone responses in rats. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2006 ; 90(7-8):289-99

Nonogaki K. : New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia* 2000 ; 43(5):533-49

Nonogaki K. and Iguchi A. : Role of central neural mechanisms in the regulation of hepatic glucose metabolism. *Life Sci* 1997 ; 60(11):797-807

Nordlie R.C., Foster J.D., Lange A.J. Regulation of glucose production by the liver. *Annu Rev Nutr.* 1999;19:379-406

Nordlie R.C., Arion W.J. Evidence for the common identity of glucose 6-phosphatase, inorganic pyrophosphatase, and pyrophosphate-glucose phosphotransferase. *J Biol Chem.* 1964 Jun;239:1680-5

Nordlie RC, Arion WJ, Glende EA Jr. Liver microsomal glucose 6-phosphatase, inorganic pyrophosphatase, and pyrophosphate-glucose phosphotransferase. IV. Effects of adrenalectomy and cortisone administration on activities assayed in the absence and presence of deoxycholate. *J Biol Chem.* 1965 ; 240(9):3479-84

Nuttall F.Q., Mooradian A.D., Gannon M.C., Billington C., Krezowski P. : Effect of protein ingestion on the glucose and insulin response to a standardized oral glucose load. *Diabetes Care* 1984 ; 7(5):465-70

Obici S., Feng Z., Karkanas G., Baskin D.G., Rossetti L. : Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci* 2002a ; 5(6):566-72

Obici S., Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* 2002b ; 51:271-5

Obici S., Zhang B.B., Karkanas G., Rossetti L. : Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med* 2002c ; 8(12):1376-82

O'Brien RM, Streeper RS, Ayala JE, Stadelmaier BT, Hornbuckle LA. Insulin-regulated gene expression. *Biochem Soc Trans.* 2001 ; 29(Pt 4):552-8

Ohneda A., Parada E., Eisentraut A. M., Unger R. H. : Characterization of response of circulating glucagon to intraduodenal and intravenous administration of amino acids. *J Clin Invest* 1968 ; 47(10):2305-22

Ollmann M.M., Wilson B.D., Yang Y.K., Kerns J.A., Chen Y., Gantz I., Barsh G.S. : Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 1997 ; 278(5335):135-8

Onuma H., Oeser J.K., Nelson B.A., Wang Y., Flemming B.P., Scheving L.A., Russell W.E., O'Brien R.M. Insulin and epidermal growth factor suppress basal glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene transcription through overlapping but distinct mechanisms. *Biochem J.* 2008

- Opherk C., Tronche F., Kellendonk C., Kohlmüller D., Schulze A., Schmid W., Schütz G. Inactivation of the glucocorticoid receptor in hepatocytes leads to fasting hypoglycemia and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Mol Endocrinol.* 2004 ; 18(6):1346-53
- Ottosson M., Vikman-Adolfsson K., Enerbäck S., Olivecrona G., Björntorp P. The effects of cortisol on the regulation of lipoprotein lipase activity in human adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994 ; 79(3):820-5
- Owen O.E., Felig P., Morgan A.P., Wahren J., Cahill G.F. Jr. Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. *J Clin Invest.* 1969 ; 48(3):574-83
- Pagliassotti M.J., Myers S.R., Moore M.C., Neal D.W., Cherrington A.D. : Magnitude of negative arterial-portal glucose gradient alters net hepatic glucose balance in conscious dogs. *Diabetes* 1991 ; 40(12):1659-68
- Pagliassotti M.J., Holste L.C., Moore M.C., Neal D.W., Cherrington A.D. : Comparison of the time courses of insulin and the portal signal on hepatic glucose and glycogen metabolism in the conscious dog. *J Clin Invest* 1996 ; 97(1):81-91
- Palou M., Sánchez J., Rodríguez A.M., Priego T., Picó C., Palou A. Induction of NPY/AgRP orexigenic peptide expression in rat hypothalamus is an early event in fasting: relationship with circulating leptin, insulin and glucose. *Cell Physiol Biochem.* 2009 ; 23(1-3):115-24
- Paolisso G., Tataranni P.A., Foley J.E., Bogardus C., Howard B.V., Ravussin E. A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia.* 1995 ; 38(10):1213-7
- Parkinson W.L., Weingarten H.P. Dissociative analysis of ventromedial hypothalamic obesity syndrome. *Am J Physiol* 1990 ; 259:R829–35.
- Perseghin G., Regalia E., Battezzati A., Vergani S., Pulvirenti A., Terruzzi I., Baratti D., Bozzetti F., Mazzaferro V., Luzi L. : Regulation of glucose homeostasis in humans with denervated livers. *J Clin Invest* 1997 ; 100(4):931-41
- Petersen K. F., Laurent D., Rothman D. L., Cline G. W., Shulman G. I. : Mechanism by which glucose and insulin inhibit net hepatic glycogenolysis in humans. *J Clin Invest* 1998 ; 101(6):1203-9
- Picckard Benoy M. and Elliott K.A. : The metabolism of lactic and pyruvic acids in normal and tumour tissues. Synthesis of carbohydrate. *Biochem J* 1937 ; 31:1268-75
- Pilkis S.J., El-Maghrabi M.R., Pilkis J., Claus T. Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate. *J Biol Chem* 1981 ; 256:3619-3622.
- Pinto S., Roseberry A.G., Liu H., Diano S., Shanabrough M., Cai X., Friedman J.M., Horvath T.L. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science.* 2004 ; 304(5667):110-5
- Plum L., Belgardt B.F., Brüning J.C. : Central insulin action in energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest* 2006 ; 116(7):1761-6
- Pocai A., Lam T.K., Gutierrez-Juarez R., Obici S., Schwartz G.J., Bryan J., Aguilar-Bryan L., Rossetti L. : Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature.* Nature 2005 ; 434:1026-31"
- Powley T.L. The ventromedial hypothalamic syndrome, satiety, and acephalic phase hypothesis. *Psychol Rev* 1977 ; 84:89– 126.
- Puhakainen I., Yki-Jarvinen H. Inhibition of lipolysis decreases lipid oxidation and gluconeogenesis from lactate but not fasting hyperglycemia or total hepatic glucose production in NIDDM. *Diabetes* 1993. 42:1694-1699
- Prager R., Wallace P., Olefsky J. M. : In vivo kinetics of insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output in normal and obese subjects. *J Clin Invest* 1986 ; 78(2):472-81

- Qian S., Chen H., Weingarth D., Trumbauer M.E., Novi D.E., Guan X., Yu H., Shen Z., Feng Y., Frazier E., Chen A., Camacho R.E., Shearman L.P., Gopal-Truter S., MacNeil D.J., Van der Ploeg L.H., Marsh D.J. Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. *Mol Cell Biol.* 2002 ; 22(14):5027-35
- Rabin B.M. Independence of food intake and obesity following ventromedial hypothalamic lesions in the rat. *Physiol Behav* 1974 ; 13:769– 72.
- Rajas F., Bruni N., Montano S., Zitoun C., Mithieux G. : The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology* 1999 ; 117(1):132-9
- Rajas F., Croset M., Zitoun C., Montano S., Mithieux G. : Induction of PEPCK gene expression in insulinopenia in rat small intestine. *Diabetes* 2000 ; 49(7):1165-8
- Rehfeld J. F. : Clinical endocrinology and metabolism. Cholecystokinin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2004 ; 18:569–86
- Rehfeld J. F., Sun G., Christensen T., Hillingso J. G. The predominant cholecystokinin in human plasma and intestine is cholecystokinin-33. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 ; 86:251–8
- Rehfeld J. F., Bungaard J. R., Friis-Hansen L., Goetze, J. P. : On the tissue-specific processing of procholecystokinin in the brain and gut—a short review. *J Physiol Pharmacol* 2003 ; 54:73–9
- Richter E. A., N. B. Ruderman H. Gavras E. R. Belur and H. Galbo. Muscle glycogenolysis during exercise: dual control by epinephrine and contractions. *Am. J. Physiol.* 242 (Endocrinol. Metab. 5): E25-E32, 1982
- Rivier C., Brownstein M., Spiess J., Rivier J., Vale W. In vivo corticotropin-releasing factor-induced secretion of adrenocorticotropin, beta-endorphin, and corticosterone. *Endocrinology.* 1982 ; 110(1):272-8.
- Rodgers R.J., Halford J.C.G, Nunes de Souza R.L., Canto de Souza A.L., Piper D.C., Arch J.R.S : Dose-response effects of orexin-A on food intake and the behavioural satiety sequence in rats. *Regul Pept* 2001 ; 96:71-84
- Rolls B.J., Hetherington M., Burley V.J. : The specificity of satiety: the influence of foods of different macronutrient content on the development of satiety. *Physiol Behav* 1988 ; 43(2):145-53
- Ropelle ER, Pauli JR, Fernandes MF, Rocco SA, Marin RM, Morari J, Souza KK, Dias MM, Gomes-Marcondes MC, Gontijo JA, Franchini KG, Velloso LA, Saad MJ, Carnevalheira JB. A central role for neuronal AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) in high-protein diet-induced weight loss. *Diabetes.* 2008 ; 57(3):594-605
- Rossetti L., Giaccari A., Barzilay N., Howard K., Sebel G., Hu M. : Mechanism by which hyperglycemia inhibits hepatic glucose production in conscious rats. Implications for the pathophysiology of fasting hyperglycemia in diabetes. *J Clin Invest* 1993 ; 92(3):1126-34
- Routh V. H. : Glucose-sensing neurons: are they physiologically relevant? *Physiol Behav* 2002 ; 76(3):403-13
- Russek M. Demonstration of the influence of an hepatic glucosensitive mechanism on food-intake. *Physiol Behav.* 1970 ; 5(10):1207-9
- Sainsbury A., Cusin I., Rohner-Jeanrenaud F., Jeanrenaud B. Adrenalectomy prevents the obesity syndrome produced by chronic central neuropeptide Y infusion in normal rats. *Diabetes.* 1997 ; 46(2):209-14.
- Sakurai T., Amemiya A., Ishii M., Matsuzaki I., Chemelli R.M., Tanaka H. : Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G-protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998 ; 92:573-85
- Saladin R., De Vos P., Guerre-Millo M., Leturque A., Girard J., Staels B., Auwerx J. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature.* 1995 ; 377(6549):527-9.

- Sato A., Suzuki H., Murakami M., Nakazato Y., Iwaita Y., Saruta T. Glucocorticoid increases angiotensin II type 1 receptor and its gene expression. *Hypertension*. 1994 ; 23(1):25-30.
- Schmoll D, Allan BB, Burchell A. Cloning and sequencing of the 5' region of the human glucose-6-phosphatase gene: transcriptional regulation by cAMP, insulin and glucocorticoids in H4IIE hepatoma cells. *FEBS Lett*. 1996 ; 383(1-2):63-6
- Schwartz M.W., Woods S.C., Porte D., Seeley R.J., Baskin D.G. : Central nervous system control and food intake. *Nature* 2000 ; 404:661-71
- Schwartz M.W., Sipols A.J., Marks J.L., Sanacora G., White J.D., Scheurink A., Kahn S.E., Baskin D.G., Woods S.C., Figlewicz D.P., et al : Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology* 1992 ; 130(6):3608-16
- Schwartz M.W., Woods S.C., Porte D. Jr, Seeley R.J., Baskin D.G. : Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000 ; 404(6778):661-71
- Scott D.K., Strömstedt P.E., Wang J.C., Granner D.K. : Further characterization of the glucocorticoid response unit in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. The role of the glucocorticoid receptor-binding sites. *Mol Endocrinol* 1998 ; 12(4):482-91
- Seo S., Ju S., Chung H., Lee D., Park S. Acute Effects of Glucagon-Like Peptide-1 on Hypothalamic Neuropeptide and AMP Activated Kinase Expression in Fasted Rats. *Endocr J*. 2008 ; 28
- Seufert J. Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. *Diabetes*. 2004 ; 53 : S152-8
- Shen C.P., Wu K.K., Shearman L.P., Camacho R., Tota M.R., Fong T.M., Van der Ploeg L.H. Plasma agouti-related protein level: a possible correlation with fasted and fed states in humans and rats. *J Neuroendocrinol*. 2002 ; 14(8):607-10
- Shigemitsu K, Tsujishita Y, Miyake H, Hidayat S, Tanaka N, Hara K, Yonezawa K: Structural requirement of leucine for activation of p70 S6 kinase. *FEBS Lett* 447:303–306, 1999
- Shimazu T. : Reciprocal innervation of the liver: its significance in metabolic control. *Adv Metab Disord* 1983 ; 10:355-84
- Shimazu T. : Innervation of the liver and glucoregulation: roles of the hypothalamus and autonomic nerves. *Nutrition* 1996 ; 12(1):65-6
- Shulman G. I., Liljenquist J. E., Williams P. E., Lacy W. W. : Glucose disposal during insulinopenia in somatostatin-treated dogs. The roles of glucose and glucagon. *J Clin Invest* 1978 ; 62(2):487-91
- Small C.J., Kim M.S., Stanley S.A., Mitchell J.R., Murphy K., Morgan D.G., Ghatel M.A., Bloom S.R. Effects of chronic central nervous system administration of agouti-related protein in pair-fed animals. *Diabetes*. 2001 ; 50(2):248-54.
- Smith B.K., York D.A., Bray G.A. : Effects of dietary preference and galanin administration in the paraventricular or amygdaloid nucleus on diet self-selection. *Brain Res Bull* 1996 ; 39(3):149-54
- Smith K.L., Gardiner J.V., Ward H.L., Kong W.M., Murphy K.G., Martin N.M., Ghatel M.A., Bloom S.R. Overexpression of CART in the PVN Increases Food Intake and Weight Gain in Rats. *Obesity* 2008 ; 31
- Smith S.R., De Jonge L., Pellymouther M., Nguyen T., Harris R., York D. : Peripheral administration of human corticotrophin-releasing hormone: a novel method to increase energy expenditure and fat oxidation in man. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 ; 86:1991-8
- Solano J. M. Jacobson L. : Glucocorticoids reverse leptin effects on food intake and body fat in mice without increasing NPY mRNA. *Am J Physiol* 1999 ; 277:E708-16

- Solomon J., Mayer J. The effect of adrenalectomy on the development of the obese-hyperglycemic syndrome in ob-ob mice. *Endocrinology*. 1973 ; 93(2):510-2
- Stafford J.M., Wilkinson J.C., Beechem J.M., Granner D.K. : Accessory factors facilitate the binding of glucocorticoid receptor to the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter. *J Biol Chem* 2001 ; 276(43):39885-91
- Stanley B.G., Thomas W.J. : Feeding responses to perifornical hypothalamic injection of neuropeptide Y in relation to circadian rhythms of eating behavior. *Peptides* 1993 ; 14(3):475-81
- Stanley B.G., Daniel D.R., Chin A.S., Leibowitz S.F. : Paraventricular nucleus injections of peptide YY and neuropeptide Y preferentially enhance carbohydrate ingestion. *Peptides* 1985 ; 6(6):1205-11
- Stanley SA, Small CJ, Murphy KG, Rayes E, Abbott CR, Seal LJ, Morgan DG, Sunter D, Dakin CL, Kim MS, Hunter R, Kuhar M, Ghatei MA, Bloom SR. Actions of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide on regulation of appetite and hypothalamo-pituitary axes in vitro and in vivo in male rats. *Brain Res*. 2001 ; 893(1-2):186-94
- Staszkiwicz J., Horswell R., Argyropoulos G. : Chronic consumption of a low-fat diet leads to increased hypothalamic agouti-related protein and reduced leptin. *Nutrition* 2007 ; 23(9):665-71
- Stellar E. : The physiology of motivation. *Psychol* 1954 ; 61(1): 5-22
- Stevenson R. W., Williams P. E., Cherrington A. D. : Role of glucagon suppression on gluconeogenesis during insulin treatment of the conscious diabetic dog. *Diabetologia* 1987 30(10):782-90
- Strassburg S., Anker S.D., Castaneda T.R., Burget L., Perez-Tilve D., Pfluger P.T., Nogueiras R., Halem H., Dong J.Z., Culler M.D., Datta R., and Tschöp M.H. Long-term effects of ghrelin and ghrelin receptor agonists on energy balance in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, Jul 2008 ; 295:E78 - E84
- Streeper R. S., Svitek C. A., Chapman S., Greenbaum L. E., Taub R. and O'Brien R. M. : A multicomponent insulin response sequence mediates a strong repression of mouse glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin. *J Biol Chem* 1997 ; 272(18):11698-701
- Stumvoll M., Meyer C., Mitrakou A., Gerich J. : Renal glucose production and utilization: new aspects in humans. *Diabetologia* 1997 ; 40:749-57
- Stumvoll M., Meyer C., Perriello G., Kreider M., Welle S., Gerich J. : Human kidney and liver gluconeogenesis: evidence for organ substrate selectivity. *Am J Physiol (Endocrinol Metab)* 1998a ; E817-26
- Stumvoll M., Meyer C., Kreider M., Perriello G., Gerich J. Effects of glucagon on renal and hepatic glutamine gluconeogenesis in normal postabsorptive humans. *Metabolism*. 1998b ; 47(10):1227-32
- Tachibana T., Takagi T., Tomonaga S., Ohgushi A., Ando R., Denbow D.M., Furuse M. Central administration of cocaine- and amphetamine-regulated transcript inhibits food intake in chicks. *Neurosci Lett*. 2003 ; 13;337(3):131-4
- Takayama K., John Y., Hayashi K., Yakabi K., Tanaka T., Ro S. : Expression of c-Fos protein in the brain after intravenous injection of ghrelin in rats. *Neurosci Lett* 2007 ; 417(3):292-6
- Tempel D.L., Leibowitz K.J., Leibowitz S.F. : Effects of PVN galanin on macronutrient selection. *Peptides* 1988 ; 9(2):309-14
- Ter Horst G.J., de Boer P., Luiten P.G., van Willigen J.D.. Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A Phaseolus vulgaris lectin tracing study in the rat. *Neuroscience*. 1989 ; 31(3):785-97.
- Tessari P., Garibotto G. : Interorgan amino acid exchange. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000 ; 3(1):51-7

- Theander-Carrillo C., Wiedmer P., Cettour-Rose P., Nogueiras R., Perez-Tilve D., Pfluger P., Castaneda T.R., Muzzin P., Schürmann A., Szanto I., Tschöp M.H., Rohner-Jeanrenaud F. : Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *J Clin Invest* 2006 ; 116(7):1983-93
- Thorens B., Larsen P.J. : Gut-derived signaling molecules and vagal afferents in the control of glucose and energy homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004 ; 7(4):471-8
- Tobin V., Le Gall M., Fioramonti X., Stolarczyk E., Blazquez A.G., Klein C., Prigent M., Serradas P., Cuif M.H., Magnan C., Leturque A., Brot-Laroche E. Insulin internalizes GLUT2 in the enterocytes of healthy but not insulin-resistant mice. *Diabetes*. 2008 ; 57(3):555-62
- Tokunaga C, Yoshino K, Yonezawa K. mTOR integrates amino acid- and energy-sensing pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 ;313(2):443-6.
- Tolle V., Kadem M., Bluet-Pajot M.T., Frere D., Foulon C., Bossu C. : Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin woman. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 ; 88:109-16
- Tolle V., Low M.J. : In Vivo Evidence for Inverse Agonism of Agouti-Related Peptide in the Central Nervous System of Proopiomelanocortin-Deficient Mice. *Diabetes* 2008 ; 57:86-94
- Tordoff M.G., Friedman M.I. : Hepatic portal glucose infusions decrease food intake and increase food preference. *Am J Physiol* 1986 ; 25:R192-6
- Tordoff M.G., Tluczek J.P., Friedman M.I. : Effect of hepatic portal glucose concentration on food intake and metabolism. *Am J Physiol* 1989 ; 257:R1474-80
- Trinh K.Y., O'Doherty R.M., Anderson P., Lange A.J., Newgard C.B. : Perturbation of fuel homeostasis caused by overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in liver of normal rats. *J Biol Chem* 1998 ; 273(47):32615-20
- Tschop M., Smiley D.L., Heiman M.L. : Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2001 ; 407:908-13
- Turton M.D., O'Shea D., Gunn I., Beak S.A., Edwards C.M., Meeran K., Choi S.J., Taylor G.M., Heath M.M., Lambert P.D., Wilding J.P., Smith D.M., Ghatgei M.A., Herbert J., Bloom S.R. : A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 1996 ; 379(6560):69-72
- Unger R.H. : Glucagon physiology and patophysiology in the light of new advances. *Diabetologia* 1985 ; 28:574-8
- Vander Kooi B.T., Streeper R.S., Svitek C.A., Oeser J.K., Powell D.R., O'Brien R.M. The three insulin response sequences in the glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene promoter are functionally distinct. *J Biol Chem*. 2003 ; 278(14):11782-93
- Vander Kooi B.T., Onuma H., Oeser J.K., Svitek C.A., Allen S.R., Vander Kooi C.W., Chazin W.J., O'Brien R.M. The glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene promoter contains both positive and negative glucocorticoid response elements. *Mol Endocrinol*. 2005 ; 19(12):3001-22
- van der Kooy D., Koda L.Y., McGinty J.F., Gerfen C.R., Bloom F.E.. The organization of projections from the cortex, amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat. *J Comp Neurol*. 1984 ; 224(1):1-24.
- van Schaftingen E., Hers H. Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-biphosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981 ; 78:2861-2863.
- van Schaftingen E., Gerin I. The glucose-6-phosphatase system. *Biochem J* 2002 ; 362:513–532
- Vasta V., Bruni P., Vannini F., Farnararo M. Fructose 2,6-bisphosphate and insulin stimulation of glycolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Int J Biochem*. 1989 ; 21(12):1359-63

- Veiga-da-Cunha M, Gerin I, Van Schaftingen E. How many forms of glycogen storage disease type I? *Eur J Pediatr.* 2000 ; 159(5):314-8
- Venkatraman J.T., Pehowich D., Singh B., Rajotte R.V., Thomson A.B., Clandinin M.T. Effect of dietary fat on diabetes-induced changes in liver microsomal fatty acid composition and glucose-6-phosphatase activity in rats. *Lipids* 1991 ; 26(6):441-4
- Vettor R., Fabris R., Pagano C., Federspil G., : Neuroendocrine regulation of eating behaviour. *J Endocrinol Invest* 2002 ; 25:836-54
- Villar-Palasi C., and Larner J. Glycogen metabolism and glycolytic enzymes. In: *Annual Review of Biochemistry*, edited by E. E. Snell. Palo Alto, CA: Annual Reviews, 1976, vol. 39, p. 639-672.
- Van Vugt D.A., Lujan M.E., Froats M., Krzemien A., Couceyro P.R., Reid R.L. Effect of Fasting on Cocaine-Amphetamine-Regulated Transcript, Neuropeptide Y, and Leptin Receptor Expression in the Non-Human Primate Hypothalamus. *Neuroendocrinology* 2006 ; 84:83-93
- Westphal S., Kästner S., Taneva E., Leodolter A., Dierkes J., Luley C. : Postprandial lipid and carbohydrate responses after the ingestion of a casein-enriched mixed meal. *Am J Clin Nutr* 2004 ; 80(2):284-90
- Wilding J. P., Gilbey S. G., Bailey C. J., Batt R. A., Williams G., Ghatei M. A. and Bloom S. R. : Increased neuropeptide-Y messenger ribonucleic acid (mRNA) and decreased neurotensin mRNA in the hypothalamus of the obese (ob/ob) mouse. *Endocrinology* 1993 ; 132(5):1939-44
- Williams D.L., Baskin D.G., Schwartz M.W. : Leptin regulation of the anorexic response to glucagon-like Peptide-1 receptor stimulation. *Diabetes* 2006 ; 55(12):3387-93
- Williams G., Bing C., Cai X. J., Harrold J. A., King P. J., Liu X. H. : The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav* 2001 ; 74(4-5):683-701
- Williams G., Cai X.J., Elliot J.C., Harrold J.A. Anabolic neuropeptides. *Physiol Behav* 2004 ; 81:211-22
- Williamsson J.F., Kreisberg R.A., Felts P.W. Mechanisms for the stimulation of gluconeogenesis by fatty acids in perfused rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1966. 6:247-254
- Windmueller H.G. : Metabolism of vascular and luminal glutamine by intestinal mucosa in vivo. In : *Glutamine metabolism in mammalian tissues* (Haüssinger D., Sies H., ed.) 1984 Springer-Verlag Berlin ; vol. 61-67
- Windmueller H.G. and Spaeth A.E. : Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine. *J Biol Chem* 1974 ; 249:5070-9
- Wojtaszewski J.F., Lynge J., Jakobsen A.B., Goodyear L.J., Richter E.A. Differential regulation of MAP kinase by contraction and insulin in skeletal muscle: metabolic implications. *Am J Physiol.* 1999 ; 277 :E724-32
- Wood I.S., Trayhurn P. : Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* 2003 ; 89(1):3-9
- Woods S.C. : Gastrointestinal satiety signals. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004 ; 286:G7-G13.
- Woods S.C., Lotter E.C., McKay L.D., Porte Jr D. : Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 1979 ; 282:503-5.
- Woods SC, Seeley RJ, Cota D. Regulation of food intake through hypothalamic signaling networks involving mTOR. *Annu Rev Nutr.* 2008 ; 28:295-311.
- Wortley K.E., Anderson K.D., Yasenachak J., Murphy A., Valenzuela D., Diano S., Yancopoulos G.D., Wiegand S.J., Sleeman M.W. Agouti-related protein-deficient mice display an age-related lean phenotype. *Cell Metab.* 2005 ; 2(6):421-7.

- Wren A.M., Seal L.J., Cohen M.A., Brynes A.E., Frost G.S., Murphy K.G. : Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 ; 86:5992-5
- Wu C., Okar D.A., Newgard C.B., Lange A.J. Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase in mouse liver lowers blood glucose by suppressing hepatic glucose production. *J Clin Invest.* 2001 Jan;107(1):91-8
- Wu C., Okar D.A., Stoeckman A.K., Peng L.J., Herrera A.H., Herrera J.E., Towle H.C., Lange A.J. A potential role for fructose-2,6-bisphosphate in the stimulation of hepatic glucokinase gene expression. *Endocrinology.* 2004 ; 145(2):650-8
- Xiao E., Xia-Zhang L., Vulliémoz N.R., Ferin M., Wardlaw S.L. Agouti-related protein stimulates the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and enhances the HPA response to interleukin-1 in the primate. *Endocrinology.* 2003 ; 144(5):1736-41.
- Xue C., Aspelund G., Sritharan K.C., Wang J.P., Slezak L.A., Andersen D.K. Isolated hepatic cholinergic denervation impairs glucose and glycogen metabolism. *J Surg Res.* 2000 ; 90(1):19-25
- Yamauchi T., Kamon J., Minokoshi Y., Ito Y., Waki H., Uchida S., Yamashita S., Noda M., Kita S., Ueki K., Eto K., Akanuma Y., Froguel P., Foufelle F., Ferre P., Carling D., Kimura S., Nagai R., Kahn B.B., Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 2002 Nov;8(11):1288-95
- Yaswen L., Diehl N., Brennan M.B., Hochgeschwender U. : Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med* 1999 ; 5(9):1066-70
- Zakrzewska K.E., Cusin I., Sainsbury A., Rohner-Jeanrenaud F., Jeanrenaud B. Glucocorticoids as counterregulatory hormones of leptin: toward an understanding of leptin resistance. *Diabetes.* 1997 ; 46(4):717-9
- Zhang Y., Proenca R., Maffei M. Barone, M., Leopold L., Friedman J. M. ; Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994 ; 372(6505):425-32
- Zinker B., Mika A., Nguyen P., Wilcox D., Ohman L., von Geldern T.W., Opgenorth T., Jacobson P. : Liver-selective glucocorticoid receptor antagonism decreases glucose production and increases glucose disposal, ameliorating insulin resistance. *Metabolism* 2007 ; 56(3):380-7
- Zorzano A., Munoz P., Camps M., Mora C., Testar X., Palacín M. : Insulin-induced redistribution of GLUT4 glucose carriers in the muscle fiber. In search of GLUT4 trafficking pathways. *Diabetes* 1996 ; 45:S70-81

TRAVAUX PERSONNELS

PUBLICATIONS :

B. PILLOT, M. SOTY, A. GAUTIER-STEIN, C. ZITOUN, G. MITHIEUX : Protein feeding promotes redistribution of endogenous glucose production to the kidney and potentiates its suppression by insulin. *Endocrinology* 2008

S. TROY, M. SOTY, L. RIBEIRO, L. LAVAL, S. MIGRENNE, X FIORAMONTI, B. PILLOT, V FAUVEAU, R AUBERT, B. VIOLLET, M. FORETZ, J LECLERC, A. DUCHAMPT, C ZITOUN, B. THORENS, C. MAGNAN, G. MITHIEUX, F. ANDREELLI. : Intestinal gluconeogenesis is a key factor for early metabolic changes after gastric bypass but not after gastric lap-band in mice. *Cell. Metab.* 2008, 8:201-11

F. ANDREELLI, M. FORETZ, C. KNAUF, P.D. CANI, C. PERRIN, M.A. IGLESIAS, B.PILLOT, A. BADO, F. TRONCHE, G. MITHIEUX, S. VAULONT, R. BURCELIN, B. VIOLLET : Liver adenosine monophosphate-activated kinase-alpha2 catalytic subunit is a key target for the control of hepatic glucose production by adiponectin and leptin but not insulin. *Endocrinology* 2006, 147 : 2432-2441

G. MITHIEUX, P. MISERY, C. MAGNAN, B. PILLOT, A. GAUTIER-STEIN, C. BERNARD, F. RAJAS and C. ZITOUN : Portal sensing of intestinal gluconeogenesis is a mechanistic link in the diminution of food intake induced by diet protein. *Cell Metab.* 2005, 2 : 321 – 329

COMMUNICATIONS :

B. PILLOT, P. MISERY, C. ZITOUN, F. RAJAS, G. MITHIEUX : *Régulation nutritionnelle de la néoglucogenèse extra-hépatique à l'état nourri : rôle des protéines.* Congrès de l'ALFEDIAM, Lyon, Mars 2005, Communication affichée

B. PILLOT, P. MISERY, C. ZITOUN, F. RAJAS, G. MITHIEUX : *Les protéines alimentaires modifient la régulation inter-organe de la production de glucose.* Congrès de la SFNEP / CFGN / GFHGNP, Bordeaux, Décembre 2005, Communication affichée

B. PILLOT, C. ZITOUN, F. RAJAS, G. MITHIEUX : *Redistribution inter-organe de la production de glucose, sous l'action des protéines alimentaires.* Congrès de l'ALFEDIAM, Paris, Mars 2006, **Communication orale**

B.PILLOT, C. ZITOUN, F. RAJAS, G. MITHIEUX : *Rôle de la nature des protéines : un pas dans la compréhension du mécanisme d'action des protéines alimentaires*. Congrès de la SFN, Nice, novembre 2006, Communication affichée

B.PILLOT, C. ZITOUN, F. RAJAS, G. MITHIEUX : *Rôle de la nature des protéines alimentaires dans leur mécanisme d'action dans l'homéostasie glucidique*. Congrès du GLGL, Archamp, mars 2007, **Communication orale**

B.PILLOT, C. ZITOUN, F. RAJAS, G. MITHIEUX : *Rôle de la nature des protéines alimentaires dans leur mécanisme d'action dans l'homéostasie glucidique*. Congrès de l'ALFEDIAM-SFE, Marseille, mars 2007, Communication affichée

B.PILLOT, M. SOTY, A. GAUTIER-STEIN, C. ZITOUN, F. RAJAS, G. MITHIEUX : *Effets des protéines alimentaires sur la production endogène de glucose et la sensibilité à l'insuline*. Congrès de l'ALFEDIAM, Bruxelles, mars 2008, **Communication orale**

B.PILLOT, M. SOTY, A. GAUTIER-STEIN, C. ZITOUN, F. RAJAS, G. MITHIEUX : *Effets des protéines alimentaires sur la production endogène de glucose et la sensibilité à l'insuline*. Congrès du GLGL, Grenoble, mai 2008, **Communication orale**

B.PILLOT, M. SOTY, A. GAUTIER-STEIN, C. ZITOUN, F. RAJAS, G. MITHIEUX : *effects of food protein on repartition of endogenous glucose production among gluconeogenic organs and on its sensitivity to insulin*. Congrès de l'EASD, Rome, septembre 2008, Communication affichée

ANNEXES

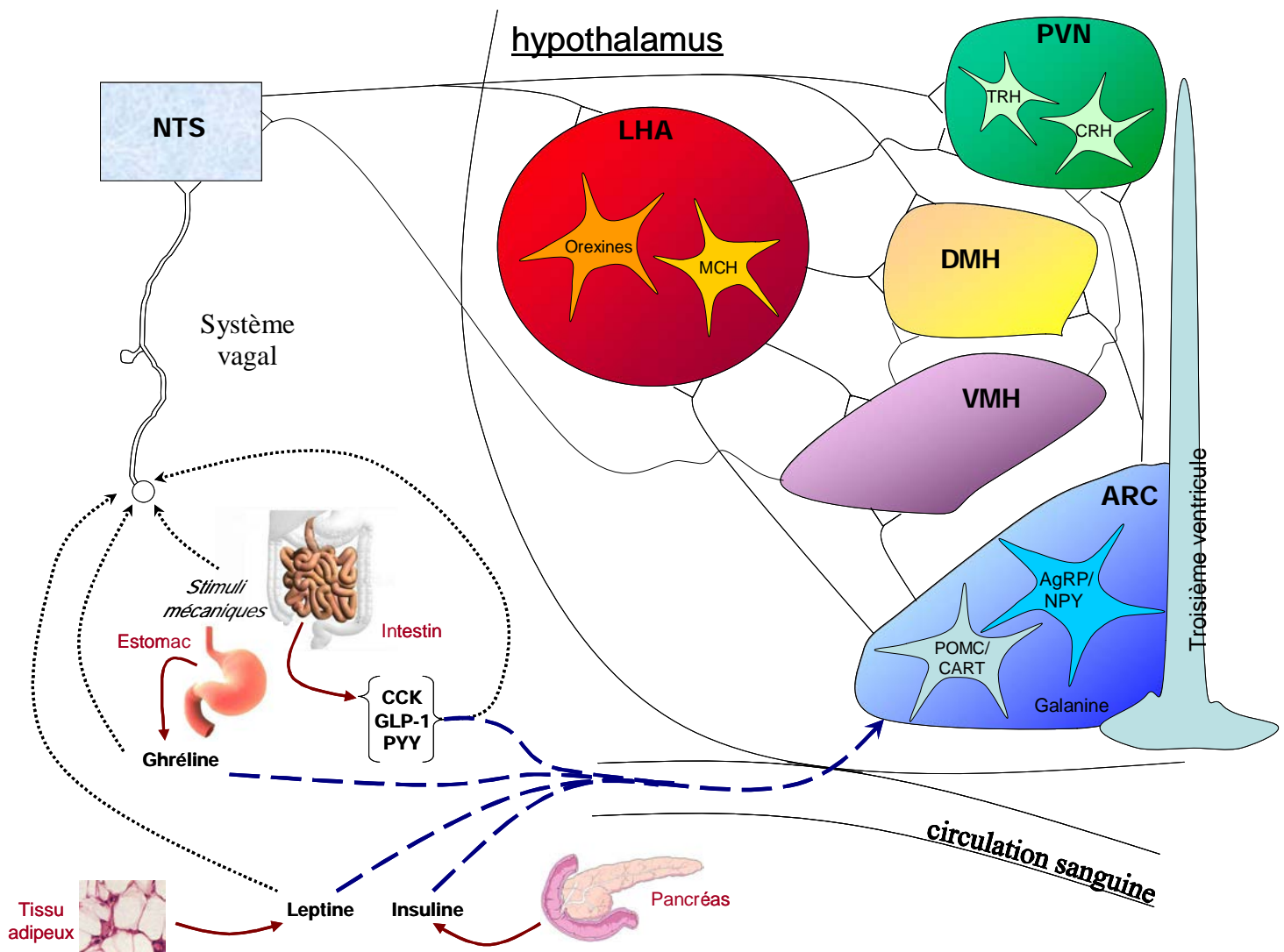


Figure I : Structures de l'hypothalamus , interactions entre les différentes populations neuronales et présentation des principaux signaux périphériques. *NTS* : noyau du tractus solitaire ; *LHA* : aires hypothalamiques latérales ; *PVN* : noyau paraventriculaire ; *DMH* : hypothalamus dorsomédian ; *VMH* : hypothalamus ventromédian ; *ARC* : noyau arqué ; *TRH* : thyrotropin-releasing hormone ; *CRH* : corticotropin-releasing hormone ; *MCH* : melanin concentrating hormone ; *AgRP* : agouti related protein ; *NPY* : neuropeptide Y ; *POMC* : pro-opiomélanocortine ; *CART* : cocaine-and-amphetamine-regulated-transcript ; *CCK* : cholecystokinine ; *GLP-1* : glucagon-like peptide 1 ; *PYY* : peptide YY.

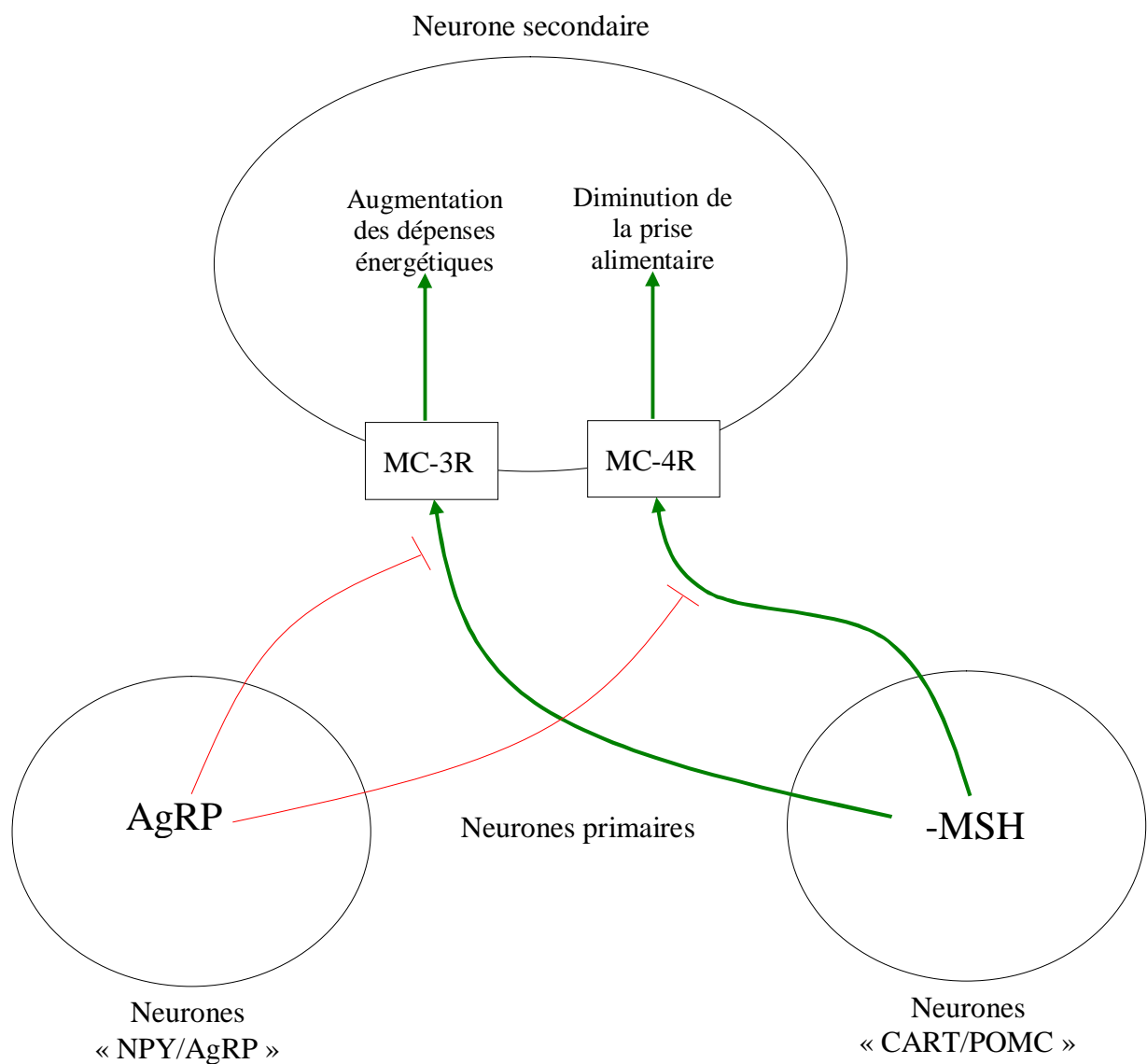


Figure II : Description simplifiée du système mélanocortinergique. *AgRP* : *agouti related protein* ; *NPY* : *neuropeptide Y* ; *POMC* : *pro-opiomélanocortine* ; *CART* : *cocaine-and-amphetamine-regulated-transcript* ; *-MSH* : *melanocyte-stimulating hormone-* ; *MC3-4R* : *recepteurs aux mélanocortines de type 3-4*.

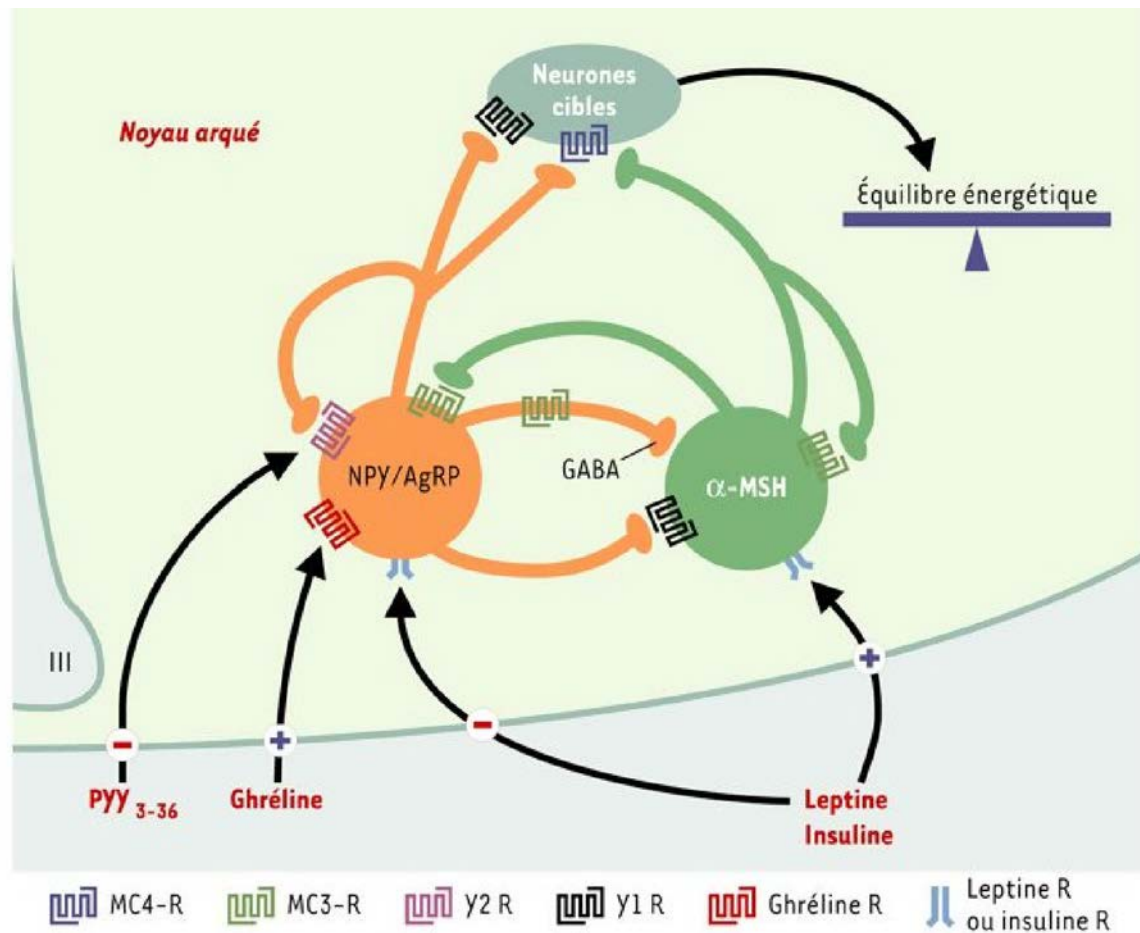


Figure III : Interactions entre les populations neuronales de premier ordre (NPY/AgRP et α-MSH). *NPY* : neuropeptide Y ; *AgRP* : agouti-related protein ; *MC3-AR* : récepteurs aux mélanocortines de type 3-4 ; *PYY* : peptide YY ; *α-MSH* : melanocyte-stimulating hormone .

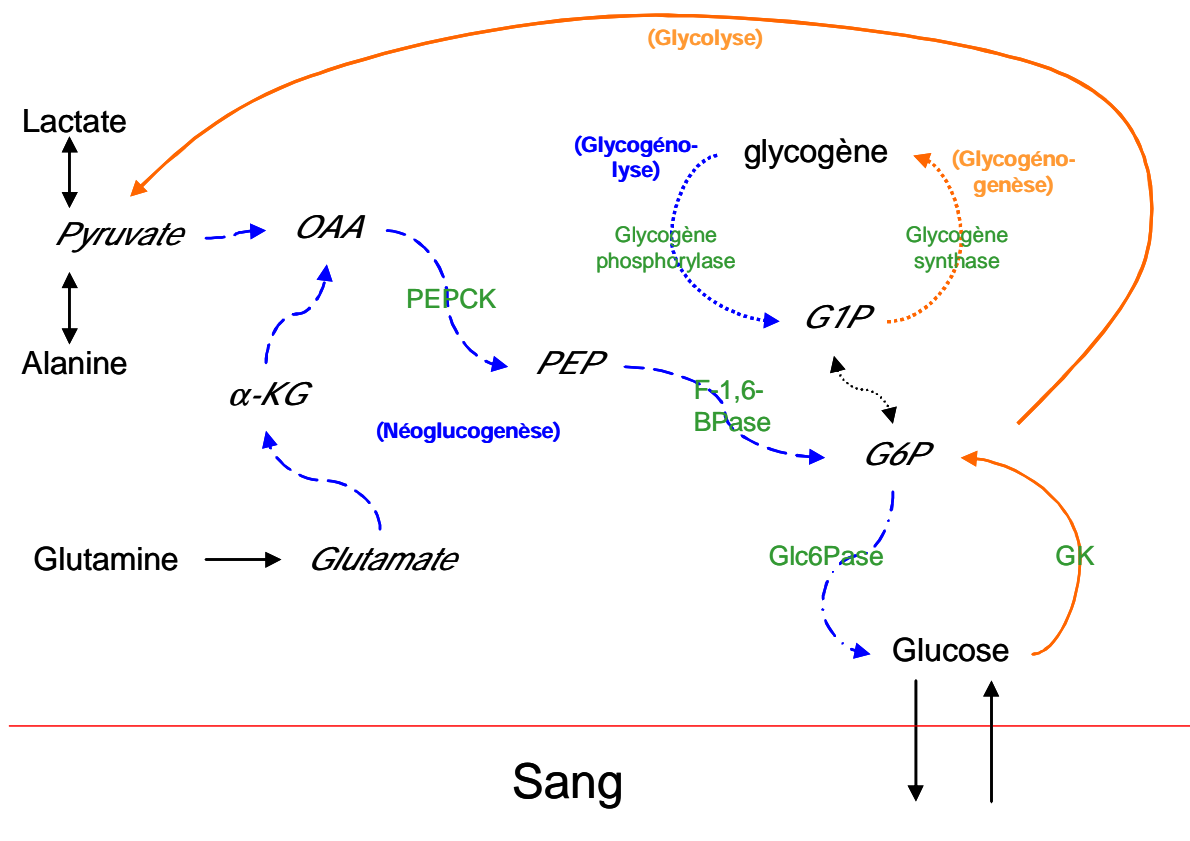


Figure IV : Voies métaboliques impliquées dans la production de glucose.

En vert : les enzymes clés impliquées dans les régulations des différentes voies.

En bleu : voies de synthèse du glucose, qui sont :

- induites en particulier par l'insuline et le Fructose-2,6-bisphosphate
- inhibées principalement par le glucagon.

En orange : voies d'utilisation du glucose, qui sont :

- induites notamment par les glucocorticoïdes et le glucagon
- inhibées principalement par l'insuline, la leptine et l'adiponectine.

F-1,6-BPase : Fructose-1,6-bisphosphatase ; G1P : glucose-1 phosphate ; G6P : glucose-6 phosphate ; GK : glucokinase ; PEPCK : phosphoenolpyruvate carboxykinase ; Glc-6Pase : glucose-6 phosphatase ; PEP : phosphoenolpyruvate ; OAA : oxaloacétate ; KG : -cetoglutarate. Les précurseurs de la voie néoglucogénique sont principalement l'alanine et le lactate dans le foie et la glutamine dans l'intestin et le rein.

	Nom	Effet sur la prise alimentaire	Effet d'un jeune court (<24h)	Effet d'un jeune prolongé (>48h)
Neuropeptides	α -MSH	anorexigène	Pas d'effet (Palou et al. 2009)	Inhibition (Lechan et al. 2006 ; Inui et al. 2008)
	CART	anorexigène	Pas d'effet (Palou et al. 2009)	Inhibition (van Vugt et al. 2006 ; Inui et al. 2008)
	CRH	anorexigène	/	Inhibition (Nazarloo et al. 2002)
	TRH	anorexigène	/	Inhibition (Lechan et al. 2006)
	Orexines		/	Induction (Komaki et al. 2001)
	AgRP	orexigène	Induction, maximum à 4h de jeûne (Palou et al. 2009)	Induction (Bertile et al. 2005 ; Inui et al. 2008)
	NPY	orexigène	Induction, maximum à 4h de jeûne (Palou et al. 2009)	Induction (ven Vugt et al. 2006 ; Inui et al. 2008)
	MCH	orexigène	/	Pas d'effet (48h de jeûne : Inui et al. 2008) ou Induction (>48h de jeûne Bertile et al.

Tableau II : Principaux neuropeptides impliqués dans la régulation de la prise alimentaire et leur régulation par le jeûne. *-MSH : melanocyte-stimulating hormone- ; CART : cocaine-and-amphetamine-regulated-transcript ; CRH : corticotropin-releasing hormone ; TRH : thyrotropin-releasing hormone ; AgRP : agouti related protein ; NPY : neuropeptide Y ; MCH : melanin concentrating hormone.*

	Nom	Effet sur la prise alimentaire / autres fonctions importantes	Principal site de synthèse
Hormones	Insuline	Anorexigène / régule la glycémie	Cellules β du pancréas
	Leptine	Anorexigène	Adipocytes
	CCK	Anorexigène / ralentit la vidange gastrique, inhibe les sécrétions gastriques	Cellules I du duodenum et jejunum
	GLP-1	Anorexigène / potentialise l'action du glucose sur la sécrétion d'insuline	Cellules L de l'intestin distal et du colon
	PYY	Anorexigène / réduit la motilité intestinale	Cellules L de l'intestin distal et du colon
	Ghréline	Orexigène / stimule la motilité gastrique	Estomac

Tableau III : Principales hormones impliquées dans la régulation de la prise alimentaire.
CCK : cholecystokinine ; GLP-1 : glucagon-like peptide 1 ; PYY : peptide YY;

	Nom	Localisation principale	Rôles principaux
Récepteurs	MC1-R	Mélanocytes	Pigmentation
	MC2-R	Cortex adrénal	Stéroidogenèse
	MC3-R	Système nerveux central, tractus gastrointestinal, rein	Balance énergétique, natriurie
	MC4-R	Système nerveux central	Prise alimentaire, fonction érectile
	MC5-R	Cellules endocrines	Synthèse et sécrétion des produits des glandes exocrines

Tableau I : Principales caractéristiques des récepteurs aux mélanocortines. *MC1-5R* : récepteurs aux mélanocortines de type 1-5.

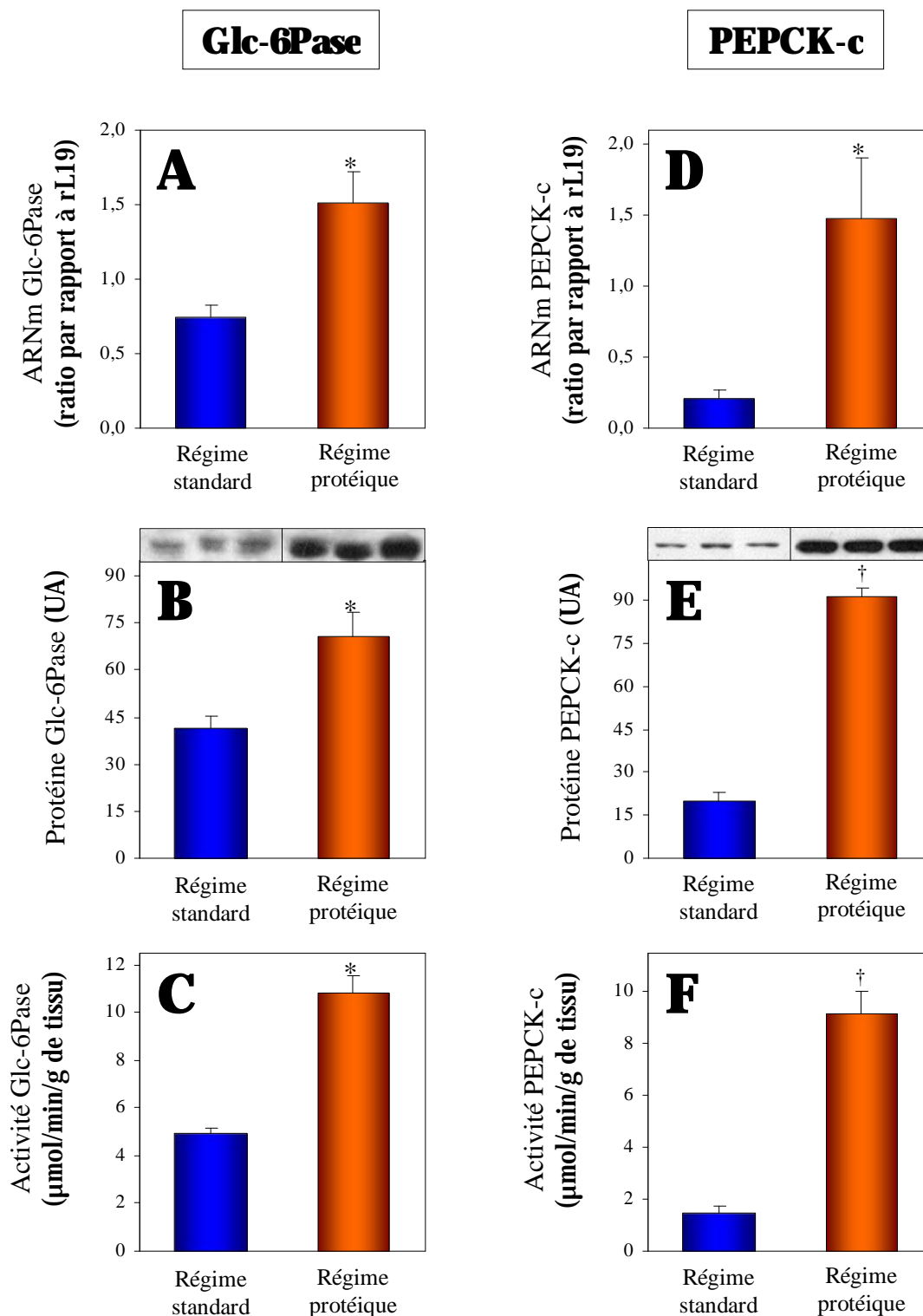


Figure 1a : Analyse de l'expression des gènes néoglucogéniques dans le rein de rats nourris par un régime standard ou enrichi en protéines. **A** et **D** : ARNm de la Glc-6Pase et de la PEPCK-c respectivement, normalisés avec l'ARNm de rL19 (n=4). **B** et **E** : Quantification par Western blot des protéines Glc-6Pase et PEPCK-c respectivement (panneau supérieur : film photographique représentatif avec trois animaux dans chaque groupe). **C** et **F** : Activités Glc-6Pase et PEPCK-c respectivement, mesurées à la Vmax des enzymes (n=5). Les données sont présentées en valeur \pm SEM.

** , †, significativement différents de la valeur en régime standard, $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement (test t non apparié)*

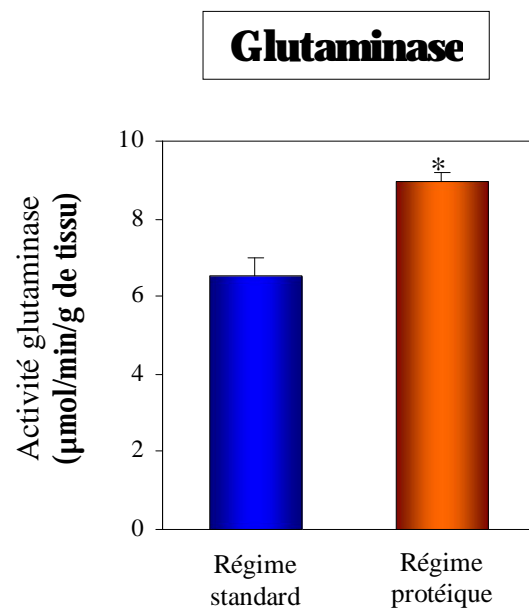


Figure 1b : Effet du régime riche en protéines sur l'activité de la glutaminase, mesurée à la Vmax (n=5). Les données sont présentées en valeur \pm SEM.
***, significativement différents de la valeur en régime standard, $p < 0,05$ (test *t* non apparié)

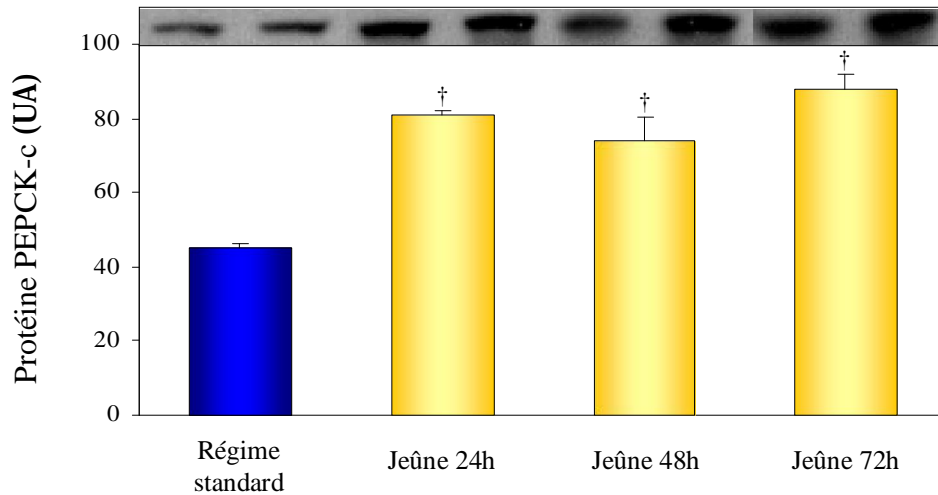


Figure 2 : Effet du jeûne sur la quantité de PEPCK-c dans le rein. Quantification par Western blot de la protéine PEPCK-c (n=3) (panneau supérieur : film photographique représentatif avec deux animaux dans chaque groupe). Les données sont présentées en valeur \pm SEM.

†, significativement différents de la valeur en régime standard, $p < 0,01$ (test t non apparié)

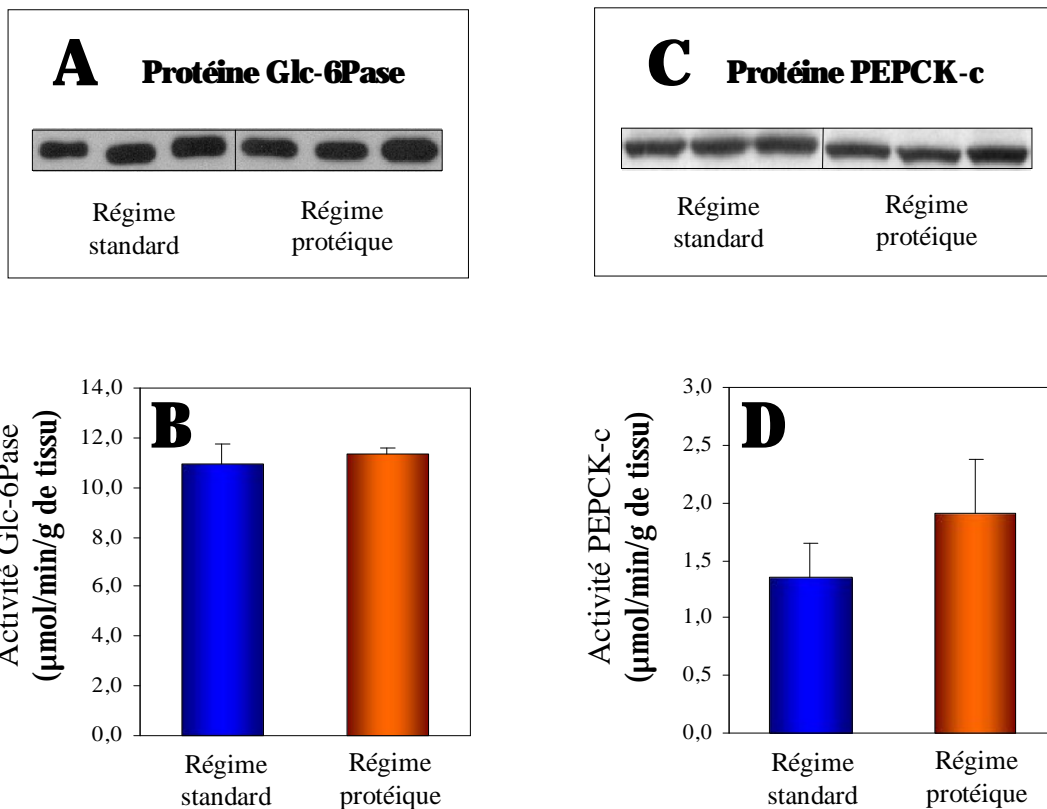


Figure 3 : Analyse des gènes néoglucogéniques hépatiques de rats nourris par un régime standard ou enrichi en protéines. **A** et **C** : film photographique représentatif de l'analyse en Western blot de la quantité de protéines de le Glc-6Pase et de la PEPCK-c respectivement (n=3). **B** et **D** : Activités Glc-6Pase et PEPCK-c respectivement, mesurées à la Vmax des enzymes (n=5). Les données sont présentées en valeur \pm SEM.

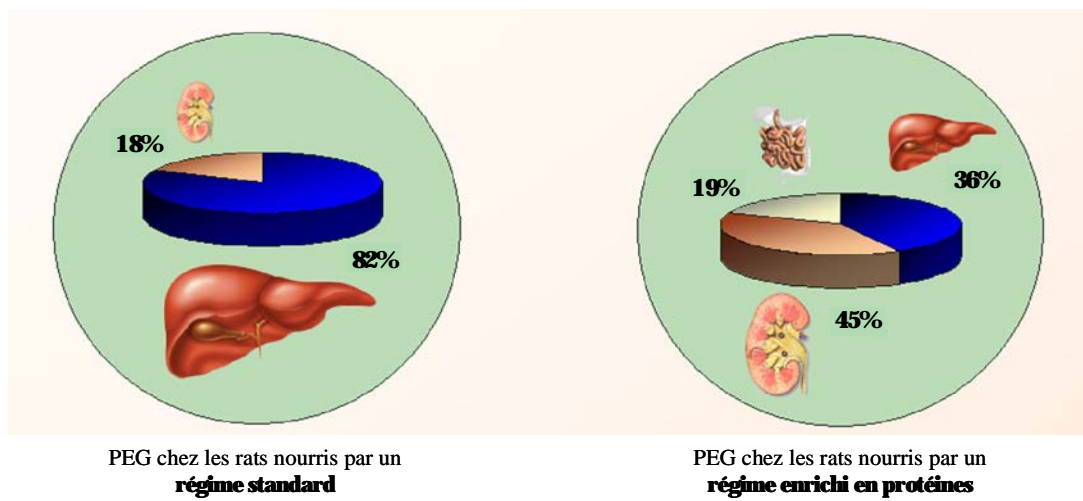


Figure 4 : Estimation de la part respective de chaque organe glucoformateur dans la production endogène totale de glucose.

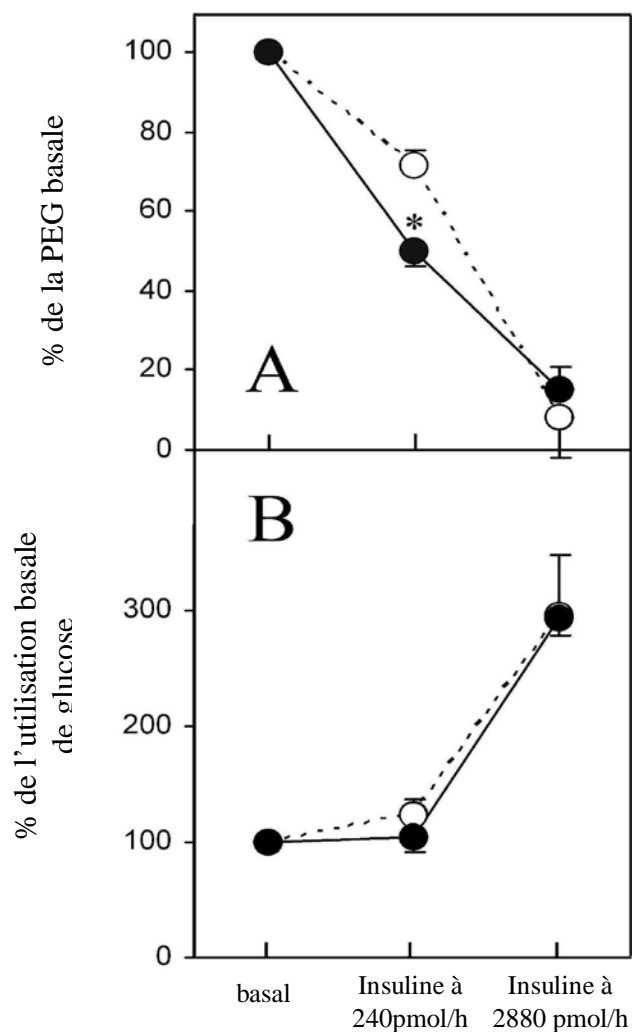


Figure 5 : Effet de l'insuline sur les flux de glucose chez les rats nourris en régime standard (pointillés) et les rats nourris en régime protéique (lignes pleines) et maintenus en euglycémie. **A** et **B** : les PEG et l'utilisation du glucose ont été déterminées comme décrit dans le texte. La PEG et l'utilisation de glucose à l'état basal étaient $75 \pm 2 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{mn}^{-1}$ and $80 \pm 5 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{mn}^{-1}$, chez les rats nourris par le régime standard et les rats nourris par le régime protéique respectivement. Les données sont présentées en valeur \pm SEM.

** , statistiquement différent de la valeur des rats nourris par le régime standard, $p < 0,05$ (test t de student, non apparié)*

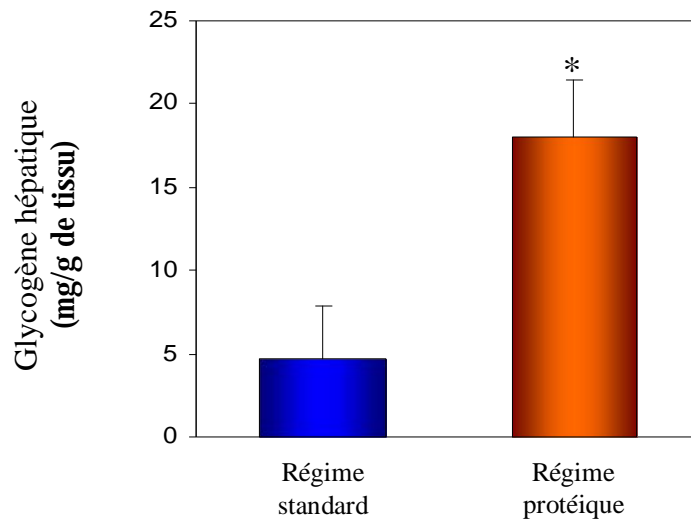


Figure 6 : Contenu du foie en glycogène chez des rats nourris par les régime standard ou protéique, après un clamp à faible dose d'insuline perfusée (240pmol/h) (n=4). Les données sont présentées en valeur \pm SEM.

f, significativement différents de la valeur en régime standard, $p < 0,01$ (test t non apparié)

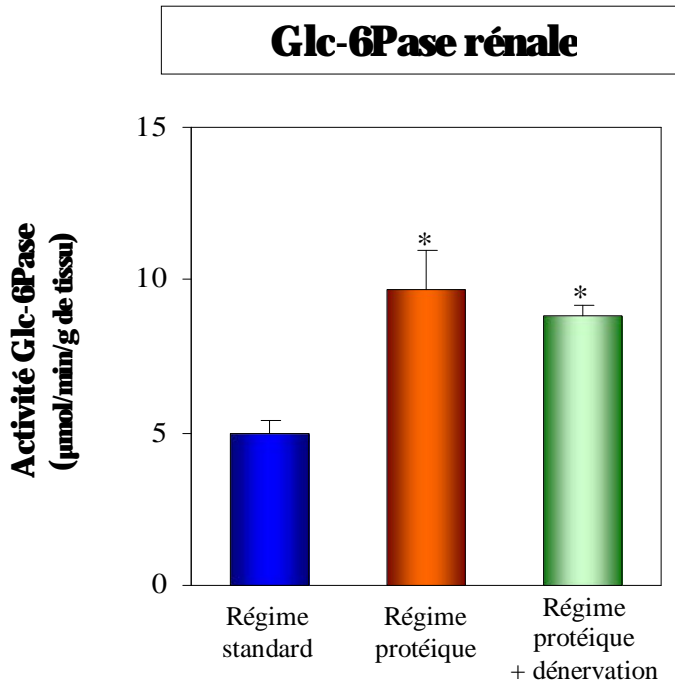


Figure 7 : Effet d'une dénervation portale sur l'activité Glc-6Pase rénale. Activité de la Glc-6Pase, mesurée à la Vmax (n=5). Les données sont présentées en valeur ± SEM. *, *significativement différents de la valeur en régime standard, p<0,05 et p<0,01 respectivement (test t non apparié)*

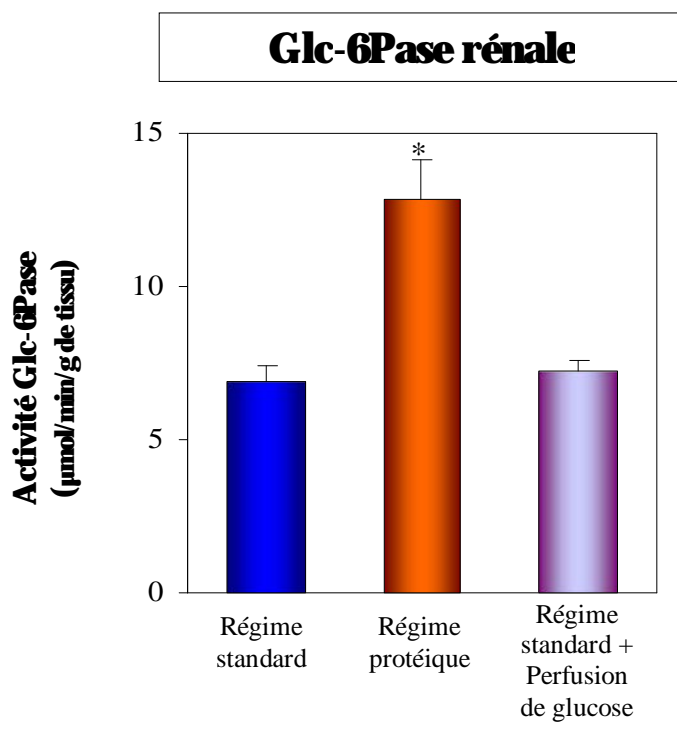


Figure 8 : Effet d'une perfusion portale de glucose sur l'activité Glc-6Pase rénale. Activité de la Glc-6Pase, mesurée à la Vmax (n=5). Les données sont présentées en valeur ± SEM. *, *significativement différents de la valeur en régime standard, p<0,05 et p<0,01 respectivement (test t non apparié)*

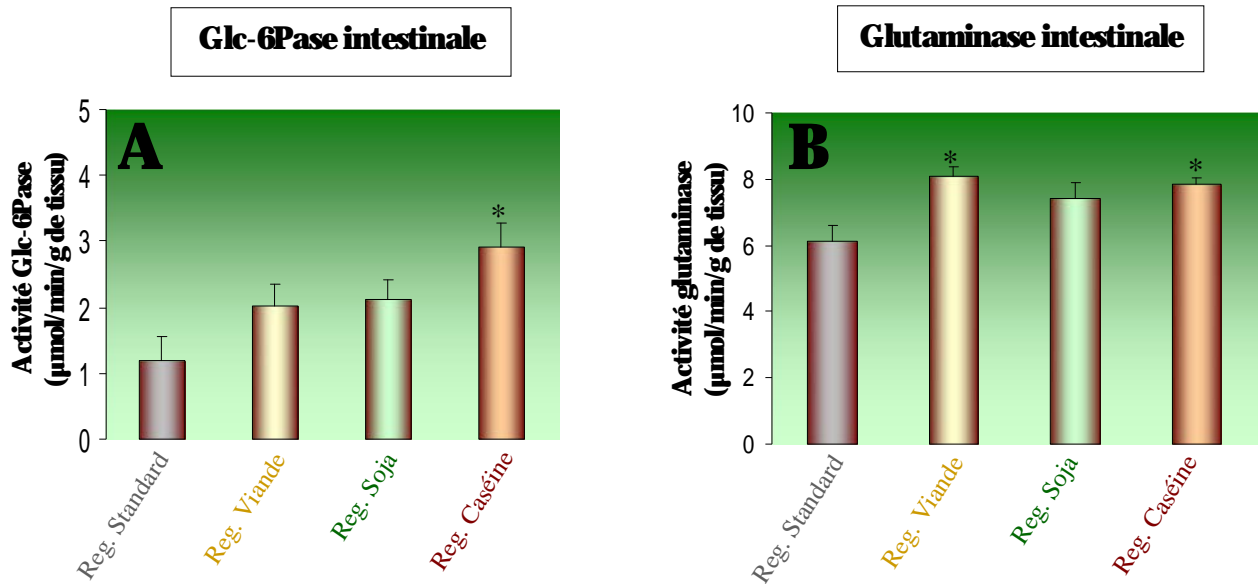


Figure 11 : Effet des différents régimes protéiques sur l'activité des enzymes néoglucogénique intestinales (jejunum) (n=5). **A** : Activité Glc-6Pase mesurée à la Vmax. **B** : Activité de la glutaminase mesurée à la Vmax. Les données sont présentées en valeur \pm SEM.

** , significativement différents de la valeur en régime standard, $p < 0,05$ respectivement (test t non apparié)*

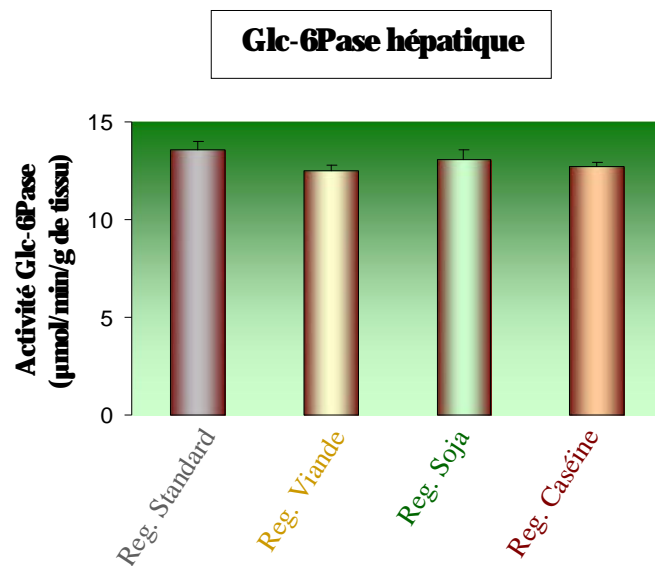


Figure 12 : Effets des différents régimes protéiques sur l'activité de la Glc-6Pase hépatique. Activité de la Glc-6Pase, mesurée à la Vmax (n=5). Les données sont présentées en valeur \pm SEM.

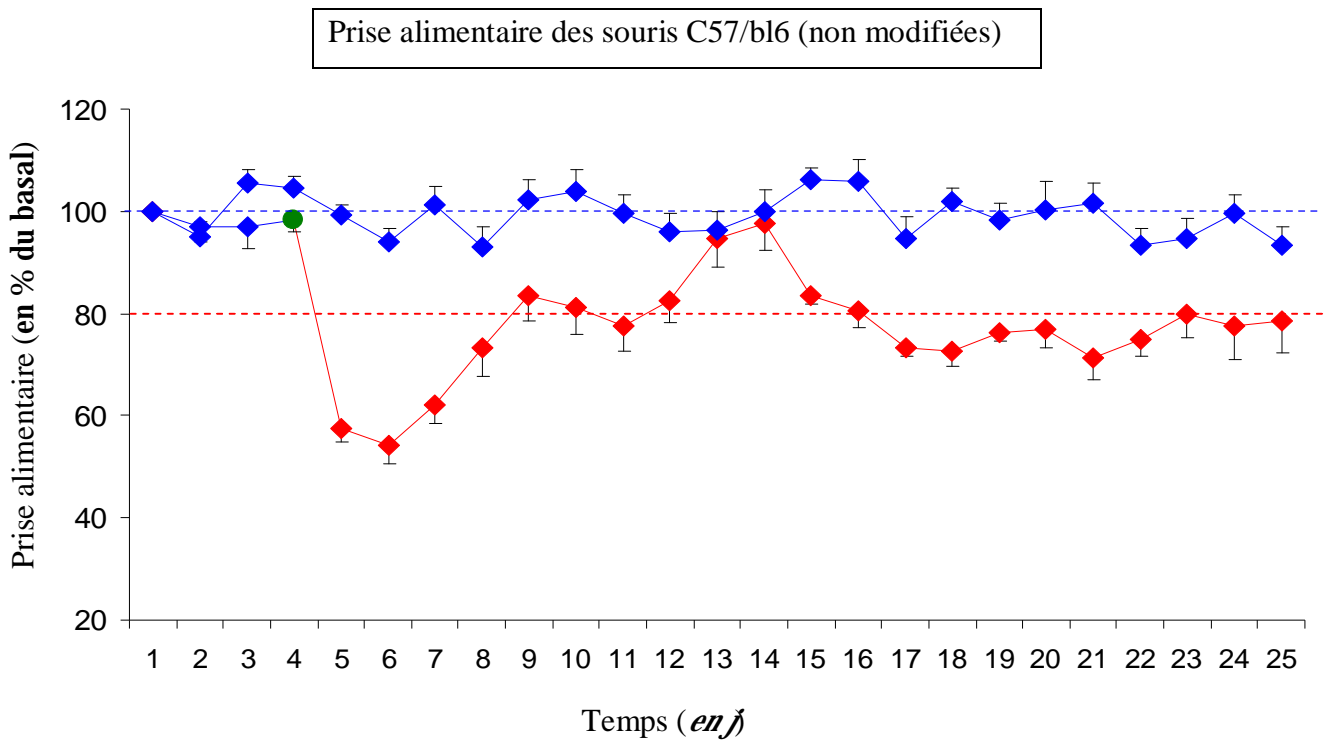


Figure 13 : Prise alimentaire des souris C57/bl6 (n=8) nourries par un régime standard (en bleu) puis, pour l'un des groupes, par un régime protéique pendant 21 jours (en rouge). Les données sont exprimées en % par rapport à la prise alimentaire basale \pm SEM.

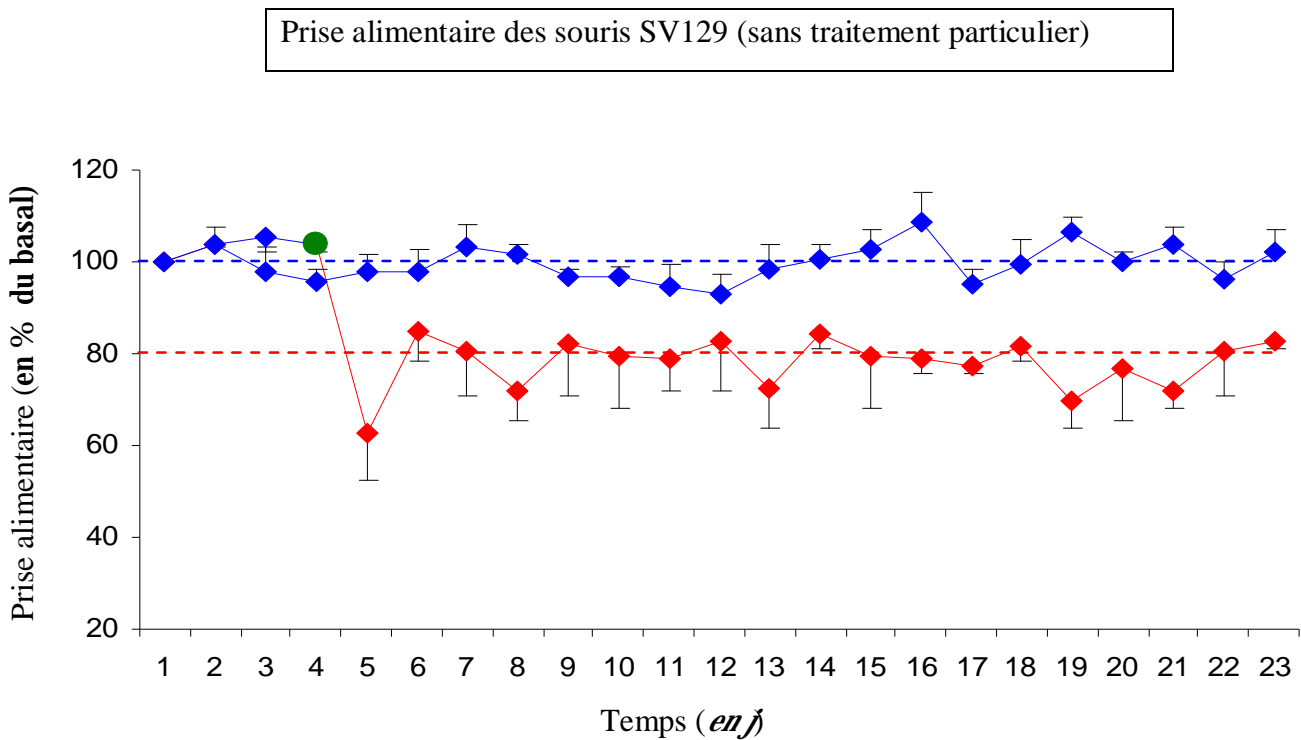


Figure 14 : Prise alimentaire des souris SV129 (n=8) nourries par un régime standard (en bleu) puis, pour l'un des groupes, par un régime protéique pendant 21 jours (en rouge). Les données sont exprimées en % par rapport à la prise alimentaire basale \pm SEM.

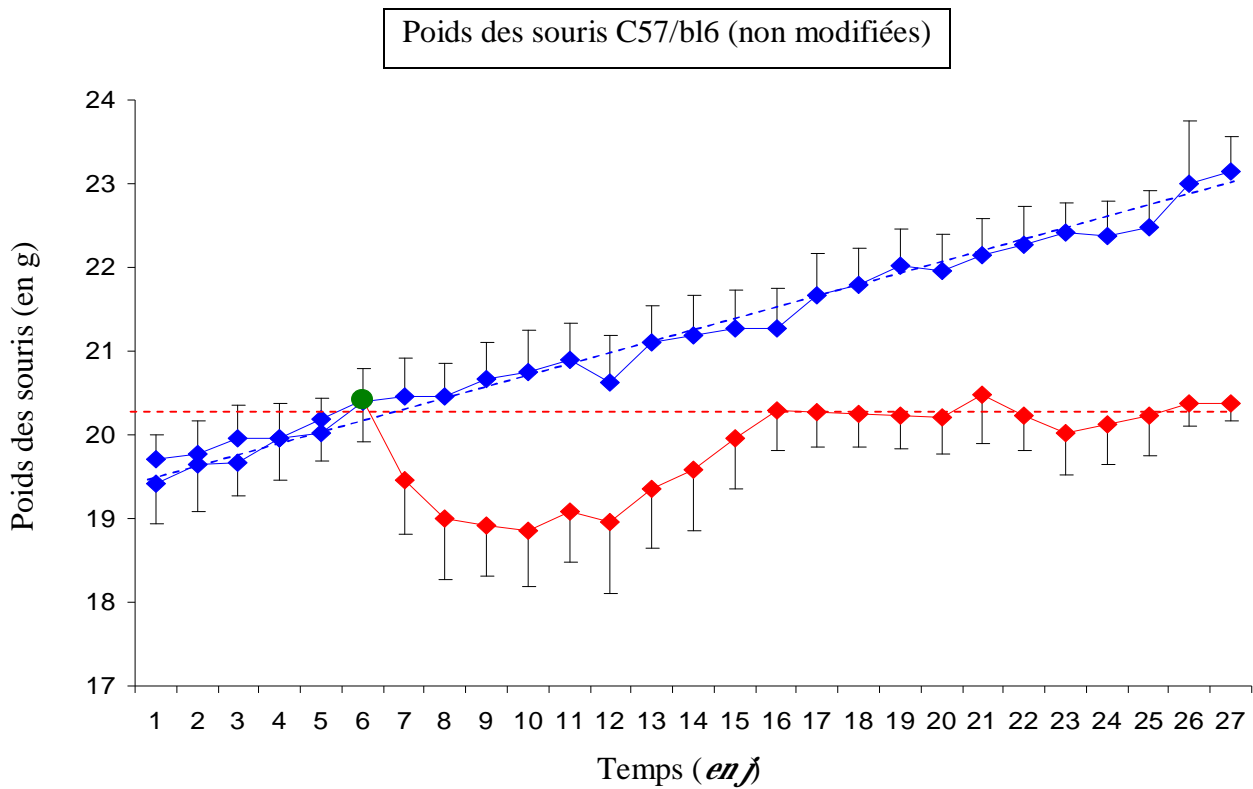


Figure 15 : Poids des souris C57/bl6 (n=8) nourries par un régime standard (en bleu) puis, pour l'un des groupes, par un régime protéique pendant 21 jours (en rouge). Les données sont exprimées en g \pm SEM.

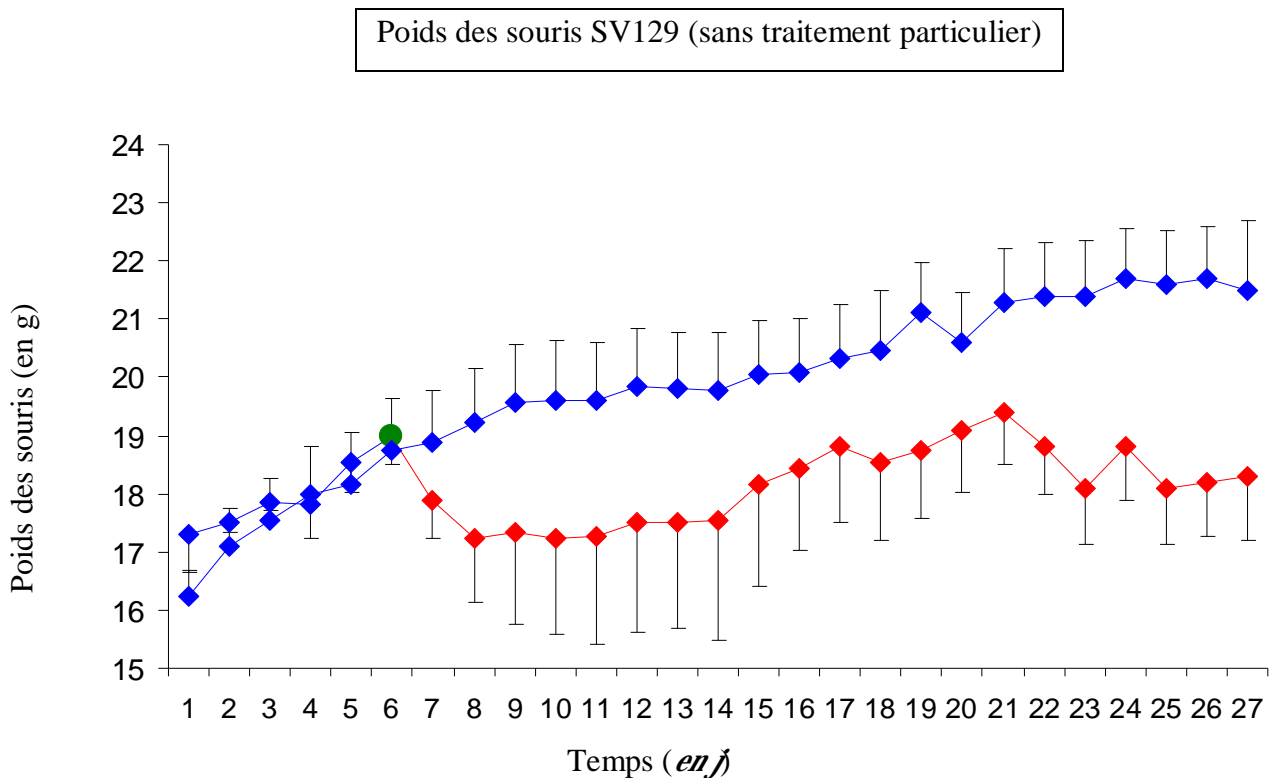


Figure 16 : Poids des souris SV129 (n=4) nourries par un régime standard (en bleu) puis, pour l'un des groupes, par un régime protéique pendant 21 jours (en rouge). Les données sont exprimées en g \pm SEM.

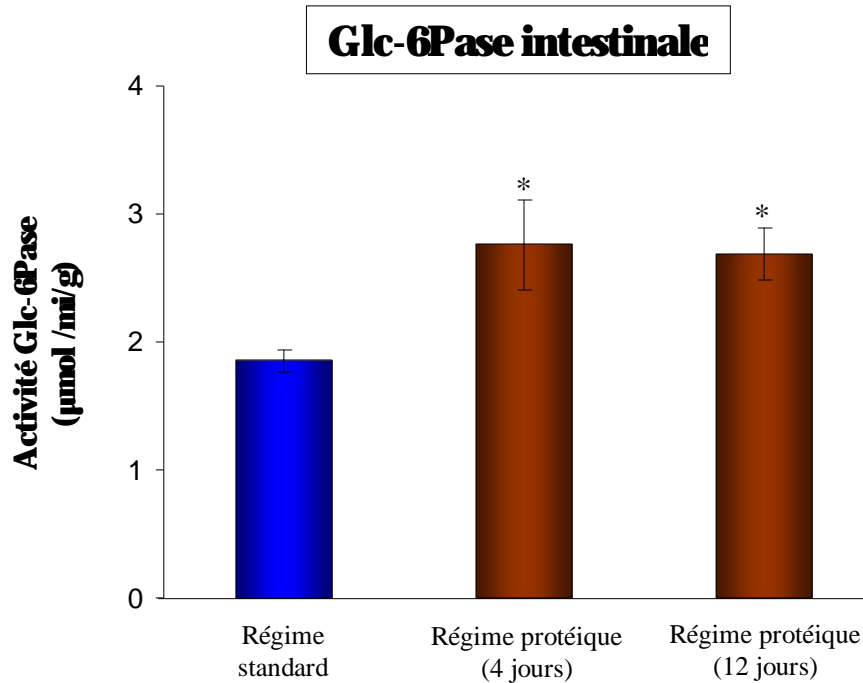


Figure 17 : Effets de 4 et 12 jours de régime protéique sur l'activité de la Glc-6Pase intestinale chez la souris C57/bl6 (n=8 pour le régime standard et n=4 pour les régimes protéiques). Les données sont présentées en valeur \pm SEM.

**, significativement différents de la valeur en régime standard, $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement (test t non apparié)*

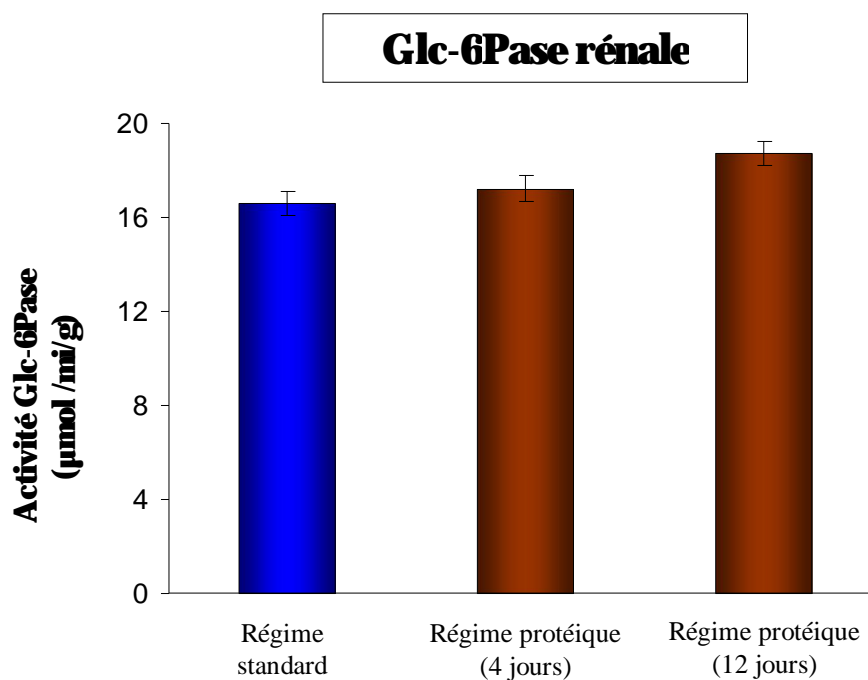


Figure 18 : Effets de 4 et 12 jours de régime protéique sur l'activité de la Glc-6Pase rénale chez la souris C57/bl6 (n=8 pour le régime standard et n=4 pour les régimes protéiques). Les données sont présentées en valeur \pm SEM.

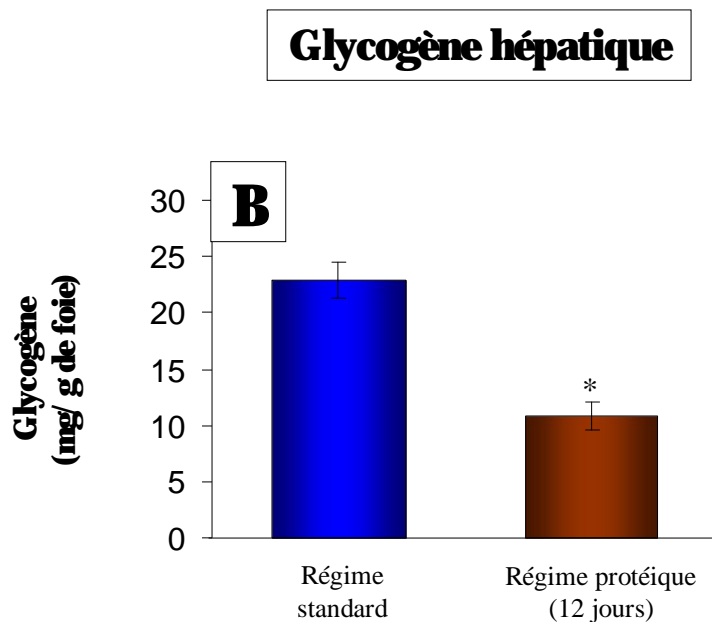
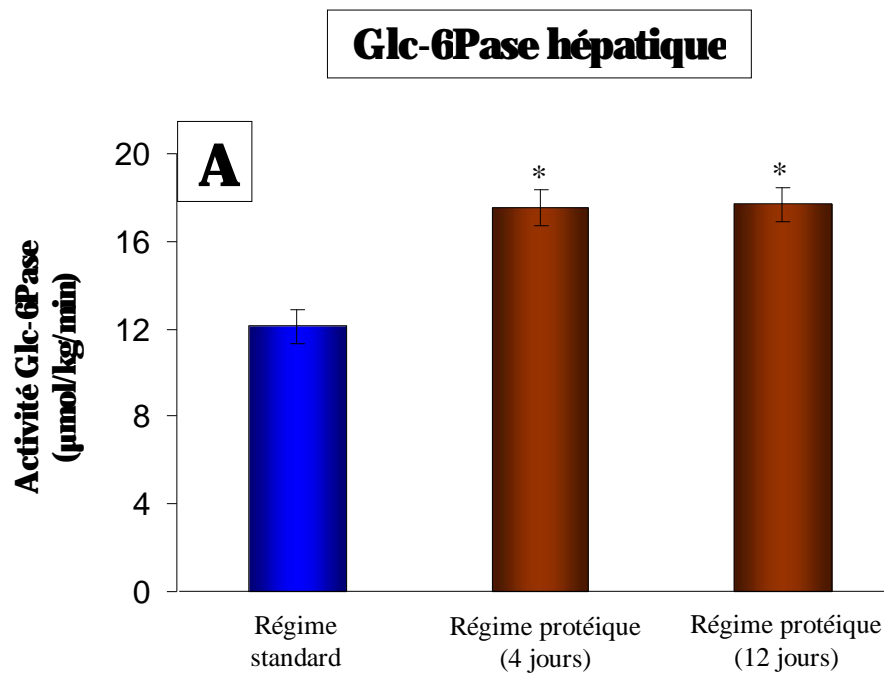


Figure 19 : Effets du régime protéique sur le métabolisme glucidique hépatique chez la souris C57/bl6. **A** : Activité de la Glc-6Pase hépatique (n=8 pour le régime standard et n=4 pour les régimes protéiques). **B** : Stock de glycogène hépatique à l'état post-absorptif (6h de jeûne) après 12 jours de régime protéique. Les données sont présentées en valeur \pm SEM.

**, significativement différents de la valeur en régime standard, $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement (test *t* non apparié)*

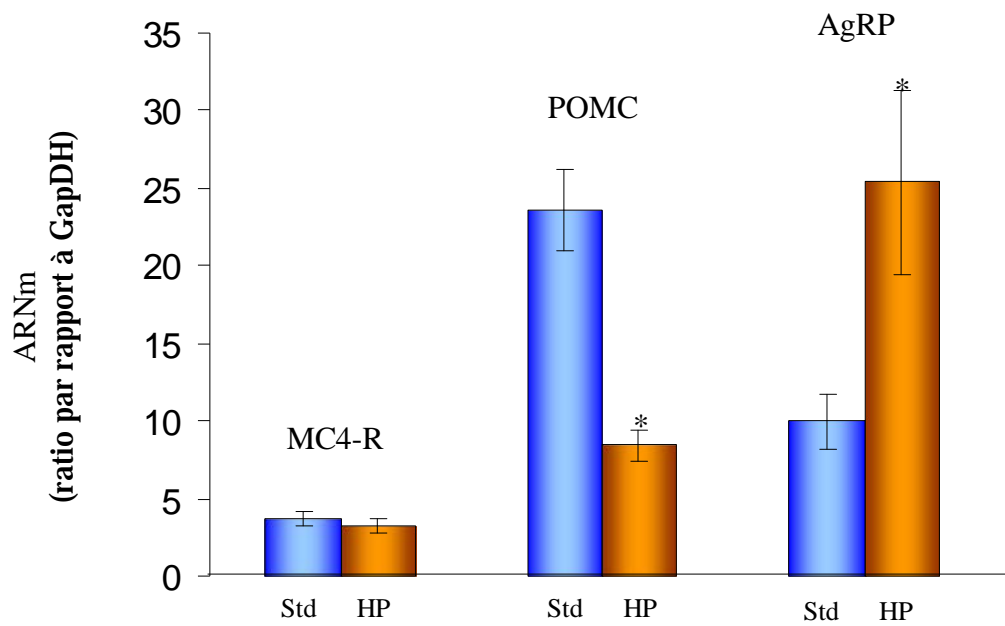


Figure 20 : Analyse de l'expression génique des principales composantes du système mélanocortinergique dans l'hypothalamus de souris C57/B16. A, B, C : ARNm de MC4-R, POMC et AgRP respectivement, normalisés avec l'ARNm de GapDH (n=5). Les données sont présentées en valeur \pm SEM.

** , significativement différents de la valeur en régime standard, $p < 0,05$ respectivement (test t non apparié)*

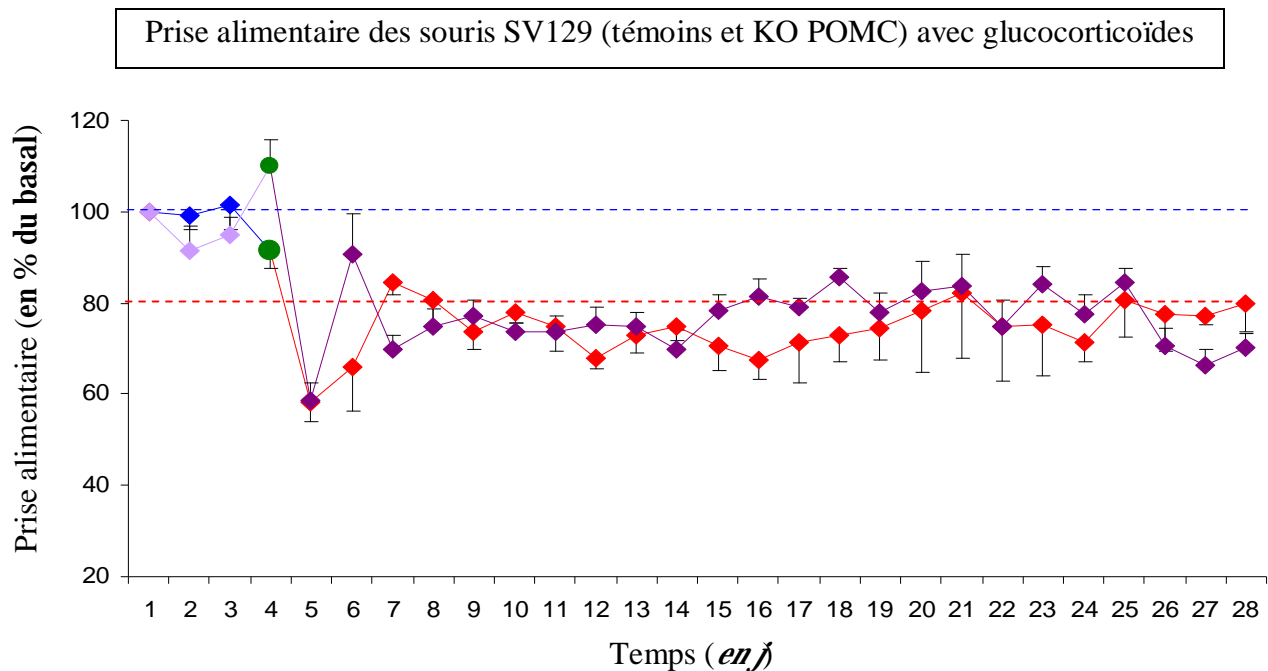


Figure 21 : Prise alimentaire des souris SV129 (n=8) nourries par un régime standard (en bleu et violet clair) puis par un régime protéique pendant 23 jours (en rouge pour les témoins et en violet foncé pour le KO POMC). Les données sont exprimées en % par rapport à la prise alimentaire basale \pm SEM.

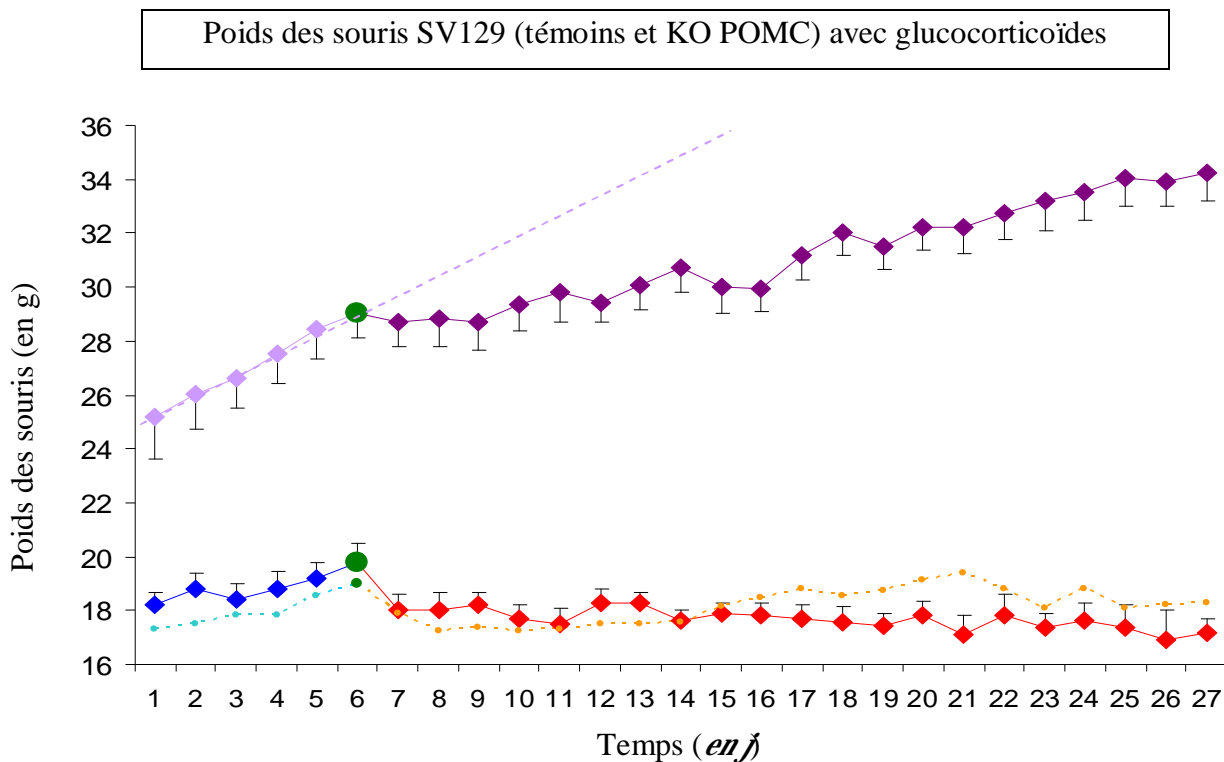


Figure 22 : Poids des souris SV129 (n=6) nourries par un régime standard (en bleu et violet clair) puis par un régime protéique pendant 23 jours (en rouge pour les témoins et en violet foncé pour le KO POMC). La courbe orange et bleu clair en pointillé rapporte les valeurs obtenues chez les souris SV129 non traitées (de la figure **XX**). Les données sont exprimées en g \pm SEM.

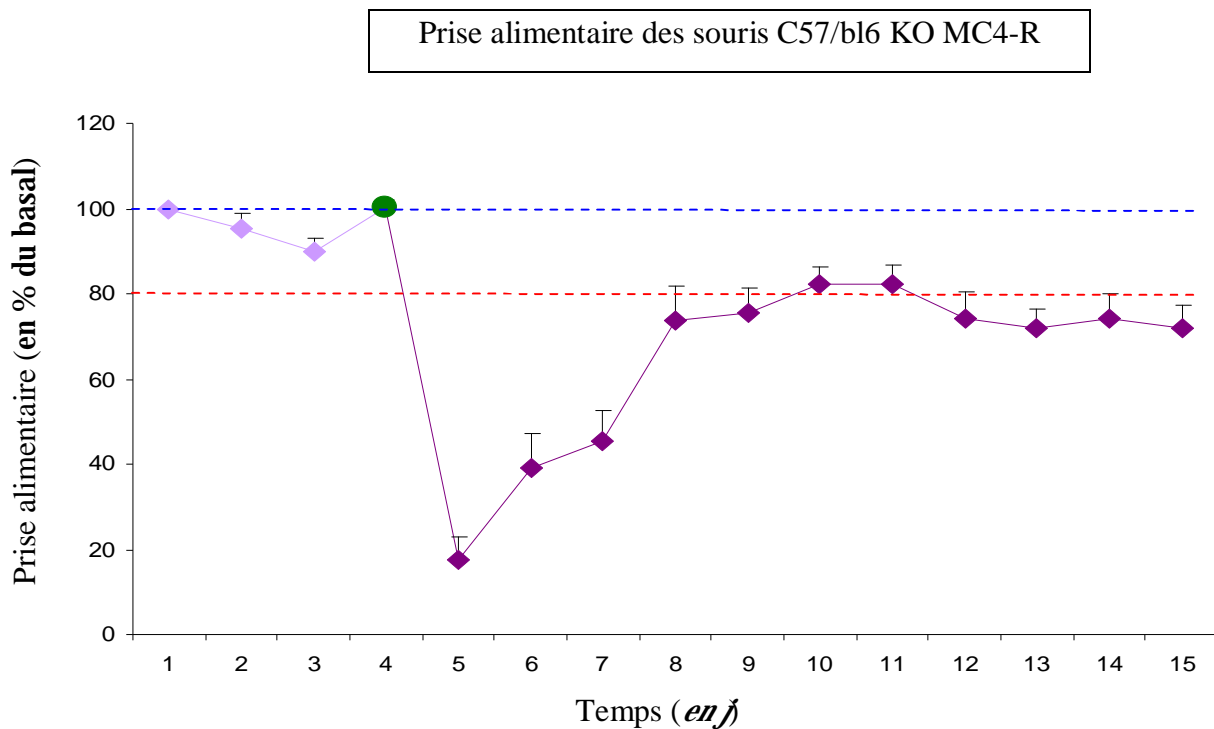


Figure 23 : Prise alimentaire des souris SV129 (n=8) nourries par un régime standard (en violet clair) puis par un régime protéique pendant 23 jours (violet foncé). Les données sont exprimées en % par rapport à la prise alimentaire basale \pm SEM.

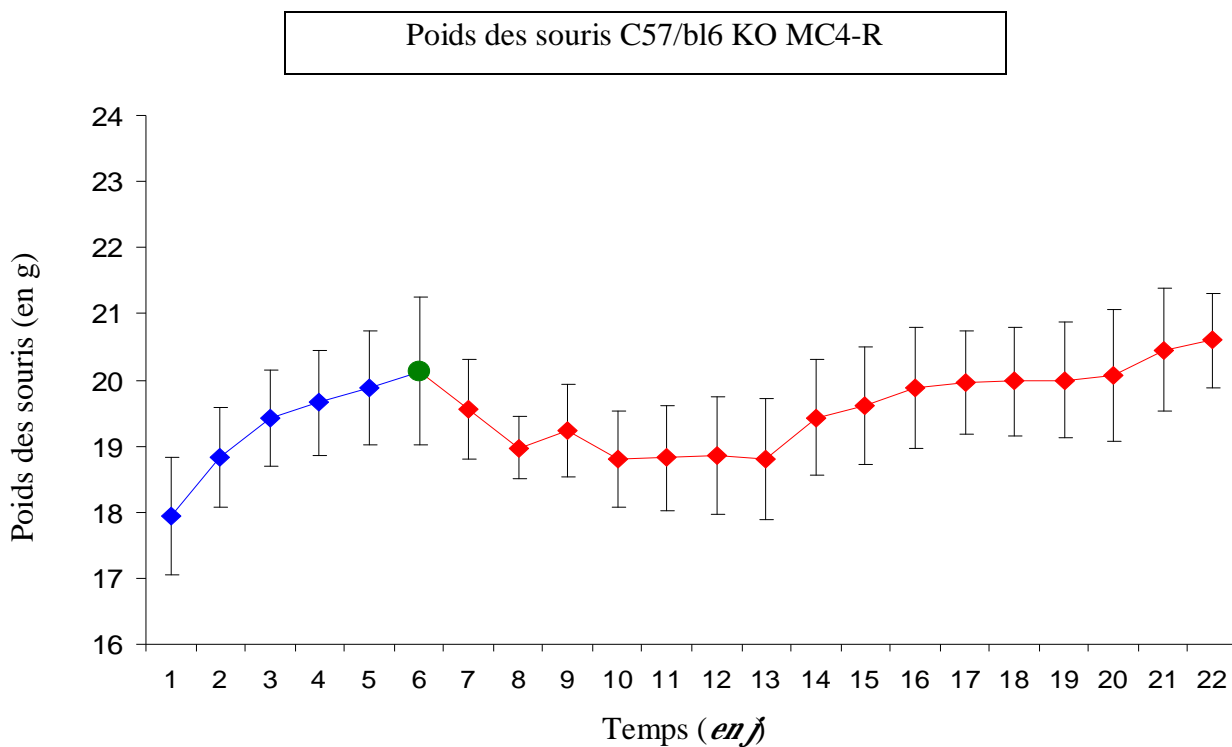


Figure 24 : Poids des souris MC4-R (n=4) nourries par un régime standard (en bleu) puis par un régime protéique pendant 13 jours (en rouge). Les données sont exprimées en g \pm SEM.

