



République Algérienne Démocratique



et Populaire Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

**UNIVERSITE de BOURGOGNE EUROPE**

ECOLE DOCTORALE N°554, ENVIRONNEMENT SANTE

Equipe NUTOX, UMR INSERM 1231 CTM

**UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCEN**

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Département de  
Biologie

Laboratoire de Produits Naturels « LAPRONA »

**THESE EN COTUTELLE INTERNATIONALE**

Présentée par

**BENMOUNA Manal**

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Biologie

Option : SCIENCES DE LA VIE, BIOLOGIE, BIOCHIMIE

Spécialité : NUTRITION ET SANTE

Rôle de célastrol, un terpénoïde, dans la modulation de la perception orosensorielle des lipides alimentaires et de l'obésité.

*Soutenue le 24 / 07/2025 devant les jurys composés de :*

<b>Présidente :</b>	Mme HADDOUCHI Farah	Professeur	Université de Tlemcen
<b>Directeur de thèse :</b>	Mr BENAMMAR Chahid	Professeur	Université de Tlemcen
<b>Directeur de thèse :</b>	Mr KHAN Naim Akhtar	Professeur	Université de Bourgogne
<b>Examineur :</b>	Mr HICHAMI Aziz	MCU HDR	Université de Bourgogne
<b>Examineur :</b>	Mr BOUGRIDA Mohammed	Professeur	Université de Constantine 3
<b>Examineur :</b>	Mr GALUSCA Bogdan	Professeur	Université Jean Monnet

*Année Universitaire 2024/2025*

## ***REMERCIEMENT***

Mes sincères remerciements à mon directeur de thèse Professeur **BENAMMAR Chadid El Hocine**, à l'Université de Tlemcen, pour l'honneur que m'a fait en acceptant de diriger ce travail. Je le témoigne ma profonde reconnaissance, pour ses précieux encouragements, de sa patience et de son généreux soutien.

J'exprime mon admiration et gratitude au Professeur **KHAN Naim Akhtar** mon directeur de thèse. Professeur à l'Université de Bourgogne (Dijon-France), je vous remercie de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail, et pour son accueil chaleureux au sein de son laboratoire Nutox INSERM.

Un grand merci au Dr **HICHAMI Aziz** et Dr **SAYED KHAN Amira**, à l'Université de Bourgogne (Dijon-France), pour m'avoir présenté les techniques expérimentales et pour leur soutien que je n'ai jamais failli. Je tiens également à saluer l'aide qui m'a été apportée par les membres de l'équipe, je dis merci.

Je tiens également à remercier Mme **HADDOUCHI Farah** Professeur à l'UABT, pour l'honneur qu'elle m'a fait d'avoir acceptée la présidence du jury de ma thèse. Veuillez recevoir l'expression de ma gratitude et de mon plus profond respect.

Je remercie infiniment Mr **BOUGRIDA Mohammed**, Professeur à l'Université de Constantine 3, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger cette thèse et d'être examinateur.

Mes remerciements sincères et respectueux vont à Mr **GALUSCA Bogdan**, Directeur, Unité TAPE à l'Université Jean Monnet, Campus Santé Innovations, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de juger mon travail.

Je remercie aussi toute l'équipe du laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA), à l'UABT, et l'équipe du laboratoire de Physiologie de la Nutrition et Toxicologie (Nutox, Inserm) université de bourgogne.

Je tiens à remercier mon père, mes frères et mes sœurs, ainsi qu'à toute ma famille pour leur patience, leur soutien sans faille et leurs encouragements tout au long de ce parcours doctoral. Et un hommage à ma mère décédée, qu'Allah la couvre ainsi que tous les autres défunts avec sa miséricorde.

Une belle gratitude à mon mari pour leur soutien et d'avoir m'encouragé pour finir ce travail.

En fin, je remercie tous ceux qui ont attribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## **Résumé :**

L'obésité est un problème de santé majeur et est devenue un phénomène préoccupant dans le monde entier. Des études récentes ont démontré l'existence d'une modalité gustative du goût du gras, cette perception gustative du goût du gras pourrait être responsable de l'attrance pour les aliments riches en graisses et du comportement alimentaire. Pour remédier à ce problème, la présente étude porte sur l'évaluation du potentiel thérapeutique de célastrol, un terpénoïde penta-cyclique naturel, isolé de certains des plantes de la famille celastracée telles que *Tripterygium wilfordii*. L'objectif de cette étude est d'explorer le rôle et les effets du traitement de célastrol sur les statuts métabolique et inflammatoire chez les souris obèses. Le test de préférence de double choix a été utilisé pour évaluer la perception gustative lipidique chez la souris. Nous avons déterminé le rôle de célastrol dans la perception orosensorielle des acides gras alimentaires, nous avons utilisé des techniques de RT-qPCR, et de signalisation calcique. Nous avons mené nos expériences sur des cellules de bourgeons gustatifs de souris, études ex vivo, ou sur différents modèles de souris recevant un régime hyper-gras (HFD) induisant l'obésité (études in vivo). L'effet de l'administration de célastrol sur les mécanismes impliqués dans la perception orosensorielle des lipides est ainsi évalué. Les études in vitro montrent que le célastrol, module la perception du goût du gras au niveau cellulaire dans les cellules des bourgeons gustatifs de souris. Les souris traitées par le célastrol (100µg/Kg/j) présentent une diminution significative des poids corporel, du foie et du tissu adipeux viscéral. En outre, le célastrol régule l'expression des ARNm codant pour les cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-6, et TNFα) dans les papilles gustatives des souris, et certains gènes lipogéniques (PPARα, SREBP1, FAS, ACC1 et ACC2) dans le foie. Par ailleurs, Les souris traitées au célastrol présentent une préférence pour les lipides plus élevée par rapport aux souris HFD, ce qui est probablement due à l'augmentation de l'ARNm codant pour le CD36, GUS et GPR120 dans les cellules gustatives de souris (mTBC). Ces observations suggère qu'une augmentation de la sensibilité au corps gras peut être responsable d'une baisse de prise alimentaire lipidique. De plus, on constate une modulation de la signalisation calcique par le célastrol dans les cellules gustatives de souris.

**Mots clés :** perception orosensorielle, acide gras, célastrol, bourgeons de gout, obésité.

## **Abstract:**

Obesity is a major health problem and has become a worrying phenomenon worldwide. Recent studies have demonstrated the existence of a gustatory modality of the taste of fat, this gustatory perception of the taste of fat could be responsible for the attraction to foods rich in fat and for eating behavior. To resolve this problem, the present study focuses on the evaluation of the therapeutic potential of celastrol, a natural penta-cyclic terpenoid, isolated from some of the plants of the Celastraceae family such as *Tripterygium wilfordii*. The objective of this study is to explore the role and effects of celastrol treatment on metabolic and inflammatory statuses in obese mice. The two bottle preference test was used to evaluate lipid taste perception in mice. We determined the role of celastrol in the oro-sensory perception of dietary fatty acids, we used RT-qPCR and calcium signaling techniques. We carried out our experiments on mouse taste buds cells ex vivo studies, or on different mouse models receiving a high-fat diet (HFD) inducing obesity (in vivo studies). The effect of the administration of celastrol on the mechanisms involved in the oro-sensory perception of lipids is thus evaluated. In vitro studies show that celastrol modulates the perception of the taste of fat at the cellular level in mouse taste bud cells. Mice treated with celastrol (100µg/Kg/day) showed a significant reduction in body weight, liver and visceral adipose tissue. Celastrol also regulated the expression of mRNA encoding pro-inflammatory cytokines (IL-1β, IL-6 and TNFα) in buds taste papillae and some lipogenic genes (PPARα, SREBP1, FAS, ACC1 and ACC2) in liver. Furthermore, celastrol-treated mice exhibited a higher preference for lipids compared to HFD mice, which was likely due to increased mRNA encoding CD36, GUS, and GPR120 in mouse taste bud cells (mTBCs). These observations suggest that an increase in sensitivity to fat may be responsible for a decrease in lipid intake. Furthermore, modulation of calcium signaling by celastrol was observed in mouse taste cells.

**Key words:** oro-sensory perception, fatty acid, celastrol, taste bud, obesity.

## ملخص :

تعتبر السمنة مشكلة صحية كبيرة وأصبحت ظاهرة مثيرة للقلق في جميع أنحاء العالم. أثبتت الدراسات الحديثة وجود طريقة ذوقية لمذاق الدهون؛ وهذا الإدراك الذوقي لمذاق الدهون يمكن أن يكون مسؤولاً عن الانجذاب إلى الأطعمة الغنية بالدهون وعن سلوك الأكل. ولمعالجة هذه المشكلة، تركز الدراسة الحالية على تقييم الإمكانيات العلاجية للسيلاسترون، **Tripterygium** مثل **Celastraceae** تيربينويد خماسي حلقي طبيعي، تم عزله من بعض نباتات عائلة وهو الهدف من هذه الدراسة هو استكشاف دور وتأثير العلاج بالسيلاسترون على الحالة الأيضية والالتهابية لدى **wilfordii** الفئران السمنة. تم استخدام اختبار تفضيل الاختيار المزدوج لتقييم إدراك طعم الدهون في الفئران. لتحديد دور وإشارات الكالسيوم. أجرينا **RT-qPCR**السيلاسترون في الإدراك الحسي للأحماض الدهنية الغذائية، استخدمنا تقنيات تجاربنا على الخلايا المعزولة من براعم التذوق لدى الفئران، أو دراسات خارج الجسم الحي، أو على نماذج فئران مختلفة يسبب السمنة (في دراسات الجسم الحي) من أجل استكشاف مشاركة الكوليسترول (**HFD**) تتلقى نظاماً غذائياً غنياً بالدهون في تعديل الإدراك الحسي للأحماض الدهنية الغذائية طويلة السلسلة. وبالتالي يتم تقييم تأثير إعطاء السيلاسترون على الآليات المشاركة في الإدراك الحسي للدهون. تظهر الدراسات المختبرية أن سيلاسترون ينظم إدراك طعم الدهون على المستوى الخلوي في خلايا برعم التذوق لدى الفأر. أظهرت الفئران المعالجة بالسيلاسترون (100 ميكرومتر/كجم/يوم) انخفاضاً ملحوظاً في وزن الجسم والكبد والأنسجة الدهنية الحشوية. علاوة على ذلك، ينظم سيلاسترون التعبير عن **mRNAs** في براعم التذوق لدى الفئران، وبعض (**TNF $\alpha$** ، **IL-6**، **IL-1 $\beta$** ) الذي يشفر السيتوكينات المؤيدة للالتهابات **mRNAs** في الكبد. علاوة على ذلك، فإن الفئران المعالجة (**ACC2**، **ACC1**، **FAS**، **SREBP1**، **PPAR $\alpha$** ) الجينات الشحمية ، وهو ما يرجع على الأرجح إلى الزيادة في ترميز **HFD** بالسيلاسترون تظهر تفضيلاً أعلى للدهون مقارنةً بفئران ترتبط هذه الظاهرة. (**mTBC**) ؛ مستقبلات التذوق الدهنية في خلايا تذوق الفأر **GPR120** و **GUS** و **mRNA CD36** لدى الفئران المعالجة **mTBCs** بزيادة تركيز الكالسيوم الحر داخل الخلايا، الناجم عن الأحماض الدهنية، في خلايا بالسيلاسترون

**الكلمات المفتاحية:** الإدراك الحسي، الأحماض الدهنية، السيلاسترون، براعم التذوق، السمنة

## Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>03</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>04</b>
ملخص .....	<b>05</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>09</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>14</b>
<b>Liste des photos</b> .....	<b>16</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>17</b>
<b>Table de matières</b> .....	<b>05</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>18</b>
<b>Chapitre 1 : l'obésité et perception orosensorielles des lipides alimentaires</b> .....	<b>20</b>
1. Pathogénèse de l'obésité .....	21
1.1.Qu'est-ce que c'est ? .....	21
1.2.Mesure de l'excès de masse de grasse .....	21
1.3.Epidémiologie .....	22
1.4.Les différents stades de l'obésité .....	24
1.5.Les facteurs de risques .....	25
1.5.1. Facteur génétique .....	25
1.5.2. Facteur environnementaux .....	26
1.5.3. Facteur comportementaux .....	27
1.5.4. Des causes épi génétique (l'empreinte métabolique) .....	27

1.6.Les conséquences .....	27
2. Aperçue de système gustatif .....	29
2.1.Introduction du gout .....	29
2.2.Les cellules gustatives .....	30
2.3.La communication intracellulaire .....	31
2.4.Modalité de gout .....	32
2.4.1. Le gout salé .....	33
2.4.2. Le gout acide .....	33
2.4.3. Le gout sucré .....	33
2.4.4. Le gout d'Umami .....	33
2.4.5. Le gout amer .....	34
3. Perception orosensorielles des lipides alimentaires .....	34
3.1.Classification des lipides .....	35
3.1.1. Les acides gras .....	35
3.1.2. Les acides gras saturés et acides gras insaturés .....	36
3.2.Majeurs sources des lipides .....	37
3.3.Transduction de gout du gras .....	38
3.4.Détection des acides gras .....	40
3.5.Récepteurs impliqué dans la signalisation des cellules gustatives .....	41
3.5.1. Le CD36 .....	41
3.5.2. Le GPR40 et le GPR120 .....	41
3.5.3. Canaux DRK .....	42
3.6.Signalisation calcique et transformation de l'information gustative .....	43

<b>Chapitre 2 : les triterpenoides et effet anti-obésité</b> .....	<b>46</b>
2.1. Introduction .....	47
2.2. Classification des terpenoides .....	48
2.3. Le célastrol .....	48
2.3.1. Généralité .....	48
2.3.2. Taxonomie de Tripterygium Wilfordii .....	49
2.3.3. Répartition géographique .....	49
2.3.4. Composition chimique de Tripterygium Wilfordii .....	50
2.3.5. Intérêt et effet thérapeutique .....	52
<b>Conclusion et hypothèses de travail</b> .....	<b>54</b>
<b>Deuxième partie : les contributions personnelles</b> .....	<b>55</b>
<b>Matériel et Méthodes</b> .....	<b>56</b>
1. Matériel .....	57
2. Mesure de la signalisation de calcium .....	57
3. Expérimentation en vivo .....	58
3.1. Animaux et régime .....	58
3.2. Obésité induit par un régime hyper gras .....	59
3.3. Détermination des paramètres pro-inflammatoires .....	60
3.4. Déterminations du cholestérol et des triglycérides hépatiques .....	60
3.5. Test de double choix .....	61
3.6. Isolation des papilles gustatives .....	61
3.7. Détermination de l'expression des ARNm par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) .....	62
<b>Résultats et interprétations</b> .....	<b>64</b>

1. Célastrol induit l'augmentation de la signalisation calcique dans les cellules gustatives des souris .....	65
2. Célastrol mobilise le $Ca^{2+}$ via son action sur le récepteur TGR5, couplé au PLC.....	65
3. Célastrol recrute du $Ca^{2+}$ à partir de pools intra et extracellulaire suivi de l'ouverture des canaux TRPC3 .....	67
4. Célastrol partage la signalisation de $Ca^{2+}$ induite par un acide gras alimentaire .....	68
5. Célastrol interfère avec la préférence spontanée pour les graisses .....	69
6. Effet de célastrol chez les souris obèses, nourries par un régime hyper gras .....	70
6.1. Célastrol diminue la prise de poids et module la préférence pour les lipides alimentaires chez les souris nourries avec un régime riche en lipides .....	70
6.2. Célastrol module l'expression des ARNm des récepteurs du goût des graisses et des cytokines pro-inflammatoires chez les souris nourries avec un régime hyper lipidique.....	71
6.3. Célastrol diminue les concentrations circulantes de cytokines pro-inflammatoires.....	72
6.4. Célastrol régule l'expression des ARNm des médiateurs métaboliques lipidiques dans le foie .....	73
<b>Discussion .....</b>	<b>75</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>81</b>
<b>Perspectives .....</b>	<b>82</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>83</b>

## Liste des abréviations

**[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>** : Calcium libre intracellulaire

**5-HT** : 5-hydroxytryptamine (sérotonine)

**AA** : Acide arachidonique

**ACC1** : Acetyl-CoA carboxylase 1

**AG** : Acide gras

**AGL** : Acide gras libre

**AGLC** : Acide gras à longue chaîne

**AGMI** : Acide gras mono-insaturé

**AGPI** : Acide gras polyinsaturé

**AGS** : Acide gras saturé

**AM** : acétométhylester

**ARNm** : Acide ribonucléique messenger

**ATP** : Adénosine triphosphate

**BF<sub>3</sub>** : Tri-fluorure de bore

**BSA** : Bovine sérum albumine

**BSTFA**: N,O-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide

**CALHM1**: Calcium homeostasis modulator 1

**CCR2**: C-C chemokine receptor type 2

**CD36**: Cluster of differentiation 36

**cDNA**: Complementary DNA

**COOH**: Carboxylic Acid

**Ct**: Cycle Threshold

**DAG:** Diacyl-glycérol

**DHA:** Acide docosahexaénoïque

**DIO:** Diet-induced obesity

**DRK:** Delayed rectifying K<sup>+</sup> channels

**EDTA :** Ethylène Diamine Tétracétique

**EGTA :** Egtazic acid

**ELISA:** Enzyme-linked immunosorbent assay

**EPA:** Acide eicosapentaénoïque

**ENaC:** Epithelial sodium channel

**FAS:** Fatty acid synthase

**G6Pase:** Glucose 6-phosphatase

**GLP-1:** Glucagon-like peptide-1

**GLUT-4:** Glucose transporter type 4

**GPCR:** G protein-coupled receptor

**GPR120:** G protein-coupled receptor 120

**GPR40:** G protein-coupled receptor 40

**HDL:** High density lipoprotein

**HEPES:** 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

**HFD:** High fat diet

**IKK $\beta$ :** Inhibitor of kappa B kinase  $\beta$

**IL-1 $\beta$  :** Interleukine 1 $\beta$

**IL-6 :** Interleukine 6

**IMC :** Indice de masse corporelle

**IP3** : Inositol-1, 4, 5-triphosphate

**IP3R3** : Récepteur à l'IP3

**Kcal** : Kilocalorie

**LA** : linoleic acid (acide linoléique)

**LDL**: Low density lipoprotein

**LPL**: Lipoprotéine lipase

**LPS** : Lipopolysaccharide

**LT** : Lipides totaux

**MCP-1** : Monocyte chemoattractant protein-1

**mTBC** : Mouse taste bud cells

**NaCl** : Chlorure de sodium

**NE** : Norépinéphrine

**NF- $\kappa$ B**: Nuclear factor-kappa B

**nm** : Nanomètre

**ND** : Normal Diet

**OMS** : Organisation mondiale de la santé.

**Orai1**: Calcium release-activated calcium channel protein 1

**Orai3**: Calcium release-activated calcium channel protein 3

**PBS**: Phosphate buffered saline

**PIP2**: Phosphatidylinositol-4,5-biphosphates

**PKD1L3**: Polycystic kidney disease 1-like 3 protein

**PKD2L1**: Polycystic kidney disease 2-like 1 protein

**PLC**: Phospholipase C

**PLC $\beta$ 2**: Phospholipase C  $\beta$ 2

**PPAR**: Peroxisome proliferator-activated receptor

**RE** : Réticulum endoplasmique

**RPMI** : Roswell Park Memorial Institute medium (milieu de culture)

**RQ** : Relative quantification

**RT-qPCR** : Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction

**SBI-115** : TGR5 inhibitor

**SNC** : Système nerveux central

**SSO**: sulfo-N-succinimidyle oléate

**SOC**: Stored operated calcium channels

**SREBP**: Sterol regulatory element-binding proteins

**STIM1** : Stromal interaction molecule 1

**TA** : Tissu adipeux

**TG** : Triglycérides

**TGR5** : Tekada protéine-G récepteur 5

**TLR**: Toll-like receptor

**TNF $\alpha$** : Tumor necrosis factor  $\alpha$

**TRC**: Taste receptor cell

**TRPC3**: Transcient receptor potential canonical 3

**TRPM5**: Transient receptor potential cation channel subfamily M member 5

**T1R** : Taste receptors type-1

**T2R** : Taste receptors type 2

**T1R2**: Taste receptor type-1 member-2

**T1R3:** Taste receptor type-1 member-3

**U-73122:** PLC inhibitor

**VLDL:** Very low density lipoprotein.

**v/v:** Volume/volume

**w/v:** Weight/volume

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : la prévalence de l'obésité dans le monde .....	23
<b>Figure 2</b> : histoire de l'obésité .....	25
<b>Figure 3</b> : complications pour la santé liée à l'obésité .....	29
<b>Figure 4</b> : la structure des papilles gustatives sur la langue .....	30
<b>Figure 5</b> : la communication cellule a cellule .....	32
<b>Figure 6</b> : les deux grandes familles d'acide gras alimentaires .....	36
<b>Figure 7</b> : présentation schématique des récepteurs métabolique et la voie de transduction gustative .....	40
<b>Figure 8</b> : la structure membranaire de CD36 .....	41
<b>Figure 9</b> : proposition du signale de transduction des AGL dans les cellules gustatives humaines .....	43
<b>Figure 10</b> : circuit gustatif et conséquences physiologiques les sécrétions digestives et le comportement alimentaires .....	45
<b>Figure 11</b> : la structure chimique des terpenoides .....	47
<b>Figure 12</b> : la plante <i>Tripterygium Wilforddii</i> , et la structure chimique de célastrol .....	49
<b>Figure 13</b> : répartition géographique de <i>Tripterygium Wilforddii</i> .....	50
<b>Figure 14</b> : Effet de célastrol sur la signalisation de $Ca^{2+}$ dans les cellules gustatives de souris .....	65
<b>Figure 15</b> : Effet de célastrol et des agents pharmacologiques sur la $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules gustatives de souris .....	66
<b>Figure 16</b> : Effet de thapsigargine, de l'ionomycine et de célastrol sur la signalisation cellulaire dans les cellules gustatives de souris .....	67
<b>Figure 17</b> : Effets de différents agents sur les augmentations de $[Ca^{2+}]_i$ dans les mTBC ....	68
<b>Figure 18</b> : Effets des bloqueurs des canaux TRCP3 (Pyr 3 et Pr 10) sur les augmentations dans les cellules des papilles gustatives de souris .....	68
<b>Figure 19</b> : Effet additifs de célastrol et l'acide linoléique (LA) sur la $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules gustatives de souris .....	69
<b>Figure 20</b> : Les tests de préférence à deux bouteilles. Effet de célastrol sur la préférence spontanée pour les lipides dans les mTBC.....	69

<b>Figure 21</b> : Effet de célastrol dans l'obésité induite par l'alimentation et la préférences a un acide gras alimentaire.....	70
<b>Figure 22</b> : Effets de célastrol sur l'expression des mRNA codant pour la gustducine, les récepteurs gustatifs des graisse, et les paramètres pro-inflammatoires dans les cellules des papilles gustative de souris .....	72
<b>Figure 23</b> : Effets du célastrol sur les cytokines pro-inflammatoires circulantes chez la souris.....	73
<b>Figure 24</b> : Effet de célastrol sur le poids du foie, de cholestérol et de TG hépatique, et l'expression des ARNm des gènes lipogéniques hépatiques dans l'obésité induite par l'alimentation .....	74

## **Liste des photos**

<b>Photo 1</b> : Test de double-choix .....	60
<b>Photo 2</b> : Isolation des papilles gustatives de la langue de souris .....	61

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Interprétation des valeurs de l'IMC selon l'OMS .....	22
<b>Tableau 2</b> : test de comportement le plus couramment utilisé pour les mesures de détection orosensorielle des lipides chez ka souris .....	35
<b>Tableau 3</b> : Teneurs en acides linoléique et l'acides linoléinique (mg/100), des principales graisses animales et des huiles végétales .....	37
<b>Tableau 4</b> : La proportion (g/ 100g) en DHA et EPA de certaines aliments marines .....	38
<b>Tableau 5</b> : Composition chimique de <i>T. Wilfordii</i> .....	50
<b>Tableau 6</b> : les essais cliniques sur les principes actifs de <i>T. Wilfordii</i> .....	53
<b>Tableau 7</b> : Composition de régime .....	59
<b>Tableau 8</b> : composition en acides gras de régime .....	59
<b>Tableau 9</b> : séquences des amorces .....	62

## **Introduction :**

L'obésité est l'un des enjeux majeurs de santé publique du XXI<sup>e</sup> siècle et sa prévalence augmente rapidement dans le monde entier. D'après l'OMS, l'obésité, se caractérise par une accumulation excessive de graisses dans le tissu adipeux. Il y a plus de 1,9 milliards d'adultes en surpoids et plus de 777 millions des adultes sont cliniquement obèses (1). Le surpoids et l'obésité représentent le 5<sup>ème</sup> facteur de décès au niveau mondial, et sont associée à un risque accru de nombreuses pathologies, notamment le diabète, l'hypertension, les calculs biliaires et certains types de cancer. Selon l'OMS, chaque année 2,8 millions d'adultes décèdent des suites de ces affections (2). L'obésité est une maladie multifactorielle, résultant de l'expression d'une susceptibilité génétique sous l'influence de facteurs environnementaux, et d'autres comme l'alimentation, sédentarisation excessive et le manque d'activité physique. Les interactions entre ces facteurs peuvent créer un plan favorable à l'expression des gènes qui va provoquer l'obésité (3). Il est largement admis que manger les aliments riches en graisses peuvent entraîner un apport calorique élevé qui pourrait contribuer à une accumulation accrue de graisse, ainsi fournissent l'incidence de l'obésité. En effet, plusieurs études ont démontré une relation entre l'augmentation de l'accumulation de graisses et l'inflammation chronique, favorisant ainsi la résistance à l'insuline chez les sujets obèses.

L'obésité est corrélée à un apport élevé en matières grasses, et les sujets obèses également associées à une forte préférence pour les lipides alimentaires (4). L'un des mécanismes plausibles impliqués dans l'attrance pour les lipides alimentaires est qu'il pourrait y avoir une 6<sup>ème</sup> modalité gustative, consacrée à la détection orosensorielle des acides gras alimentaires à longue chaîne (AGLC). En effet, plusieurs études ont montré que les enfants obèses, les adolescents, et les adultes, présentent des seuils de détection élevés pour le corps gras.

Plusieurs études épidémiologiques suggèrent qu'un apport élevé d'aliments à base des plantes riches en composés poly-phénoliques est associé à une diminution de l'inflammation, notamment, les tri-terpènes penta-cycliques, purifiés à partir des plantes, diminuent différents facteurs liés au syndrome métabolique (5). L'équipe Nutox propose que certaines molécules de la famille terpénoides, peuvent jouer un rôle modulateur de goût du gras et exercer des effets bénéfiques lors de l'obésité chez la souris comme la *Zizyphus lotus* (un terpenoïde, appartient à la famille de rhamnacées).

Le célastrol est un triterpénoïde penta-cyclique naturel, isolé de certains des plantes celastraceae telles que *Tripterygium wilfordii* (6). Parallèlement, le remarquable potentiel

anticancéreux du célastrol a également suscité un large intérêt (7). Depuis que l'effet anti-obésité a été définitivement rapporté par le groupe Ozcan en 2015 (8), il a été mis en lumière en raison de son grand potentiel dans le traitement des maladies métaboliques.

Dans le cadre de la valorisation du patrimoine végétatif délaissé et de la prévention de l'obésité et ses complications, notre étude porte sur la mise en évidence de l'effet thérapeutique de célastrol. Nous avons étudié les mécanismes d'action de célastrol sur la signalisation cellulaire, et son effet sur la détection orosensorielle des lipides alimentaires chez les souris C57BL/6J, recevant un régime hyper-gras.

Dans la revue bibliographique, nous allons dans une première partie présenter un aperçu sur l'obésité et ses complications associées ; nous aborderons aussi les mécanismes de la perception gustative. Nous présentons la plante *Tripterygium Wilfordii* et sa molécule bioactive le célastrol. Puis dans une deuxième partie, nos travaux de recherche portent sur l'analyse physico-chimique et le mécanisme d'action de célastrol par une expérimentation in vivo, et in vitro.

**Chapitre 01 :**  
**Obésité et perception orosensorielle**

## **1. Pathogénèse de l'obésité :**

### **1.1. Qu'est-ce que c'est ?**

D'après l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), Le surpoids et l'obésité sont définis comme une accumulation excessive de graisse, et a une modification du tissu adipeux, qui peut nuire à la santé, et pouvant réduire l'espérance de vie (9). Depuis 1990, l'OMS a défini l'obésité comme une maladie altérant le bien-être physique, psychique et social des populations (10). Il s'agit d'une maladie chronique complexe multifactorielle, résultant de l'expression d'une susceptibilité génétique sous l'influence de facteurs environnementaux, et d'autres comme l'alimentation, le manque d'activité physique, et la sédentarisation excessive (11).

Le surpoids et l'obésité représentent le 5eme facteur de décès au niveau mondial. Chaque année 2,8 millions d'adultes décèdent des suites de ces affections : 44% de la charge du diabète, 23% de la charge cardiopathies ischémiques et 7 à 47% de la charge de certains cancers qui sont attribués au surpoids et à l'obésité d'après l'OMS (2020) (12). La masse adipeuse représente, de 10 à 15 % du poids total chez l'homme, de 20 à 25 % chez la femme. On parle d'obésité lorsqu'elle atteint plus de 20 % du poids total chez l'homme et plus de 30 % chez la femme (13).

### **1.2. Mesure de l'excès de masse grasse :**

La prévalence de l'obésité et du surpoids est généralement définie en utilisant l'indice de masse corporelle (IMC) également appelé Indice de Quetelet (IQ) ou Body Mass Index (BMI) est le reflet de la corpulence (14). Il permet d'estimer l'adiposité et plus particulièrement le niveau du tissu adipeux sous-cutané. Il se calcule via la relation suivante : le poids en kilogrammes (kg) divisé par la taille en mètre (m) au carré (**Tableau 01**) (15).

$$\text{IMC} = \text{Poids (kg)} / \text{Taille}^2 \text{ (m}^2\text{)}.$$

Une valeur de l'IMC est supérieure à 25 kg/m<sup>2</sup>, définit un surpoids et au-delà de 30kg/m<sup>2</sup>, il s'agit de l'obésité. La limite inférieure de l'IMC est de 18,5 kg/m<sup>2</sup>. Ces marqueurs fournissent une échelle commune, mais le risque de la maladie dans la population peut augmenter progressivement même à des valeurs faibles d'IMC (**Tableau 01**) (15).

**Tableau 01** : Interprétation des valeurs de l'IMC selon l'OMS.

Insuffisance pondérale	<18.5
Eventail normal	18.5 – 24.9
Surpoids	> 25.5
Pré-obésité	25.0- 29.9
Obésité	>30.0
Obésité classe 1 (modérée)	30.0- 34.9
Obésité classe 2 (sévère)	35.0- 39.9
Obésité classe 3 (massive)	>40.0

$$\text{IMC} = \text{poids (kg)} / \text{taille}^2 \text{ (m}^2\text{)}.$$

**IMC** : indice de masse corporelle, **OMS** : organisation mondiale de la santé.

Une autre méthode est également prise en compte pour estimer l'obésité : le tour de taille. L'excès de masse grasse dans le niveau abdominale (grasse au tour des viscères) est en effet à risque accru de maladies cardiovasculaires et de diabète, et aussi certains cancers, et ce indépendamment de l'IMC (16). On parle d'obésité abdominale, lorsque le tour de taille est supérieur à 100cm chez l'homme, et à 88 cm chez la femme (en dehors de la grossesse) (17).

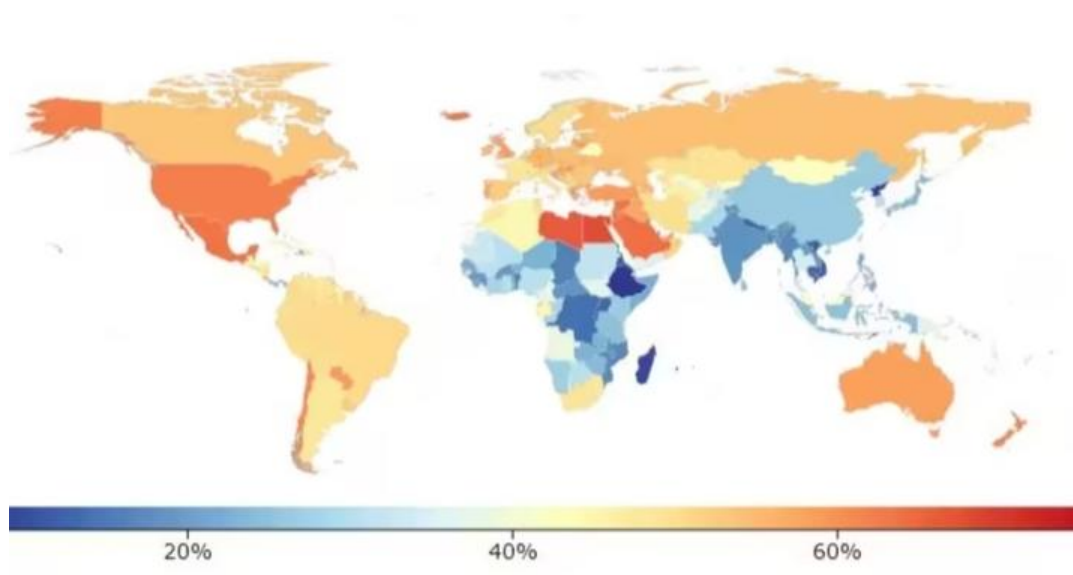
### 1.3. Epidémiologie :

L'obésité a atteint des proportions endémiques dans le monde, avec plus d'un milliard d'individus en surpoids et au moins 650 millions d'entre eux cliniquement obèses. Globalement, environ 13% de la population adulte mondiale (11% des hommes et 15% des femmes) sont obèses, et 39% sont en surpoids en 2016 (18). L'obésité est une cause majeure d'apparition de maladies chroniques ; elle coexiste généralement, dans les pays en voie de développement, avec la malnutrition dans des conditions complexes, associées à une dimension socio-économique et psychologique (WHO 2020). La proportion d'obésité dans le monde est montrée sur la figure 01.

Selon l'étude TAHINA, réalisée en Algérie, la prévalence de l'obésité est de 15,3 % chez l'homme, et 50% chez la femme. Le projet TAHINA lance un cri d'alarme et recommande des stratégies d'intervention sanitaire en Algérie (19).

La prévalence de l'obésité en France reste encore inférieure à celle des Etats-Unis (30%) ou des Pays de l'Europe de l'Est (20%). Elle s'est constituée progressivement tout au long du XXème siècle. De génération en génération, on devient obèse de plus en plus tôt. Le coût économique de l'obésité et de ses conséquences sur la morbi-mortalité représente 2 à 5% des dépenses de Santé Publique dans les pays riches (20).

L'obésité touche aussi l'Union Européenne (associée, dans l'étude décrite, à la Suisse, la Norvège et la Turquie) mais dans une moindre mesure. Plus de la moitié des adultes européens (50.1%) sont en surpoids, et seulement 15.5% sont obèses. Mais, ces chiffres cachent une importante hétérogénéité au sein de l'UE. Effectivement, si certains pays ont un taux très faible d'obésité au sein de leur population comme Roumanie : 7.9%, Italie : 9.9%, et Norvège : 10%, d'autres atteignent des valeurs comparables à celles observées en Amérique du Nord (Irlande : 23%, Malte : 22.3%, et Royaume-Uni : 24.5%) (21).



**Figure 01** : la prévalence de l'obésité dans le monde.

#### 1.4. Les différents stades de l'obésité :

L'obésité est caractérisée par une évolution chronique avec différentes phases successives : constitution, l'excès de poids et fluctuations pondérales. Chaque phase correspond à des situations physiopathologiques, cliniques, thérapeutiques radicalement différentes (22). Avant l'initiation de la prise de poids, il existe une phase préclinique allant de la période intra-utérine aux premiers signes de modification de la corpulence (**fig 02**).

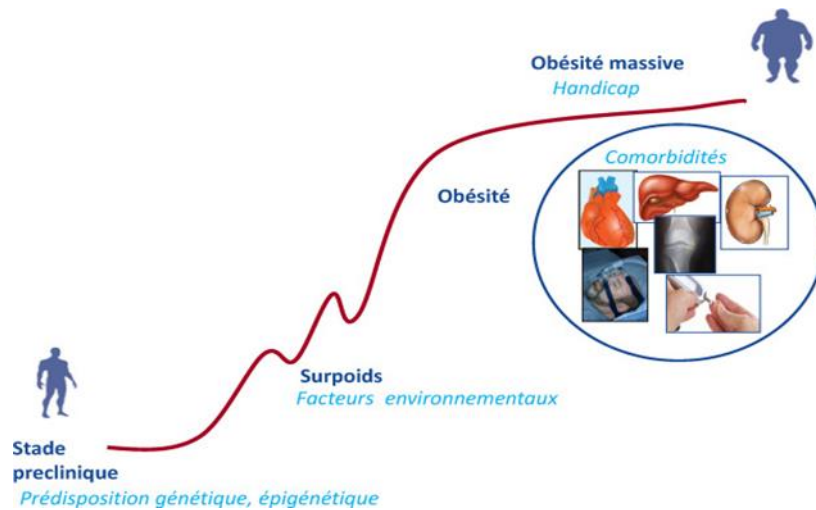
Les facteurs biologiques (épigénétiques, génétiques, développement de la masse grasse) sont importants. Le stade initial de constitution, plus ou moins précoce selon les individus est caractérisé par un déséquilibre énergétique avec des entrées supérieures aux sorties d'énergie (20).

Cliniquement, il y a une augmentation du stock adipeux et une augmentation adaptative de la masse maigre. Donc, Il est commun de penser que le développement de la masse grasse est secondaire à un déséquilibre de la balance énergétique.

La phase de maintien résulte d'un nouvel équilibre énergétique et de modifications de stockage. Une phase d'aggravation de la maladie aboutit au stade d'obésité constituée caractérisée par l'apparition de comorbidités à la fois métaboliques (diabète de type 2, hypertension) et mécaniques (apnées du sommeil, atteintes rhumatologiques, lymphœdème). Cette phase est aussi marquée par des fluctuations pondérales en lien avec des tentatives de perte de poids très souvent suivies de rebonds pondéraux (22).

Ces séries de « yo-yo » pondéral ont des conséquences psychologiques (troubles du comportement alimentaire, trouble de l'estime de soi) et physiques (diminution de la masse maigre, modifications du métabolisme énergétique) et aboutissent à une aggravation du poids.

Cliniquement, il y a une chronicisation du processus d'inflation adipeuse et s'installe une résistance à l'amaigrissement (obésité dite « réfractaire ») (22).



**Figure 02** : Histoire de l'obésité, (23).

## 1.5. Les facteurs de risques :

L'obésité est une maladie dont l'origine est multifactorielle. Elle résulte de l'interaction complexe de nombreux facteurs génétique, comportementaux, métaboliques, et environnementaux. Parmi les grandes causes identifiées, les deux principaux facteurs incriminés actuellement sont la consommation excessive d'aliments énergétiques associée à une diminution des dépenses énergétiques.

### 1.5.1. Facteur génétique :

Les progrès combinés de la génétique quantitative, de la génomique et de la bio-informatique ont permis de comprendre les bases génétiques et les bases moléculaires de l'obésité. Le risque d'obésité est de 2 à 8 fois plus élevé chez les individus avec antécédents familiaux et ce risque varie en fonction de la sévérité et de la classe de l'obésité. Le risque familial est en partie dus à des facteurs génétiques qui représenterait de 5 à 40% des différences interindividuelles pour le surpoids ou l'excès de la masse grasse, et de 40 à 55% des différences interindividuelles pour les formes d'obésité tenant compte de la distribution du tissu adipeux (obésité abdominale sous-cutanée ou viscérale) (23).

Un très grand nombre de gènes et loci potentiellement associés à l'obésité ont été identifiés. 8 gènes sont connus comme étant à l'origine d'obésité mono-génique, chez les souris ob/ob, une

mutation responsable de l'absence d'une hormone, la leptine dont le rôle principal est de limiter la prise alimentaire, est associée à une très forte obésité (24). Le récepteur de cette hormone est aussi impliqué, notamment chez les souris de type db/db ou bien encore chez le rat fa/fa, qui il y a une absence de synthèse du récepteur associée encore une fois à une obésité (25). Les gènes en cause sont sans doute des gènes qui interagissent avec l'environnement pour mener au développement de l'obésité chez des personnes à risque (26). D'autre part, il existe d'autres polymorphismes plus fréquents associés à l'obésité, comme ceux du gène PCSK1 (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 1), codant pour une enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'insuline ou bien le clivage de la pro-opiomélanocortine (27) ou encore MC4R, le récepteur de type 4 aux mélano-cortines, impliqué dans le contrôle hypothalamique de la prise alimentaire. On dénombre à ce jour une centaine de mutations identifiées chez des enfants et des adultes obèses (28). Certaines de ces mutations peuvent être corrélées avec plus de 4% des cas d'obésité étudiés.

D'autres polymorphismes, corrélés à l'obésité, et dans le cas du gène FTO (FaT mass and Obesity associated), corrélés également au diabète de type 2, ont été mis en évidence (29). Ainsi, compte tenu de la rareté des cas, l'obésité mono-génique ne permet pas d'expliquer l'épidémie d'obésité. En effet, les mutations sont à l'origine d'une utilisation optimisée des lipides alimentaires et donc, en période de famine, présentent un avantage certain. Seulement, pendant des périodes de pléthore, comme celle que nous connaissons actuellement, ces mutations, qui favorisent le stockage des lipides, présentent surtout des inconvénients (29).

### **1.5.2. Facteur environnementaux :**

Il existe plusieurs dans notre société (13), on distingue ;

- L'environnement nutritionnel, la variété, la haute palatabilité, la richesse en graisses et la disponibilité des aliments.
- L'environnement social, souvent stressant, avec l'existence d'une discrimination « anti gros » favorisée par l'idéal de minceur véhiculé par les médias.
- L'environnement familial dans lequel s'établissent des conditionnements, des habitudes alimentaires et la plupart du temps un désir de ressemblance.

- L'environnement économique et professionnel avec l'augmentation non négligeable de la sédentarité des populations (diminution des dépenses énergétiques), secondaire à l'industrialisation, le chauffage et la mécanisation.

### **1.5.3. Facteur comportementaux :**

Une mauvaise alimentation peut mener au surpoids ou à l'obésité. C'est la première cause d'obésité. Les mauvaises habitudes alimentaires les plus néfastes sont une alimentation trop riche en gras, trop sucrée, trop salée et surtout en trop grande quantité, et aussi une alimentation « anarchique », pendant et en dehors des repas. Un régime trop strict qui crée un manque et, plus généralement, un régime inadapté peut également conduire à une prise de poids supérieure à la perte enregistrée (23). La sédentarité, liée à une alimentation peu équilibrée, est une cause d'obésité. En effet, si une personne consomme plus de calories qu'elle n'en dépense, son organisme stockera le surplus, ce qui augmentera sa masse grasseuse. La société a évolué et les périodes sédentaires sont nombreuses. La télévision, l'ordinateur, et les consoles de jeux ont participé à son augmentation et donc à l'obésité.

### **1.5.4. Des causes épigénétiques : l'empreinte métabolique :**

C'est une étude des changements héréditaires de l'expression génique indépendants de l'altération de la séquence nucléotidique de l'ADN. A cause de leur réversibilité, ces changements sont sous modifications de l'environnement. Parmi les modifications épigénétiques les plus étudiées sont la méthylation de l'ADN et les modifications des histones (acétylation, méthylation, phosphorylation...) (30). Aussi, des états nutritionnels particuliers (régimes hyper lipidiques, carences protéiques...) pendant la période prénatale, qui va entraîner des modifications épigénétiques conduisant aux troubles métaboliques à l'âge adulte, comme le diabète de type 2 ou encore l'obésité.

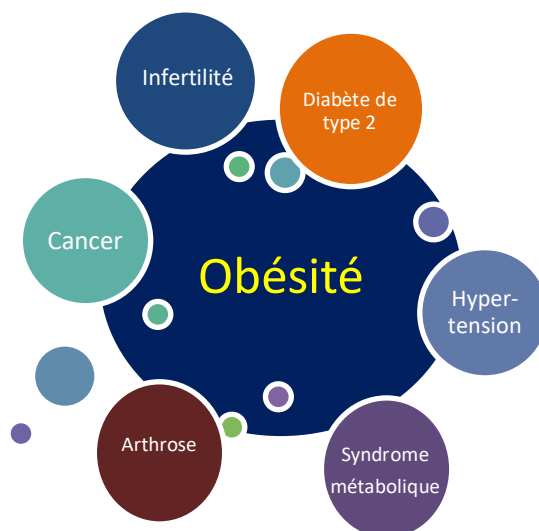
Le modèle des souris yellow agouti a permis de démontrer que les modifications épigénétiques pouvaient être transmises à la génération suivante d'une manière plus ou moins exprimée, de plus le régime alimentaire de la mère influence le niveau de méthylation de l'ADN de la progéniture (31). Donc Il existe une réversibilité de ce phénomène. Ainsi, il apparaît important de développer les études de l'impact de l'épigénétique sur l'obésité chez l'Homme.

## 1.6. Les conséquences :

L'obésité est à l'origine de nombreuses maladies métaboliques associées, telles que l'hypertension artérielle, des dyslipidémies, certains cancers ou bien et une hyperglycémie à jeun, prédisposant l'individu atteint au développement d'un diabète de type 2 ou à des complications cardio-vasculaires. Une production perturbée d'adipokines est la principale origine de ces pathologies, par exemple une surproduction de leptine associée à une diminution de la sécrétion d'adiponectine sont responsables de l'apparition d'un diabète de type 2, la survenue d'une hypertension est résulté de l'augmentation de la production d'angiotensinogène, et une augmentation de la concentration en œstrogène pourrait être à l'origine de certains cancers (30).

Le syndrome métabolique est le cas le plus extrême d'association de symptômes liés à l'obésité (31). Il apparaît que l'augmentation du tour de taille (marqueur d'une augmentation des graisses abdominales) est un facteur de risque de maladie métabolique plus important que l'excès de masse grasse en générale, et par conséquent de l'augmentation de l'IMC. Selon le National Cholestérol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III, 2001) (32), un patient qui remplit 3 critères sur les 5 décrits peut-être diagnostiqué comme atteint du syndrome métabolique. Le tour de taille élevé (supérieur à 94 cm pour les hommes et à 80 cm pour les femmes) devient un critère indispensable auquel 2 des 4 autres critères décrits doivent être remplis pour diagnostiquer un syndrome métabolique d'après L'international Diabètes Fédération (IDF) en 2005.

L'épidémie d'obésité est responsable d'une augmentation constante des cas diagnostiqués de syndrome métabolique, qui devient une priorité des organismes de santé à travers le monde. En France, font état d'une prévalence du syndrome métabolique chez 17.9% des femmes et 23.5% des hommes âgés de 35 à 65 ans selon les résultats de l'étude MONICA menée par l'OMS. Les différentes pathologies résultantes lors de l'obésité, sont résumées dans la figure 03.



**Figure 03** : Complications pour la santé liée à l'obésité.

## **2. Aperçue de système gustatif :**

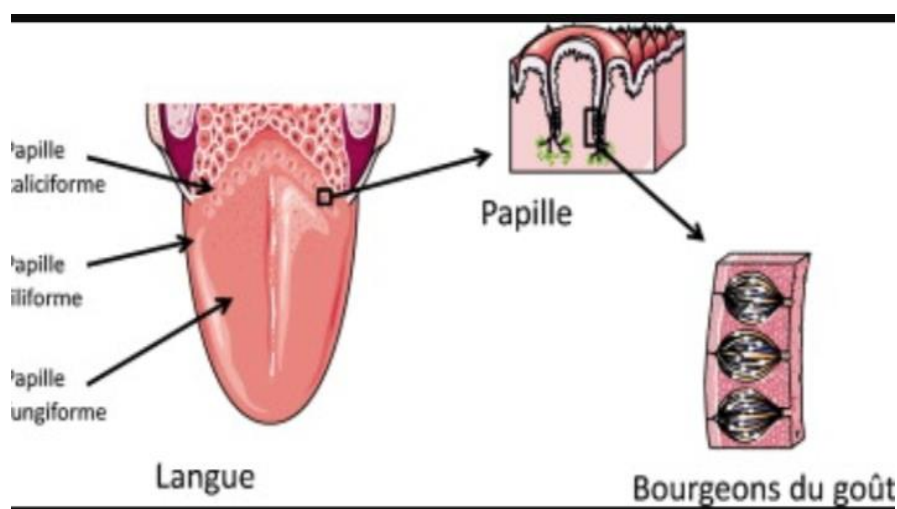
### **2.1. Introduction du gout :**

La gustation est commune à tous les vertébrés. Dans la première phase de la prise alimentaire, la nourriture est mélangé avec la salive sécrétée par les voies sous-mandibulaire, sublinguale et parotide glandes salivaires, un processus appelé mastication. La salive aide à diffuser les molécules appétissantes vers les récepteurs du goût, situés sur les différentes structures de la cavité buccale, et du tiers supérieur de l'œsophage (33).

La détection des molécules sapides est assurée par trois sortes de papilles gustatives au niveau lingual (foliées-formes, fongiformes, et caliciformes) (**Fig 04**), ces papilles équipant par des bourgeons de gouts, sont constitués de quelques dizaines des cellules dont la partie apicale de certaines d'entre elles, présentent essentiellement dans l'épithélium lingual, en contact avec la salive, et contient des senseurs (récepteurs ou canaux ioniques).

Les récepteurs de gout ou les cellules réceptrices du goût ont été identifiés dans toute la cavité buccale (34). La majorité des papilles gustatives sont situées dans les papilles circonviens, tandis que les papilles fongiformes et foliées comprennent chacune presque un nombre égal des papilles gustatives (35).

En revanche, les papilles fongiformes sont nombreuses, mais elles sont dépourvues de papilles gustatives. Cependant, le nombre et la configuration des types des papilles gustatives varient selon les mammifères. Chez l'homme, les papilles caliciformes sont présentes dans la partie Centro-postérieure de la langue et forment le « V » inversé, tandis que les papilles fongiformes et les papilles filiformes, sont présentes sur la surface apicale. Chez les rongeurs, il existe une seule ligne en position centrale des papilles caliciformes, papilles foliées, situées bilatéralement et disposées antérieurement des papilles fongiformes. Il est noté que chez les rongeurs, chaque papille fongiforme contient un seul bourgeon gustatif tandis que les papilles caliciformes et foliées contiennent des centaines de bourgeons de goûts. Il y a environ 50 à 100 cellules gustatives dans chaque papille gustative, entourées par des cellules de soutien (36).



**Figure 04 :** la structure des papilles gustatives sur la langue.

## 2.2. Les cellules gustatives :

Sur la base des données morphologiques, trois différents types des cellules gustatives ont été identifiés (37).

### 2.2.1. Les cellules de type I :

Les cellules de type I sont situées à la périphérie et servent de cellules de maintien, et elles sont le plus nombreuses au sein des bourgeons de gout, leurs nombreuses microvillosités peuvent affleurer dans la cavité buccale. Elles sont nommées aussi « cellules sombres » parce qu'elles présentent des granules denses caractéristiques. Elles sont qualifiées de glial-

like cells car leurs fonctions sont similaires à celles des cellules gliales du système nerveux central. En effet elles expriment les transporteurs de la NTPDase2 (nucléoside triphosphate diphosphohydrolase 2), (38), ainsi que le glutamate GLAST (glutamate-aspartate transporteur), (39), qui hydrolyse l'ATP provenant des cellules voisines. Elles peuvent être considérées comme des neurotransmetteurs dans les bourgeons du goût (40). Aussi, comme les cellules gliales, son rôle, serait de moduler la transmission synaptique et de limiter la propagation des neurotransmetteurs dans les bourgeons du goût (41).

Ces cellules expriment également le canal potassique médullaire externe rénal (ROMK), qui est impliqué dans le maintien de l'homéostasie du potassium (K<sup>+</sup>) (39, 42).

### **2.2.2. Les cellules de type II (TRCs)**

Ces cellules ont un noyau central large et arrondi avec une morphologie fusiforme. Les microvillosités de ces cellules ne sont pas plus longues que les cellules de type I, mais des courtes microvillosités uniformes (43). Ils ont la capacité d'exprimer plusieurs molécules gustatives impliquées dans la transduction des goûts liés aux stimuli du sucré, de l'amer et de l'umami à travers entre autres aux récepteurs appelés T1R (récepteurs du goût de type 1) et T2R (récepteurs du goût de type 2) (44, 45). En effet ces cellules expriment des marqueurs de la transduction des signaux gustatifs, l' $\alpha$ -gustducine (46), le récepteur de l'inositol-triphosphate (IP3R), et la phospholipase C $\beta$ 2 (47).

### **2.2.3. Les cellules gustatives de type III**

Les cellules de type III ont une forme élancée, et possèdent une microvillosité solitaire qui dépasse à travers le port gustatif. La microvillosité unique forme une synapse avec le nerf gustatif (43, 48). Elles sont connues sous le nom de cellules pr-synaptiques qui sont impliquées dans la perception des molécules gustatives liés aux composés acides (49). Elles expriment aussi la protéine de la membrane synaptique SNAP25 (protéine associée synaptique, 25 kDa) (46, 48) et la molécule d'adhésion neuro-cellulaire, NCAM, un ion de type maladie poly-kystique des reins. Canal (PKD2L1), anhydrase carbonique 4 (Car4), décarboxylase d'acide L'aromatique (AADC), et la sérotonine (50, 51). La présence des connexions synaptiques dans les cellules de type III suggère leur implication dans la transmission des informations gustatives aux centres nerveux afférents (52). Cependant, ces les synapses ne sont pas les structures synaptiques classiques. Les bourgeons du goût de la papille caliciforme ont une immuno réactivité avec un neurotransmetteur, la sérotonine



## **2.4. Modalité de gout :**

Il existe principalement cinq modalités gustatives de base ; le sel, le sucré, l'acide, l'amer, et l'umami, mais au cours de dernière décennie, de vastes recherches physiologiques et chimiques ont révélé qu'il existe une 6ème modalité gustative appelée goût du gras.

Chaque goût a une fonction spécifique comme le sel renseigne sur l'incidence des sels de sodium. Le sodium est nécessaire au maintien de la régulation osmotique de l'organisme. Les goûts umami et sucré sont perçus avec des sensations agréables qui informent le corps sur le contenu énergétique, tandis que les sensations acides et le goût amer sont de nature aversive et informent l'organisme sur les molécules nocives et toxiques (56).

### **2.4.1. Le gout salé :**

Le maintien des ions est crucial pour le bon fonctionnement de l'organisme. Le potentiel d'action et la contraction des muscles nécessitent une concentration ionique stable dans l'environnement cellulaire ; cependant, la consommation élevée de sel peut être problématique pour les activités cellulaires du corps. La perception du sel a une réaction à la fois aversive et agréable en fonction de sa concentration. La concentration de 100 mM ou moins reflète une réaction agréable alors qu'une concentration plus élevée est toujours aversive (57). D'après l'OMS en 2006, une consommation élevée de sels (6 g/jour) entraîne une hypertension accidentelle, un cancer gastrique et plusieurs autres complications de santé (58). Donc, le goût salé fait référence à la sensation du sodium, mais certains autres cations comme le potassium et le lithium possèdent également un sens salé, mais d'une intensité plutôt inférieure à celle du sodium (48, 57). Les canaux sodiques épithéliaux (ENaC) facilitent la détection du goût salé (58). Ces canaux possèdent 3 sous-unités nommées ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) (59), la détection essentielle du sodium est jouée par la sous-unité  $\alpha$  (51).

### **2.4.2. Le gout sucré :**

La douceur indique la teneur en glucides des aliments. Le goût sucré est la source d'énergie ultime (60). Les cellules réceptrices du goût de type II sont le principal détecteur des molécules sucrées. La perception du goût sucré est médiée par les hétéro-dimères T1R2/T1R3 (fig 07), (61).

#### **2.4.3. Le gout acide :**

Il y'a des cellules réceptrices spécifiques des canaux ioniques membranaires qui permettent aux ions hydrogène  $H^+$  d'entrer directement à l'intérieur de la cellule (48). Les facilitateurs de la détection de l'ion  $H^+$  sont les canaux potentiels de récepteurs transitoires (PKD2L1 et PKD1L3), les canaux cycliques activés par l'hyperpolarisation (HCN), et les canaux ioniques sensibles aux acides (ASIC) (62).

#### **2.4.4. Le gout umami :**

Umami ça veut dire délicieux en japonais, c'est le goût du glutamate découvert par un scientifique japonais (Kikunae Ikeda) dans les années 1990. Le goût Umami représente la teneur en protéines des aliments. Ce goût est détecté par les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) T1R1/T1R3 (fig 07) (63).

#### **2.4.5. Le gout amer :**

Le goût amer évite la consommation des produits chimiques toxiques et nocifs et évoque les réactions les réactions aversives (56). Plusieurs produits chimiques comme les polyphénols, l'extrait de l'huile d'olive est connu pour leurs propriétés avantageuses pour les activités cellulaires (64). La perception du goût amer détecté par une famille de GPCR appelés T2R (fig 07). Ces récepteurs sont au nombre de 25 à 30 et peuvent former plusieurs combinaisons d'hétéro-dimères pour détecter le grand nombre de molécules amères (65). Ces récepteurs sont activés par certains métabolites toxiques des plantes et des composés toxiques synthétiques (66).

### **3. Perception orosensorielles des lipides alimentaires :**

Chez le mammifère, La composition chimique des aliments joue un rôle important dans le choix alimentaire. Elle est perçue grâce à l'intégration précoces d'origine olfactive, somesthésie (température, texture) et gustative commencée dès la mise en bouche ses aliments et de signaux neuroendocrines et plus tardifs métaboliques. Ces informations convergent vers des zones spécifiques du système nerveux central pour y être intégré, ainsi des réponses comportementales stéréotypées (préférence, satiété, aversion, rassasiement). Donc le mammifère choisit préférentiellement ses aliments en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques, nutritionnelles et hédoniques (palatabilité, digestibilité, composition des nutriments, efficacité métabolique, absence de toxiques)

(67).

La préférence pour les lipides est un phénomène commun à différentes espèces du règne animal. Des données suggèrent que la gustation chez l'Homme, et les rongeurs (rat, souris) présentent une préférence spontanée pour les lipides alimentaires. Il existe des études ont établi que les sujets obèses auraient une préférence accrue pour les graisses alimentaires par rapport aux personnes minces (67). Ces travaux suggèrent qu'il y a une différence de sensibilité dans la perception des lipides alimentaires pourrait contribuer à l'apparition de ces troubles.

Différentes méthodes sont employées pour mesurer la détection orosensorielle des lipides chez la souris. Le Tableau 02, regroupe la principale méthode qui est utilisée pour étudier le comportement alimentaire chez les animaux de laboratoire dans cette thèse.

**Tableau 02 :** Test de comportement le plus couramment utilisé pour les mesures de détection orosensorielle des lipides chez la souris (70).

<b>Test de double choix</b>	Mesure de la préférence pour une solution par rapport à une autre	Court-terme: lickomètre, 2 biberons	Exclusion postingestif Mesure performante	Restriction hydrique+ mise à jeun Apprentissage Stress
		Longue-terme: cage conventionnelle, 2 biberons	Facile et rapide à mettre en place Limitation de stress	Réponse globale. Précision de la mesure moins sensible. Nécessité apport hydrique pendant le test

### 3.1. Classification des lipides :

En 1995 Hennen, a classé les lipides en 6 types principaux, tel que ; les triglycérides, les acides gras, les phospholipides, Terpénoïdes, lipides Sphingo et stérols. Parmi eux six types de lipides, les acides gras, les phospholipides, et les triglycérides sont la première importance. Les phospholipides et les triglycérides nécessitent le groupe carboxyle fonctionnel qui assure la liaison ester entre l'acide gras et le groupe hydroxy du glycérol.

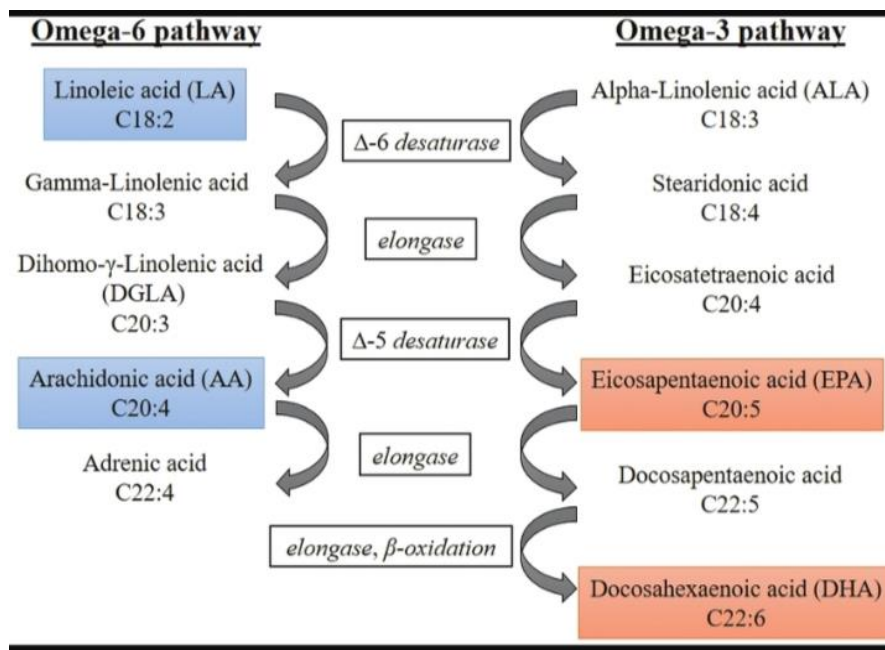
### 3.1.1. Les acides gras :

Les acides gras sont une longue chaîne d'hydrocarbures avec un groupement carboxylique à une extrémité. Ces acides carboxyliques sont soit hydrophobes, soit aliphatiques (chaîne ouverte, non aromatiques) (48).

### 3.1.2. Les acides gras saturés et insaturés

Les acides gras sont en outre classés en AGS (l'acide stéarique et l'acide l'aurique), AGMI (acide oléique) et AGPI (acide linoléique), en fonction du nombre de liaisons simples et doubles dans la longue chaîne hydrocarbonée (fig 06). L'acide gras contient une ou plusieurs doubles liaisons dans leur chaîne hydrocarbonée qui les rend insaturés (71).

Des recherches antérieures suggèrent que la voie de chimio-réception commence avec les AG déclenchant le récepteur ou le canal ionique, qui vont activer une cascade de signalisation complexe avec une augmentation du taux de calcium cytoplasmique conduisant à la dépolarisation de la cellule réceptrice. Puisque cette réaction implique la production de l'IP3 (71,72), le système de transduction ressemble à celui du sucré, de l'amer et de l'umami (73).



**Figure 06** : les deux grandes familles d'acides gras polyinsaturés alimentaires. Les n-6 et les n-3 ont pour précurseurs respectifs l'acide linoléique et l'acide  $\alpha$ -linoléique. Deux types d'enzymes interviennent dans la synthèse, l'élargissement et la désaturation. Adapté de

[www.clinsci.org](http://www.clinsci.org).

### 3.2. Majeurs sources des lipides :

Les lipides alimentaires sont d'origine soit animale, comprend le lait écrémé, le poisson et la viande. Soit végétale tel que les graines oléagineuses, certains fruits comme l'avocat, les huiles de noix, de maïs, et de tournesol contiennent 50 à 70 % d'acide linoléique. Aussi le soja et le colza sont une riche source d'acide  $\alpha$ -linoléique, un acide gras de la famille de  $\omega$ -3. Les produits industriels comme les gâteaux, les pizzas, confiseries, hamburgers, pâtisseries, plats préparés en sont généralement riche en lipides (48, 74).

**Tableau 03 :** Teneurs en acides linoléique et l'acide linoléique (mg/100), des principales graisses animales et des huiles végétales.

Sources alimentaires	Acides gras essentiels (mg/100g)	
	acides linoléique (n-6)	acide $\alpha$ - linoléique (n-3)
<b>Huiles végétales:</b>		
Colza		90
Arachide	20- 29	Traces
Mais	55	
Noix	69- 78	3-13
Olive	7	Traces
Tournesol	55-65	Traces
Soja	50-60	6-10
<b>Graisses animales:</b>		
Poisson		Contient des dérivés
Bœuf	2	0.5
Beurre	3- 5	
Lait	4-8	
Oie	6.5	

**Tableau 04 :** La proportion (g/100 g) en DHA (22 :6 n-3) ET EPA (22 :5 n-3), de certains aliments marine, (75).

Sources alimentaires	EPA (20:5 n- 3)	DHA (22:6 n-3)
Maquereau	0.9	1.6
Huile de foie de morue	9.0	9.5
Saumon	0.3	0.9
Hareng	0.7	0.9
Crabe	0.2	0.1
Huitre	0.3	0.2
Crevettes	0.3	0.2

### 3.3. Transduction de gout du gras :

Les cinq modalités du goût (sucré, salé, acide, umami, et amer) permettent de percevoir les nutriments comme agréables et les toxines comme désagréables (76).

Les saveurs sucrée et umami sont détectées par une famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) T1R1, T1R2 et T1R3, tandis que le goût amer est détecté par le récepteur T2R de la famille de GPCR qui permettent de discriminer de nombreux composés amers et potentiellement toxiques (Fig 07A) (77). Une fois les récepteurs T1R T2R sont activés déclenchent une cascade de réactions (Fig 07B). Ces voies de signalisation engendrent une augmentation des niveaux du calcium ( $Ca^{2+}$ ) cytoplasmique et le taux d'inositol triphosphates (IP3), ce qui va induit l'ouverture du canal potentiel du récepteur transitoire lié à la mélastatine type 5 (TRPM5) et ensuite, la dépolarisation des TRC (Fig 10B) qui aboutit à un potentiel d'action dans la cellule.

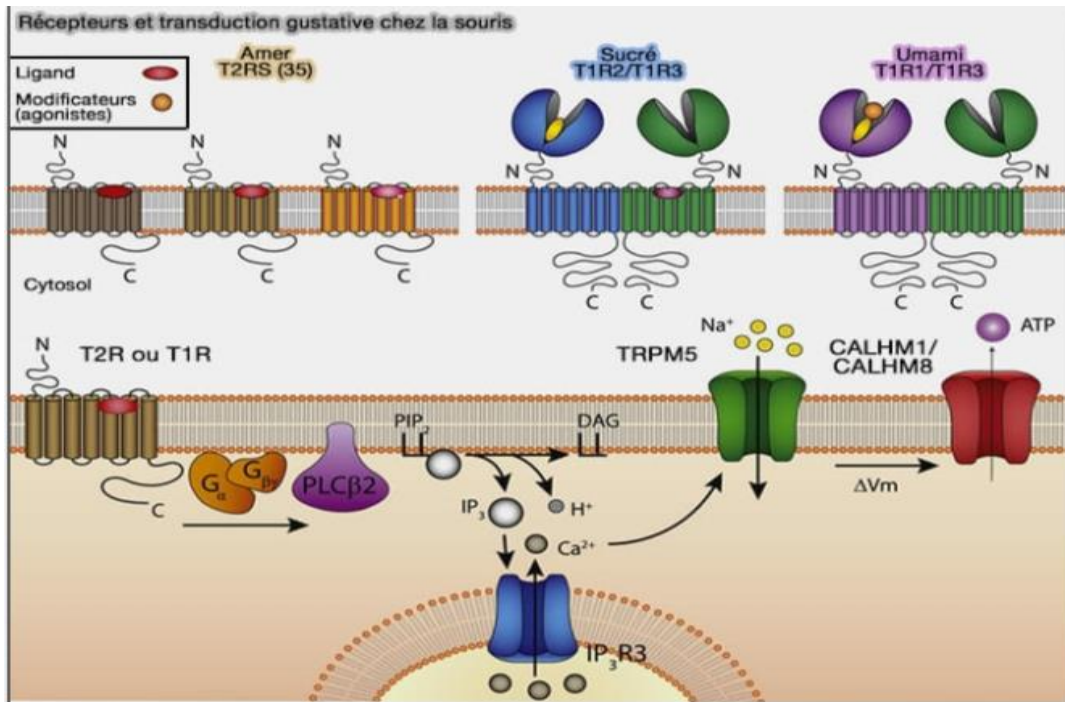
Donc, le neurotransmetteur adénosine triphosphate (ATP) est sécrété dans l'espace extracellulaire via les canaux CALHM1 (Calcium homeostasis modulator 1), qui va entraîner l'activation des cellules réceptrices (78). L'ATP alors stimule directement les fibres nerveuses afférentes. Et il stimule aussi les cellules pré-synaptiques adjacentes, qui libèrent la norépinephrine (NE), les neurotransmetteurs, et la sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) par exocytose synaptique (79).

Le goût acide implique les canaux ioniques PKD2L1 et PKD1L3 permettant l'entrer des protons dans la cellule réceptrice de type III, et permettent ainsi la fermeture des canaux potassiques, et après une dépolarisation suivi le relargage de neurotransmetteurs (80). Concernant le goût salé, le principal stimulus ( $Na^+$ ) passe directement dans la cellule et

travers les canaux sodiques épithéliaux (ENaC), exprimés par les cellules de type I, ce qui conduit à la dépolarisation des cellules réceptrices (48, 74).

En fin, les signaux gustatifs sont transmis par les fibres des nerfs gustatifs jusqu'au système nerveux central (SNC), qui forme le sens du goût et informe l'acceptation ou le rejet des aliments (81, 82).

Des anciennes études ont considérées que seules la texture et l'olfaction étaient impliquées dans la préférence spontanée pour les lipides chez le mammifère. Maintenant, des recherches récentes réalisées chez le rongeur montrent que le goût jouerait un rôle important dans ce comportement, ouvrant aussi la perspective de l'existence d'un système de récepteur pour les lipides alimentaires (sixième modalité du goût) (68). De plus, des études plus nombreuses suggèrent l'existence d'un composant chimio-sensoriel pour le goût du gras lorsque les caractéristiques orosensorielles (la texture et l'olfaction) sont masquées (68, 83). On peut dire que l'information chimique est combinée avec les signaux texturaux pour former une perception sensorielle complète des lipides alimentaires. Mais pour qu'un goût contienne un composant gras, les lipides doivent être solubles dans la salive, cependant les triglycérides (forme prédominante des lipides alimentaires) sont généralement insolubles dans la salive. Les lipides sont similaires aux glucides ou aux protéines car ils se dégradent en sucre simple et en acides aminés. Des études chez les rongeurs montrent que les AGL sont libérés du squelette glycérol des triglycérides dans la cavité buccale par la réaction de la lipase linguale sécrétée par la glande de von Ebner (84, 85). Cette dernière a été démontrée avec une activité beaucoup plus faible que celle des rongeurs chez les humains (86).



**Figure 07** : présentation schématique des récepteurs métabolique et la voie de transduction gustative. (87). Récepteurs transmembranaires des goûts ; amer, sucré et umami chez la souris (A). Transduction des goûts ; amer, sucré et umami (B).

**ATP** : adénosine triphosphate ; **CALHM1** : modulateur de l'homéostasie du calcium ; **DAG** : diacyl-glycérol ; **G $\alpha$**  et **G $\beta\gamma$**  : protéines G, sous-unités  $\alpha$  (notamment  $\alpha$ -gustducine),  $\beta$  et  $\gamma$  ; **IP3** : inositol-triphosphate ; **IP3R3** : récepteur à l'inositol-triphosphate de type 3 ; **PIP2** : phosphoinositol-4,5 di-phosphate ; **PLC $\beta$ 2** : phospholipase C  $\beta$  2 ; **TRPM5** : canal cationique potentiel de récepteur transitoire lié à la mélastatine type 5.

Par conclusion, l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) constitue un évènement clé de la signalisation déclenchée suite à la liaison d'une molécule sapide avec son récepteur spécifique.

### 3.4. Détection des acides gras :

Une faible corrélation entre les différents seuils d'AGL montre une des deux hypothèses : soit, la présence de voies de transduction multiples utilisant différents récepteurs, comme dans la modalité du goût amer qui détecté par une famille de récepteurs gustatifs (T2Rs) (41, 69), ou peut refléter des affinités variables pour les différents AG au même récepteur que celui de la modalité du goût sucré, (fig 07).

Des recherches antérieures montrent que la voie de chimio-réception commence avec les AG déclenchant le récepteur ou le canal ionique, qui vont activer une cascade de signalisation complexe avec une augmentation du taux de calcium cytoplasmique conduisant à la dépolarisation de la cellule réceptrice. Puisque cette réaction implique aussi la production de l'IP3, le système de transduction ressemble à celui du sucré, de l'amer et de l'umami (71, 73).

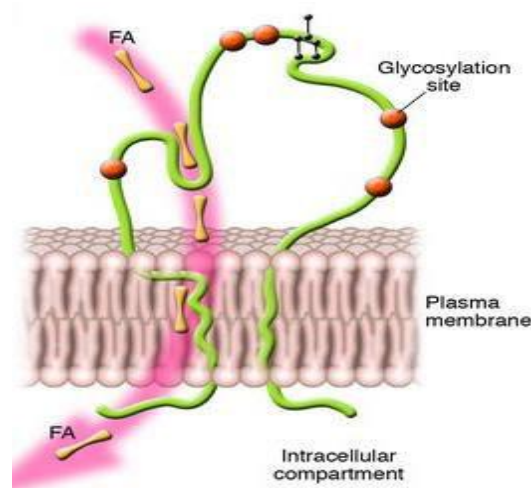
### 3.5. Les récepteurs impliqués dans la signalisation des cellules gustatives :

#### 3.5.1. Le CD36 :

Le CD36 (cluster de différenciation 36), également reconnu comme un transporteur d'AG, il est un candidat plausible en tant que capteur orosensoriel des lipides.

La séquence d'acides aminés de CD36, est sous la forme d'une glycoprotéine transmembranaire avec la structure de poche extracellulaire entre les queues cytoplasmiques amine et carboxyle terminales (Fig 08) (48, 88) permettant la transduction du signal externe dans la cellule (75). Il a une affinité nanométrique avec une gamme de ligands à base de lipides, tels que les AGLC et les lipoprotéines (89).

Le CD36 a été détecté dans les papilles caliciformes et les papilles foliées humaines (71, 90). D'autre part, l'inactivation du gène CD36 abolit la préférence pour les AGLC chez le rat sans affecter la sensibilité au goût de sucre ou de l'amer (71).



**Figure 08 :** la structure membranaire de CD36 (91).

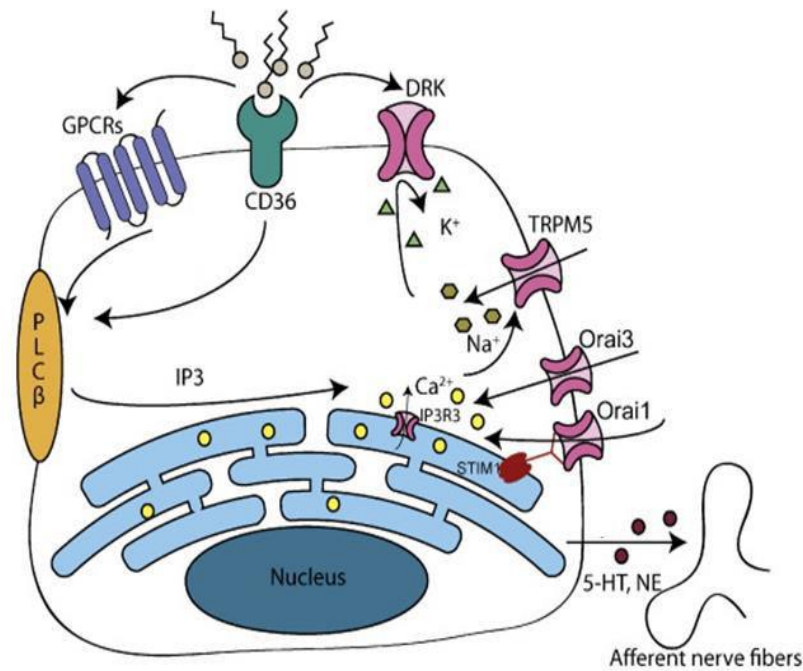
### **3.5.2. Le GPR120 et Le GPR40 :**

Étant donné que le goût amer, le goût sucré et le goût umami détectent par des GPCR, tels que T1R et T2R, il est raisonnable de supposer que les GPCR également jouer un rôle dans la détection des AG. Le récepteur GPR120 (G-protein-coupled receptor 120), et le récepteur GPR40 (G-protein-coupled receptor 40), pourraient être des récepteurs des AG, comme il indique dans le test de mobilisation du calcium *in vitro*, qu'ils répondent aux AG insaturés à moyenne et longue chaînes (92). Les études sur les knockouts des gènes GPR120 et GPR40 des souris montrent une diminution de la préférence pour certains AG tels que l'acide linoléique et l'acide oléique (71, 93). Le GPR120 situe dans le tissu gustatif de souris et s'exprime dans les cellules du récepteur de type II des papilles caliciformes, foliées, et fongiformes. Le GPR120 agit comme un récepteur pour les AG dans la cavité buccale, il intervient dans la transduction de la signalisation gustative au SNC via les nerfs gustatifs afférents. Selon l'analyse de l'expression, l'ARNm de GPR120 est présent dans les papilles caliciformes, fongiformes et les épithéliums non gustatifs humains.

Le GPR40 se trouve dans les cellules de type I dans les papilles foliées et fongiformes des souris (93). Le GPR40 élargit les types de stimuli lipidiques grâce à sa liaison aux AG à chaîne moyenne, courts et AGLC (94).

### **3.5.3. Canaux DRK :**

Les canaux DRK (Delayed-rectifying potassium channels) sont des canaux potassiques associés à la perception du goût du gras chez les rats, ils sont intégrés dans la membrane apicale des cellules gustatives linguales, ce qui permet l'écoulement du K<sup>+</sup> dans l'espace extracellulaire (Fig 09). Tandis que, les AGPI bloquent ces canaux (principalement type Kv1.5), directement ou indirectement, qui conduise à la dépolarisation de la cellule et la transduction du signal (95). Les canaux DRK sensibles aux AG, se trouvent dans les papilles fongiformes et dans la partie postérieure de la langue chez la souris, (74). D'après Gilbertson et al en 1998, leur sensibilité aux AG est liée aux niveaux d'expression des canaux potassiques DRK dans les modèles animaux. L'expression des canaux DRK dans les papilles gustatives humaines n'a pas encore été établie (73, 95).



**Figure 09 :** Proposition du signal de transduction des AGL dans les cellules gustatives humaines (73).

### 3.6. Signalisation calcique et transformation de l'information gustative :

L'ion de  $\text{Ca}^{2+}$  est un élément chimique le plus abondant dans le corps humain il existe de 2 % du poids total. Il joue un rôle important dans la contraction musculaire, la coagulation du sang, le relargage de neurotransmetteurs, et la mobilité du cytosquelette. Les signaux calciques contrôlent une très grande variété des événements cellulaires. Le calcium peut contrôler la croissance et la différenciation des cellules, ou induire l'apoptose. La concentration intracellulaire des calciums libres est de l'ordre du nano molaire, elle est mille fois inférieure à celle du milieu extracellulaire. Il y'a deux possibilités d'augmentation du calcium libre intracellulaire ; la première possibilité est qu'il y ait un influx à partir du milieu extracellulaire via les canaux calciques de la membrane plasmique. La deuxième possibilité est la libération des réserves calciques intracellulaires, constituées par le réticulum endoplasmique, et activé par l'IP3. Les réserves sont limitées et doivent être reconstituées à partir de l'environnement externe. Le réapprovisionnement s'effectue par les canaux capacitifs calciques (74, 96). Dans la majorité des cellules animales, le signal calcique déclenche par une mobilisation de calcium des réserves intracellulaires suite à l'activation des canaux dédiés. Les activités tyrosine-kinase induites lors de l'activation des récepteurs produisent une phosphorylation des protéines cellulaires, telle que la phospholipase C (PLC) (97). La PLC hydrolyse la phosphatidyl inositol 4,5diphosphate (PIP<sub>2</sub>), qui va figurer l'IP3,

et le diacyl-glycéro (DAG : un activateur naturel de la PKC), (73, 98). L'IP3 se fixe sur les récepteurs l'IP3R situés sur la membrane du réticulum endoplasmique et induit la libération des réserves calciques intracellulaires (99).

Des études indiquent que les récepteurs du goût et les canaux ioniques peuvent se coordonner pour réguler la cascade de transduction du signal pour la détection des AG (100, 101). Donc, les AGLC peuvent se lier avec le CD36, suivi par la communication avec GPCR (très probablement GPR120) et déclencher la transduction du signal intracellulaire (Fig 09). Les fonctions de CD36 agissent comme un receveur d'AG qui le transmet à GPR120 qui a une faible affinité (102).

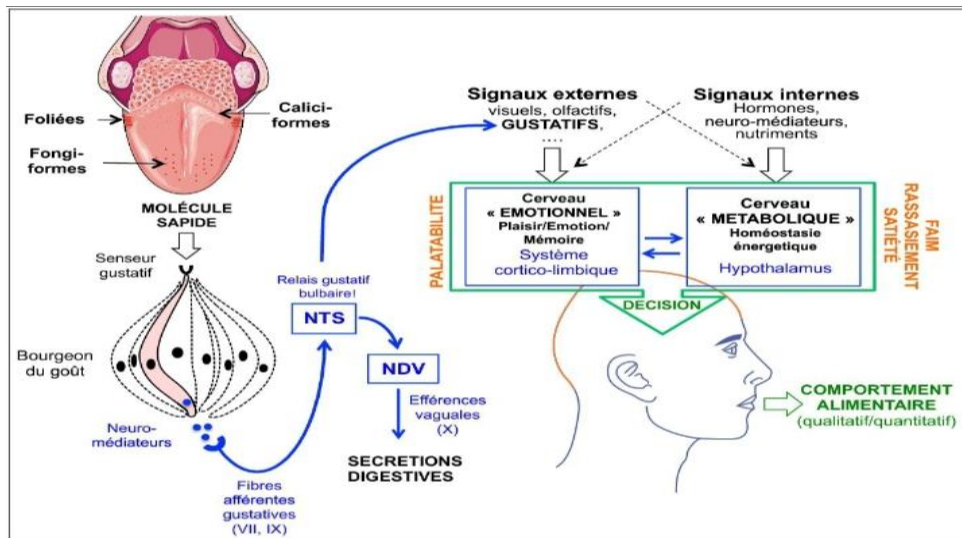
Les AGLC peuvent aussi bloquer les canaux potassiques DRK via la translocation de CD36 ou directement afin de maintenir l'activation cellulaire (Fig 09). L'activation des cellules gustatives suite à l'application des AGLC chez la souris contenant du CD36 induit une augmentation importante du  $[Ca^{2+}]_i$ . La liaison des AGLC à CD36 active la phospholipase C (PLC), ce qui produit l'IP3. L'action de l'IP3 sur son récepteur (IP3R3) au niveau du réticulum endoplasmique (RE) déclenche le relargage du calcium (Fig 09), (99).

La détection du  $[Ca^{2+}]_i$  libre, par la molécule d'interaction stromale 1 (STIM1), située sur la membrane du RE, active les canaux calcique (SOC) de type Orai1 et Orai3 placés sur la membrane cellulaire. Ces complexes induisent l'influx du  $Ca^{2+}$  grâce des canaux SOC et augmenté la concentration du  $[Ca^{2+}]_i$  dans le cytoplasme (73).

En plus, les canaux TRPM5 s'ouvrent et permettent l'entrée du  $Na^+$ , responsable de la dépolarisation cellulaire (103). L'inhibition des canaux DRK pourrait amplifier cette dépolarisation, en présence d'AGPI (101).

Les neurotransmetteurs tels que la 5-HT et la NE sont sécrétées dans le milieu extracellulaire vers les fibres nerveuses gustatives afférentes (Fig 09), après la dépolarisation cellulaire, qui va lier le signal et noyau du tractus solitaire, et au tronc cérébral et puis au tube digestif (68, 72).

La figure 10 résume toute le circuit gustatif, les sécrétions digestives, le comportement alimentaire, et ses conséquences physiologiques.



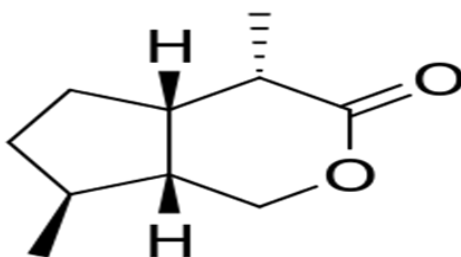
**Figure 10** : Circuit gustatif et conséquences physiologiques sur les sécrétions digestives et le comportement alimentaire. (104).

**NTS** : noyau du tractus solitaire, **VII** : corde du tympan, **IX** : glosso-pharyngien, **X** : vague, **DVN** : noyau dorsal du vague.

**Chapitre 02 :**  
**Les triterpénoides et effet anti-obésité**

## 2.1. Introduction :

Avec les polyphénols, les terpénoïdes sont classés aussi comme des substances secondaires importantes du métabolisme chez les végétaux. Un terpénoïde est un produit naturel apparenté structurellement dérivé de l'isoprène. Les terpénoïdes appartiennent à la classe des isoprénoïdes. Parmi les terpènes similaires, ils se différencient par le fait qu'ils contiennent des groupes fonctionnels, alors que les terpènes sont des hydrocarbures purs. Semblables aux terpènes, les terpénoïdes peuvent également être divisés en groupes en fonction du nombre d'unités isoprène (fig 11), (105). Ces dernières recherches, les substances chimiques dérivées des plantes ont éveillé l'intérêt des milieux publics et scientifique pour leur rôle dans la prévention et de la protection contre les maladies et le maintien de la santé. Plusieurs études suggèrent qu'un apport élevé d'aliments à base des plantes riches en composés polyphénoliques est associé à une diminution de l'inflammation. Autres études in vivo et in vitro montrent que les tri-terpènes penta-cycliques, purifiés à partir des plantes, diminuent différents facteurs liés au syndrome métabolique (16). Les composés phyto-chimiques de ces terpénoïdes pourraient servir des candidats prometteurs pour des essais cliniques pour le traitement du syndrome métabolique. Ils peuvent être de puissants agents anti-obésités. Les terpénoïdes peuvent également jouer un rôle modulateur de goût du gras et exercer des effets bénéfiques lors de l'obésité chez la souris, comme la Zizyphus lotus (un terpénoïde, appartiennent à la famille de rhamnacées), dont les différentes parties sont utilisé, dans la médecine traditionnelle d'Algérie, pour ses activités antidiabétiques, analgésique, hypoglycémie et anti-inflammatoire, exerce des effets immuno-modulateurs (17).



**Figure 11 :** la structure chimique des terpénoïdes (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>).

## 2.2. Classification des terpénoïdes :

Selon le nombre d'unités isopréniques qui les constituent, on distingue :

- Hemi-terpènes (C5)
- Les terpènes dits mono-terpènes (C10)
- Les sesquiterpènes (C15)
- Les di-terpènes (C20)
- Les tri-terpènes (C30)
- Les tétra-terpènes (C40)
- Les poly-terpènes (C4000)

Les stéroïdes rentrent dans le groupe des terpénoïdes et les caroténoïdes sont des tétra-terpènes.

## 2.3. Le célastrol

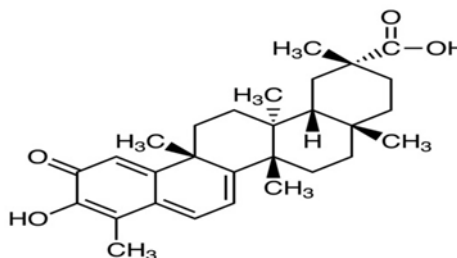
### 2.3.1. Généralité :

Le célastrol est un triterpénoïde friedelane naturel (nommé aussi tripterine), isolé de certains des plantes célastracées telles que *Tripterygium Wilfordii* (106), et *Celastrus orbiculatus* (107), qui poussent en Chine, au Japon, et en Corée. Ces plantes sont utilisées depuis longtemps en médecine traditionnelle chinoise. Il s'agit d'un triterpénoïde penta-cyclique, c'est-à-dire l'acide 24, 25, 26-trinoroleana-1, 3, 5, 7-tétraène-29-oïca, portant un substituant Oxo en position 2, un substituant hydroxy en position 3, et 2 groupes méthyle en positions 9 et 13 (fig12B). Le célastrol est un principe actif de ces plantes (108).

A



B



**Figure 12** : Fig. 12A : Plante de *Tripterygium Wilfordii*, Fig. 12B : Structure chimique de célastrol (C<sub>29</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>).

### 2.3.2. Taxonomie de *Tripterygium Wilfordii* :

Le *Tripterygium Wilfordii*, ou *Lei gong teng*, est une plante de la famille de Celastracées (fig 12A). C'est une plante grimpante aux feuilles lisses sur le dessus, et duveteuses en dessous. Elle fleurit en septembre, ces fleurs d'environ 9 mm sont parfumées, elles sont petites et blanches. Le fruit est brun-rouge d'environ 1,5 cm de long (109).

**Royaume :** Plantes

**Clade :** Trachéophytes

**Clade :** Angiospermes

**Clade :** Eudicots

**Clade :** Rosidés

**Ordre :** Celastrales

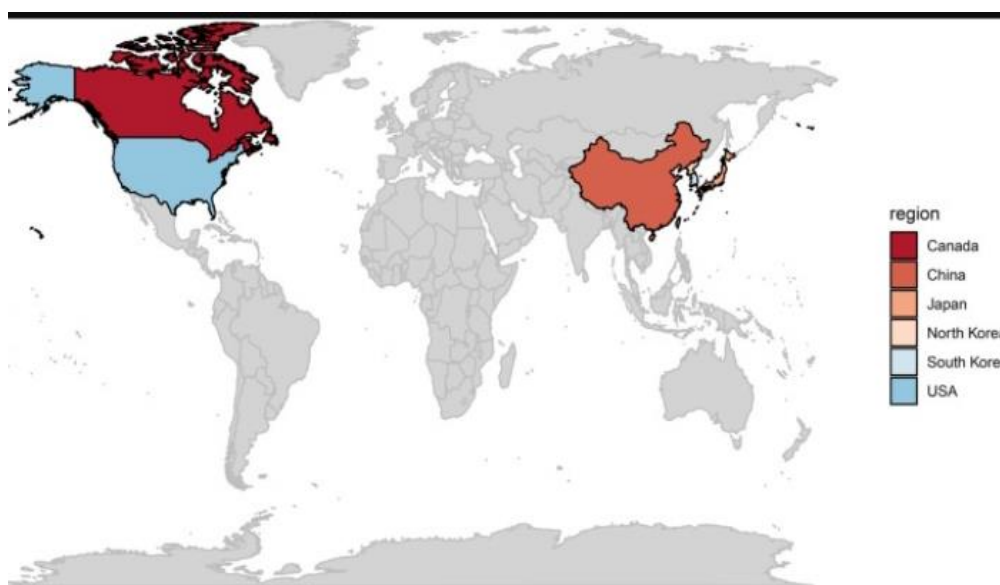
**Famille :** Célastracées

**Genre:** *Tripterygium*

**Espèce:** *T. Wilfordii*

### 2.3.3. Répartition géographique :

*T. Wilfordii* est originaire des régions humides de l'hémisphère nord, notamment en Chine, en Corée du Nord et du Sud, au Japon, au Canada et aux Etats-Unis, avec un total de 1219 sites confirmés dans le monde (fig 13).



**Figure 13 :** Répartition géographique de *Tripterygium Wilfordii* (110).

### 2.3.4. Composition chimique de *T. Wilfordii* :

Récemment, compte tenu de son utilisation potentielle dans le traitement de nombreuses maladies rhumatismales et auto-immunes, la plante *T. Wilfordii* a attiré l'attention de la communauté médicale conventionnelle. Jus qu'à maintenant, plus de 500 métabolites ont été identifiés à partir de *T. Wilfordii*, notamment les sesquiterpènes, les diterpènes, les triterpènes, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les lignanes, et les glycosides. Parmi ces métabolites, des composés notables tels que le célastrol, le triptolide, et le wilforlide (Tableau 04), qui sont contribués aux diverses activités pharmacologique (110).

**Tableau 05** : Compositions chimique de *T. Wilfordii*

Nom	La formule moléculaire	propriétés
Célastrol	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	Anti-cancer, Antioxydant, Anti-obésité, Neuroprotectrices et immunosuppressives.
Triptodile	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>	Anti-inflammatoire, Immunosuppressives, Anti-cancer
Wilforlide	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	Anti-inflammatoire, Immunosuppressives.
Sesquiterpènes	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	Anti-cancer, Anti-bactéries Anti-inflammatoire, Antiparasitaires et antivirales.
Diterpène	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	Anti-cancer, Immuno-modulateure Antivirale,

		Anti-dépression.
Triterpènes Glycosides	C47H32O17 C29H44O12	Anti-inflammatoire, Anti-cancer, Antivirale, Cardio-protectrice, Ani- fibrotique Immunosuppressives, Régule les dysfonctions métaboliques Immunosuppressives Anti-inflammatoire
Alcaloïdes	C23H29N3O2	Antivirale, Anti-inflammatoire, immunosuppressives

### 2.3.5. Intérêt thérapeutique :

L'identification de composés bioactifs dérivés par des plantes médicinales, ont suscité un intérêt considérable ces dernières années pour leurs effets anti-inflammatoires puissants et dans certains cas uniques, propriétés anticancéreuses et neuro-protectrices. Un représentant, un exemple est la plante *Tripterygium wilfordii* (TW), utilisée dans

La médecine traditionnelle chinoise pour traiter un éventail de troubles immunologiques, notamment la polyarthrite rhumatoïde (PR), avec des résultats prometteurs dans une série d'essais cliniques (tableau 05) (111). Plus de 46 diterpénoïdes, 20 triterpénoïdes, et 21 alcaloïdes et d'autres petites molécules ont été isolés à partir de *T. Wilfordii*. Le composé bioactif le plus abondant et le plus prometteur dérivé de la racine de cette plante est le célastrol, qui possède un large éventail d'activités biologiques.

L'utilité thérapeutique et les propriétés anti-inflammatoires du Célastrol ont été étudiées dans plusieurs maladies inflammatoires, y compris PR, spondylarthrite ankylosante, lupus

érythémateux disséminé (LED), maladie inflammatoire de l'intestin, arthrose (OA), allergie et inflammation cutanée. La PR est une maladie inflammatoire chronique à médiation immunitaire caractérisé par une polyarthrite et des lésions articulaires. Tous deux immunisés, les cellules et les cytokines jouent un rôle crucial dans la pathogenèse de cette maladie. Les propriétés anti-inflammatoires du célastral dans cette maladie a jusqu'à présent a été attribuée à la réglementation de la production de cytokines et de chimiokines, régulé l'expression des médiateurs inflammatoires, modulé la fonction des cellules inflammatoire, et la modulation des ostéoclastes et contrôlé les lésions osseuses. Le célastral considéré comme un remède naturel pour traiter les maladies liées à l'inflammation, présente des effets antiarthritiques en ciblant les cellules Tregs Th17 et en inhibant la signalisation NF-κB, a suscité un intérêt considérable ces dernières années pour leurs propriétés anticancéreuses, et neuroprotectrices, une étude montre pour la première fois que le Célastral est un dilatateur cérébrovasculaire à la fois ex vivo et in vivo.

D'après l'étude d'Ozcan et all en 2015, le célastral exerce un effet anti-obésité, sachant qu'il diminue 45% de poids corporel (112).

**Tableau 06 :** les essais cliniques sur les principes actifs de *Tripterygium Wilfordii Hook F* (113).

Nom	Maladies	Numéro gouvernemental des essais clinique	sponsor	Intervention	Phase
Tripterygium Wilfordii	-IgA Néphropathie	-NCT02187900	-Deuxième hôpital Xiangya de l'université du centre de sud.	- TwHF/Mycophenolate mofetil (MMF)	-phase 3
	-Rhumatoïde Arthrites	-NCT04136262	- hôpital Guang'anmen de Chine Académie de sciences médical chinoise.	- <i>Tripterygium wilfordii</i> Hook F (TwHF)/ Methotrexate	-Phase 3
	-virus Immunodéficience humaine.	-NCT01666990	- hôpital 302 Beijing	- TwHF/Placebo Traitement	-phase 2
	-Néphrites, Lupus	-NCT01646736	- Union de Pékin, hôpital de la Faculté de médecine	- <i>Tripterygium wilfordii</i> HookF/Cyclophosphamide/GC	-Phase 3
	-Arthrites,	- NCT01613079	- Union de Pékin,	- <i>Tripterygium</i>	-Phase 3

	<p>rhumatoïdes</p> <p>-rhumatoïde Arthrites</p> <p>-HIV</p> <p>-maladies Inflammatoire de l'intestin, et maladie de Crohn</p>	<p>- NCT03337815</p> <p>- NCT02002286</p> <p>- NCT02044952</p>	<p>hôpital de la Faculté de médecine</p> <p>- hôpital Guang'anmen de Chine Académie de sciences médical chinoise.</p> <p>-LI Techaing, faculté de médecine de l'union de pékin</p> <p>- hôpital Zhu Weiming, Jinling de Chine</p>	<p><i>wilfordii</i> HookF/Methotrexate</p> <p>- MTX et TwHF placebo/TwHF et MTX placebo</p> <p>- <i>Tripterygium Wilfordii Hook F</i> extrac</p> <p>- Tripterygium glycosides/Mesalazine</p>	<p>-phase 3</p> <p>-non applicable</p> <p>-phase 3</p>
--	---	--	---	--	--

## **Conclusion, Hypothèse et objectif du travail**

Le but de la présente étude était de trouver de nouvelles molécules à partir d'origine botanique ou chimique pouvant moduler la perception du goût du gras, chez les rongeurs et les humains. Ces agents pourraient agir soit comme un « goût gras » activateurs » ou « exhausteurs de goût du gras », mais n'apportent pas ou très peu de calories. Dans la poursuite de ces objectifs et après l'étude bibliographique, nous a émis l'hypothèse que les triterpénoïdes sélectionnés d'origine végétale (Célastrol) module la signalisation cellulaire via le récepteur TGR5, donc pourrait agir comme modulateur du goût des graisses.

L'obésité a fait l'objet de nombreuses études sur le plan thérapeutique afin de prévenir et éviter la survenue de ces complications. Récemment, il a été démontré que l'obésité est responsable de l'altération de la perception orosensorielle des lipides alimentaires.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à l'étude de célastrol chez les souris recevant un régime hyper-gras.

Notre travail a pour objectif :

- l'action de célastrol sur la signalisation cellulaire via le récepteur TGR5 dans les papilles gustatives de souris in vitro.
- Le rôle de signal calcique  $[Ca^{2+}]$  intracellulaire, et le signal calcique  $[Ca^{2+}]$  extracellulaire dans la modulation d'ouverture des canaux calciques.
- L'évaluation in vivo des effets anti-obésité et anti-inflammatoire de célastrol, et son rôle sur la modulation de la perception orosensorielle des lipides alimentaires chez les souris recevant un régime hyper-gras.

## **Deuxième partie : les contributions personnelles**

Avant d'entamer cette partie, je souhaiterais souligner que, au cours de ce travail, l'analyse statistique des données a été faite à l'aide du logiciel Statistica (version 4.1, Statsoft, Tulsa, OK, USA). Les données sont présentées en moyenne  $\pm$  SEM. L'importance des différences entre les valeurs moyennes a été déterminée par analyse de variance, suivie d'un test de différence significative.

Les protocoles ont été approuvés le 05/08/2021 par le Comité Régional d'Ethique.

**Cette thèse a fait l'objet de 2 publications (voir, annexe) :**

1 / Célastrol module la signalisation de calcium des mTBC, et la préférence gustative pour un acide gras chez les souris.

2/ Célastrol améliore l'obésité induite par l'alimentation en modulant la préférence pour les graisses et l'inflammation chez la souris.

## **Matériel et Méthodes**

## **1. Matériel :**

Célastrol a été acheté chez Ficher Scientifique (France). Les cellules gustatives de souris (mTBC) ont été préparées et entretenues comme indiqué ailleurs (114). Les milieux de culture cellulaire ont été achetés chez Lonza Verviers (Belgique). Fluo-4/AM de Life Technologies (France). Le milieu RPMI-1640 a été commandé auprès de Dutsher (France). La trypsine a été achetée chez Gibco (USA). L'inhibiteur PLC U-73122 et l'inhibiteur TGR5 SBI-115 ont été achetés auprès de MedChemExpress (France). Les plaques Elisa pour la signalisation du calcium ont été achetées auprès de ClinicScience (USA). Ces plaques sont spéciales pour la signalisation du calcium car elles ont un fond en verre pour réduire l'absorption du spectre. Tous les autres produits chimiques ont été achetés auprès de Merck (France). Des souris mâles C57B/6J âgées de 08 semaines ont été obtenues auprès de Janvier Elevage (Le Genest-St-Isle, France), et le régime alimentaire standard auprès de SAFE (Route de Saint Bris, Augy, France). L'huile de palme a été achetée auprès de l'Huilerie Vigean (France). Tous les solvants et autres produits ont été obtenus auprès de Merck (Saint-Quentin-Fallavier, Lyon, France). Les kits ELISA pour le TNF- $\alpha$  (réf. LS-F12798-1) et l'IL-6 (réf. OKBB00190) ont été achetés auprès de Clinisciences (Nanterre, France).

## **2. Mesure de la signalisation de calcium :**

Les augmentations des concentrations de calcium intracellulaire libre,  $[Ca^{2+}]_i$ , ont été déterminées comme décrit par Dramane et al. En bref, les mTBC ont étéensemencés dans des puits Willico-Dish. Les mTBC ont été incubés avec 100  $\mu$ M de Fluo-4/AM et RPMI, pendant 45 minutes à 37° avant les expériences dans un tampon de chargement contenant : 110 mM de NaCl ; 5,5 mM, KCl ; 25 mM, NaHCO<sub>3</sub> ; 0,8 mM, MgCl<sub>2</sub> ; 0,4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 0,33 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 20 mM, HEPES ; 1,2 mM, CaCl<sub>2</sub> ; et le pH a été ajusté à 7,4. Les concentrations de calcium libre intracellulaire  $[Ca^{2+}]_i$  ont été mesurées par l'appareil Synergy HTX, acheté chez Biotex (USA). Il s'agit d'un spectro fluorimètre qui permet la détection du signal fluorescent émis par une sonde.

Les variations de  $[Ca^{2+}]_i$  ont été enregistrées en plaçant la plaque dans l'appareil. Les enregistrements de changement de fluorescence ont été enregistrés à intervalles Z au fil du temps et analysés à l'aide du logiciel Gen 5 3.11. Les variations de  $[Ca^{2+}]_i$  ont été exprimées sous forme de graphiques, enregistrés aux spectres  $\lambda_{ex}=485nm$  et  $\lambda_{em}=528nm$ . Pour les expériences menées en l'absence de calcium externe (0% Ca<sup>2+</sup>),

CaCl<sub>2</sub> a été remplacé par 2 µM d'EGTA dans le tampon. Toutes les molécules testées ont été ajoutées en petits volumes sans interruption des enregistrements.

### **3. Expérimentation en vivo :**

#### **3.1. Animaux et régime :**

Des souris mâles C57B/6J âgées de huit semaines ont été obtenues auprès de Janvier Elevage (Le Gen-est-St-Isle, France). Les directives générales pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire, recommandées par le Conseil de la Communauté économique européenne, ont été respectées. Le protocole expérimental (C21231008EA) a été approuvé le 05/08/2021 par le Comité régional d'éthique de Bourgogne (France). Les souris ont été hébergées dans un animalerie dans des conditions contrôlées à une température (20 °C ± 2) et une humidité (60 ± 5 %) constantes, avec un cycle lumière/obscurité de 12 h avec de la nourriture et de l'eau à volonté. Les souris (n = 15) ont été divisées en deux groupes : groupe nourri au régime standard (STD) (n = 5) et groupe nourri au HFD (n = 10). L'huile de palme était le principal composant gras du régime riche en graisses. Les différents régimes et leurs compositions en acides gras sont présentés dans les tableaux 7 et 8. Les régimes ont été préparés chaque semaine et conservés à 4 °C jusqu'à utilisation ultérieure.

**Tableau 07 :** compositions des régimes

Composition (%)	STD	HFD
Protéines	66.8	40.07
Amidon	16.10	14.6
Lipides	3.10	35.3
Cholestérol	-	0.03
Cellulose	3.9	2.7
Vitamine	5	3.4
Minéraux	5.1	3.9

Énergie (Kcal100g)	359.5	536.65
Énergie lipidique (% de l'énergie totale)	8	60

**Tableau 08** : compositions en acides gras des régimes.

Acides gras (%)	STD	HFD
AGS	18.82	45.85
AGMI	26.38	40.02
AGPI	54.8	14.13

**AGS** : Acides gras saturés ; **AGMI** : Acides gras mono-insaturés ; **AGPI** : Acides gras polyinsaturés.

### 3.2. Obésité induit par un régime hyper gras :

Des souris mâles C57B/6J ont été soumises à un régime riche en graisses (HFD) pendant 15 semaines. Après 11 semaines de HFD, les animaux obèses ont été divisés en deux groupes : l'un a continué à recevoir le HFD et le véhicule, tandis que l'autre a reçu le même HFD et du célastrol à 100 µg/kg/jour (112) par voie intrapéritonéale pendant quatre semaines supplémentaires. Les souris ont été pesées chaque semaine, et leur apport alimentaire et énergétique a été déterminé quotidiennement. Après 15 semaines, les souris ont été mises à jeun pendant la nuit et sacrifiées par anesthésie à l'isoflurane. Le sérum a été isolé par centrifugation à partir du sang coagulé, et les échantillons de foie ont été pesés et immédiatement conservés à -80 °C jusqu'à l'analyse. Les langues ont été immédiatement prélevées et placées dans une solution de Tyrode pour l'isolement des papilles.

### **3.3. Détermination des paramètres pro-inflammatoires :**

Au moment du sacrifice, le sang a été prélevé dans des tubes secs et centrifugé à  $200\text{ g} \times 10\text{ min}$ . Le surnageant/sérum a été conservé à  $-20\text{ °C}$  jusqu'au dosage des cytokines (IL-6 et TNF- $\alpha$ ). Les kits ELISA ont été utilisés pour quantifier l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  et les dosages ont été effectués conformément au protocole du fabricant, fourni avec les kits.

### **3.4. Déterminations du cholestérol et des triglycérides hépatiques :**

Les échantillons de foie ont été décongelés et homogénéisés dans 9 mL de solution de chloroforme : méthanol (2:1). Du méthanol (3 mL) a été ajouté aux homogénats qui ont été vortexés et centrifugés ( $3000\text{ g} \times 15\text{ min}$ ). Le surnageant résultant (8,25 mL) a été transféré dans des tubes en verre et a été additionné de 4 mL de chloroforme et de 2,75 mL de NaCl à 0,73 %, puis centrifugé ( $3000\text{ g} \times 3\text{ min}$ ). La phase inférieure, après évaporation, a été remise en suspension dans 1 mL de tampon contenant de l'acide 1,4-pipérazinediéthanesulfonique (28,75 mM), du chlorure de magnésium (57,76 mM), des acides gras libres - albumine sérique bovine (8,76  $\mu\text{M}$ ) et du dodécyl sulfate de sodium (0,1 %) et les lipides sont émulsifiés par sonication (115). Les taux de cholestérol total et de triglycérides (TG) ont été déterminés par des méthodes enzymatiques colorimétriques (DiaSys, Allemagne).

### **3.5. Le test de double choix :**

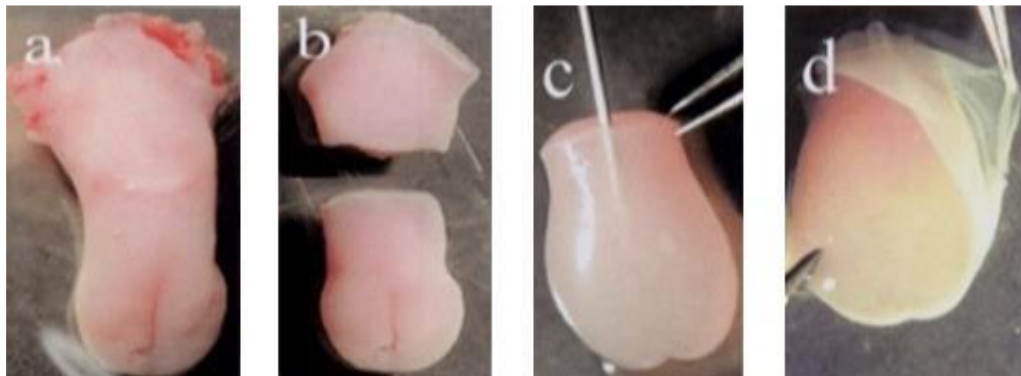
Afin d'étudier la préférence pour une solution lipidique, nous avons utilisé un test de préférence à deux bouteilles, selon une procédure précédemment publiée (71). Avant le début de l'expérience, les souris ont reçu deux bouteilles pendant 24 heures. Elles ont ensuite été soumises à deux bouteilles : l'une contenant 0,1 % d'acide linoléique dans de la gomme xanthane (GX) (0,3 % p/v) dans de l'eau, et l'autre contenant un excipient (GX) (0,3 % p/v). La consommation a été déterminée en pesant les bouteilles après 12 heures, soit toute la nuit.



**Photo 01** : Teste de double choix.

### 3.6. Isolation des papilles gustatives :

Les papilles fongiformes de la langue ont été disséquées au microscope. Les cellules des papilles gustatives de souris (mTBC) ont été isolées, comme décrit précédemment (116), par dissociation enzymatique en utilisant le mélange d'élastase et de dispase, 2 mg/mL chacune dans un tampon Tyrode : 120 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 10 mM d'HEPES, 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, 10 mM de glucose, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de pyruvate de sodium et pH 7,4. Les mTBC isolées ont été conservées à -80° C pour l'analyse RT-qPCR.



**Photo 02** : isolation des papilles gustatives des souris (71).

### 3.7. Détermination de l'expression des ARNm par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) :

Les séquences des amorces utilisées sont présentées dans le tableau 9. L'ARN total a été extrait de cellules hépatiques et gustatives à l'aide de TRizol (Fischer Scientific, Illkirch-

Graffenstaden, Strasbourg, France), puis traité par DNase et rétro-transcrit à l'aide d'un kit de synthèse d'ADNc conformément aux instructions du fabricant. La RT-qPCR a été réalisée à l'aide du système de PCR en temps réel stepOnePlus avec SYBR Green I (Merck, Saint-Quentin-Fallavier, Lyon, France). L'expression relative des gènes a été déterminée par ( $\Delta C_t$ ) par la méthode comparative  $2^{-C_t}$ . La bêta-actine a été utilisée comme gène de ménage.

**Tableau 09** : séquences des amorces

Gene	Primer sequence
Actine	Forward: TGTTACCAACTGGGACGACA Reverse: CTGGGTCATCTTTTCACGGT
Gustuducine	Forward: ACACATTGCAGTCCATCCTAGC Reverse: ATCACCATCTTCTAGTGTATTTGCC
CD36	Forward: ATGGGCTGTGATCGGAACTG Reverse: TTTGCCACGTCATCTGGGTTT
GPR120	Forward: GTGCCGGGACTGGTCATTGTG Reverse: TTGTTGGGACACTCGGATCTGG
IL-1b	Forward: CACAGCAGCACATCAACAAG Revers: GTGCTCATGTCCTCATCCTG
IL-6	Forward: CCGCTATGAAGTTCCTCTCTGC Reverse: ATCCTCTGTGAAGTCTCCTCTCC
TNF $\alpha$	Forward: CCCTCACACTCAGATCATCTTCT Reverse: GCTACGACGTGGGCTACAG
PPAR $\alpha$	Forward: AGAGCCCCATCTGTCCTCTC Reverse: ACTGGTAGTCTGCAAAACCAA
SREBP	Forward: CCCACCTCAAACCTGGATCT Reverse: AAGCAGCAAGATGTCCTCT
FAS	Forward: GGCTCTATGGATTACCCAAGC Reverse: CCAGTGTTTCGTTCCCTCGGA

ACC1

Forward: CGGACCTTTGAAGATTTTGTGAGG  
Reverse: GCTTTATTCTGCTGGGTGAACTCTC

ACC2

Forward: GGAAGCAGGCACACATCAAGA  
Reverse: CGGGAGGAGTTCTGGAAGGA

---

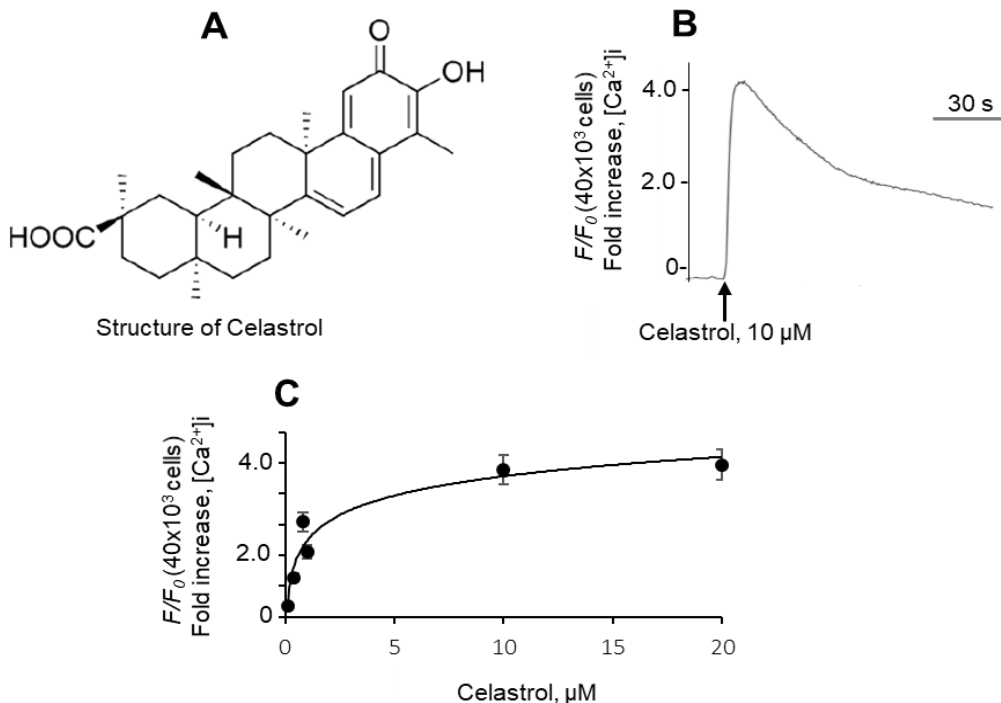
### **2.8. Analyse statistique des données :**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (n = 5). La significativité de la différence entre les moyennes a été déterminée par analyse de variance (ANOVA), suivie du test LSD (least-significant-difference) de Tukey. Les différences significatives ont été considérées comme étant à  $p < 0,05$ .

## **Résultats et Interprétations**

## 1. Célastrol induit l'augmentation de la signalisation calcique dans les cellules gustatives de souris :

Célastrol est un triterpénoïde penta-cyclique, c'est-à-dire l'acide 24, 25, 26-trinoroleana-1,3,5,7-tétraène-29-oïca, portant un substituant Oxo en position 2, un substituant hydroxy en position 3 et 2 groupes méthyle en position 9 et 13 (figure 14A). Célastrol a induit une augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  dans les mTBC, a été marquée par un pic de  $Ca^{2+}$ , suivi d'une diminution en fonction du temps (Figure 14B). L'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  induite par le célastrol est un phénomène dépendant de la dose avec une  $EC_{50} = 1 \mu M$  (Figure 14C).



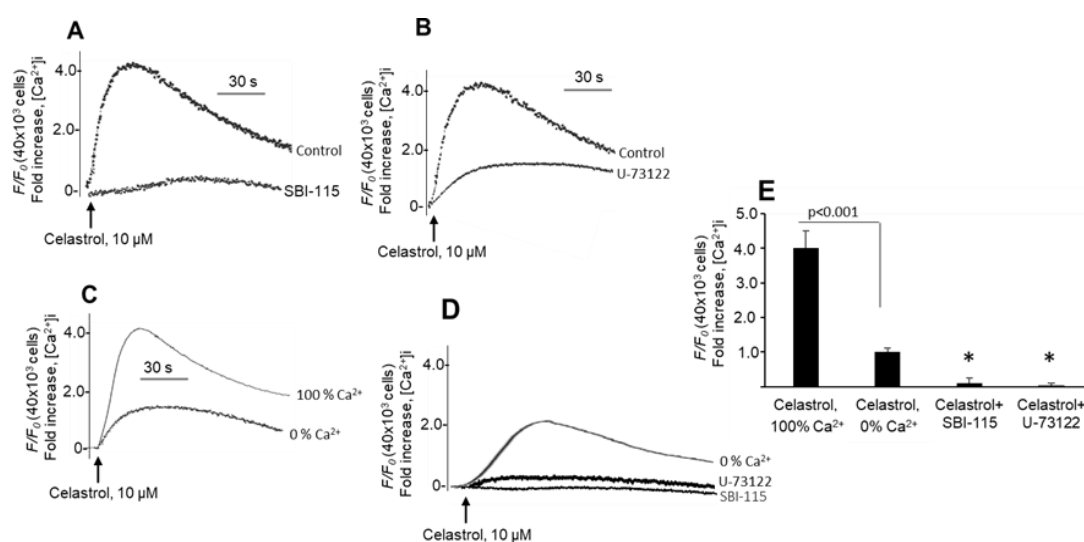
**Figure 14 :** Effets du célastrol sur la signalisation de  $Ca^{2+}$  dans les cellules gustatives de souris (mTBC). Les mTBC cultivés ( $40 \times 10^3$  cellules/test) ont été chargés avec Fluo-4/AM et ont été chargés avec Fluo-4/AM, et les changements de  $[Ca^{2+}]_i$  étaient surveillés comme décrit dans Matériels et méthodes. A montre la structure chimique du célastrol. Les expériences ont été réalisées dans un tampon contenant du  $Ca^{2+}$  (B, C). Une réponse plateau est observée à une concentration de  $20 \mu M$  par ajout de célastrol au mTBC (C). Pointes de flèches indiquer l'heure d'ajout de célastrol sans interruption dans l'enregistrement. Les traces montrent les images identiques, reproduites indépendamment ( $n = 5$ ).

## 2. Célastrol mobilise le $\text{Ca}^{2+}$ via son action sur le récepteur TGR5, couplé au PLC :

Il a été démontré que les triterpénoïdes naturels agissent sur TGR5, qu'est en fait un récepteur membranaire couplé à la protéine G pour les acides biliaires (117).

Les récepteurs de TGR5 ont été exprimés dans un certain nombre d'organes comme le foie, l'intestin, le pancréas, tissus adipeux et muscles (118). Notre laboratoire a démontré que les ARNm de TGR5 sont également exprimés par les cellules des bourgeons gustatifs de l'homme et de la souris (119). Nous avons proposé cette papille gustative de TGR5 peut être la cible de modificateurs de goût tels que la Zizyphine, un triterpène qui se lie au TGR5 lingual (120).

Pour évaluer si le célastrol, étant un terpénoïde, agit via le récepteur TGR5, nous avons utilisé un Antagoniste du TGR5, c'est-à-dire SB-115. Nous avons observé que cet inhibiteur bloquait de manière significative les effets induits par le célastrol sur l'augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dans les mTBC (Fig. 15A et D). De plus, nous avons utilisé un inhibiteur de phospholipase C, U-12273, qui a également diminué de manière significative l'action du célastrol sur les augmentations de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dans les mTBC (Fig. 15B, D).



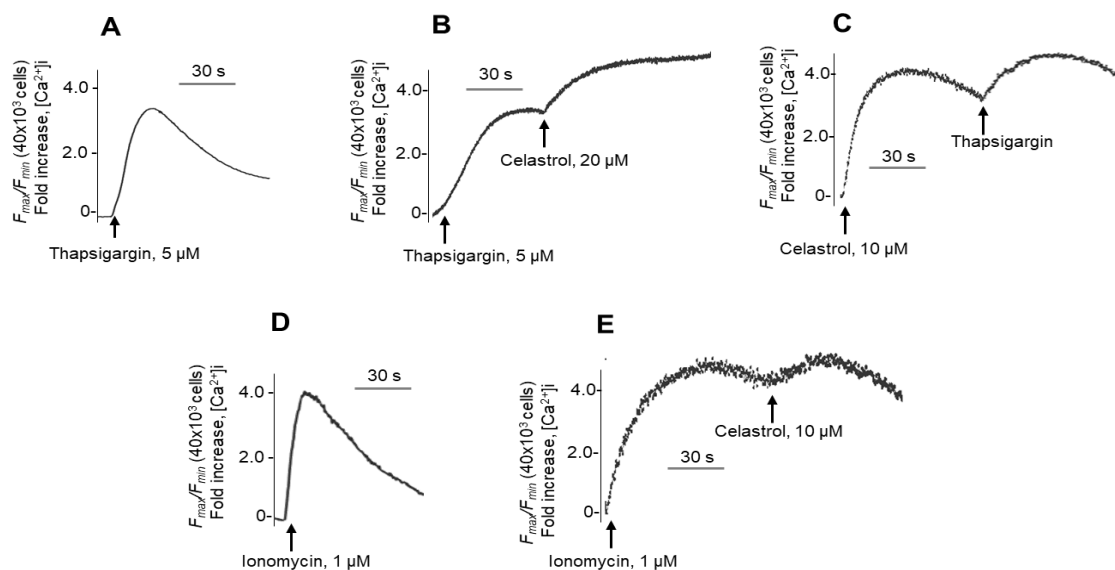
**Figure 15 :** Effets du célastrol et des agents pharmacologiques sur l'augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dans les cellules des bourgeons gustatifs de souris (mTBC). Les changements dans  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sont présentés en réponse au Célastrol après pré-incubation pendant 15 min avec

soit SBI-115 (antagoniste TGR5) à 100  $\mu\text{M}$  (A) ou U-73122 (antagoniste PLC) à 10  $\mu\text{M}$  (B). Les expériences ont également été réalisées dans un milieu à 100 % de  $\text{Ca}^{2+}$  (contenant du  $\text{Ca}^{2+}$ ) ou à 0 % de  $\text{Ca}^{2+}$  (sans  $\text{Ca}^{2+}$ ) (C). Les pointes de flèches indiquent l'heure d'ajout de célastrol. D montre la réponse du célastrol dans un milieu à 0 % de  $\text{Ca}^{2+}$  (sans  $\text{Ca}^{2+}$ ). Les mTBC ont été pré-incubés ou non avec du SBI-115 (40  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ou du U-73122 (10  $\mu\text{M}$ ) pendant 15 min avant de démarrer les enregistrements  $\text{Ca}^{2+}$  (A,B,D). Les traces montrent les images identiques, reproduites indépendamment. E montre les valeurs sous forme de moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ), dérivées des expériences réalisées en A-C. Le test t bilatéral a été utilisé pour les calculs statistiques. Les astérisques indiquent le valeurs significatives ( $p < 0,001$ ) par rapport au Célastrol.

### **3. Célastrol recrute du $\text{Ca}^{2+}$ à partir de pools intra et extracellulaires suivi de l'ouverture des canaux TRPC3**

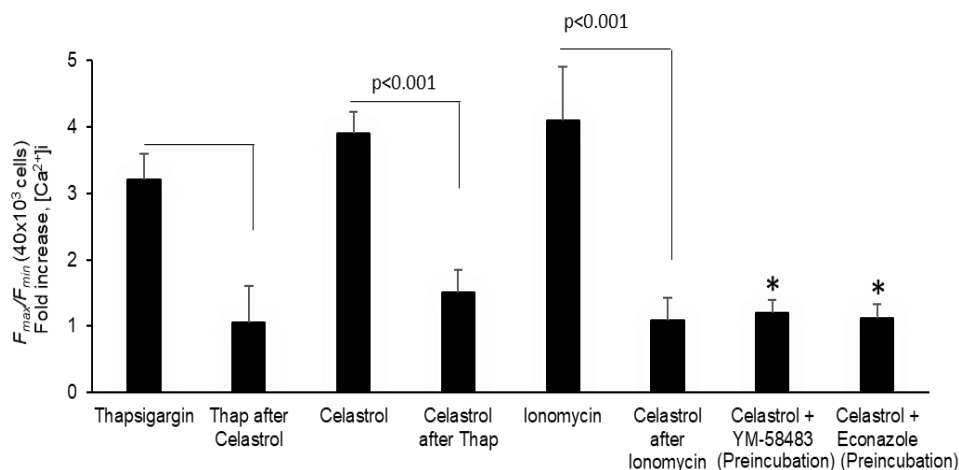
Nous avons en outre mené des expériences dans un milieu sans  $\text{Ca}^{2+}$  et observé que l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire entraînait une diminution de la réponse du Célastrol (Fig. 16 C, D), Afin de mieux approfondir la nature du recrutement de  $\text{Ca}^{2+}$ , nous avons utilisé la thapsigargine et l'ionomycine.

La thapsigargine (TG), un inhibiteur de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase du réticulum sarcoplasmique-endoplasmique (SERCA), (121) a déclenché une augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dans les mTBC. En mode d'enregistrement continu, nous avons ajouté de la thapsigargine avant ou après le célastrol. Nous avons observé que l'ajout de l'un après l'autre entraînait une réponse diminuée, mais non supprimée, de l'agent respectif (Fig. 16A, B, D). De plus, nous avons utilisé de l'ionomycine, à 1 $\mu\text{M}$ , connu pour ouvrir les canaux calciques, SOC = store-operated calcium, car ils sont ouverts seulement lorsque le calcium est libéré du réticulum endoplasmique et sort vers le milieu extracellulaire (122). L'ionomycine a induit une augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dans les mTBC (Figure 16D, C). Il est à noter que l'adjonction de célastrol après l'ionomycine a entraîné une diminution de la signalisation de  $\text{Ca}^{2+}$  induite par le célastrol dans les mTBC (Fig. 16E, Fig. 17).



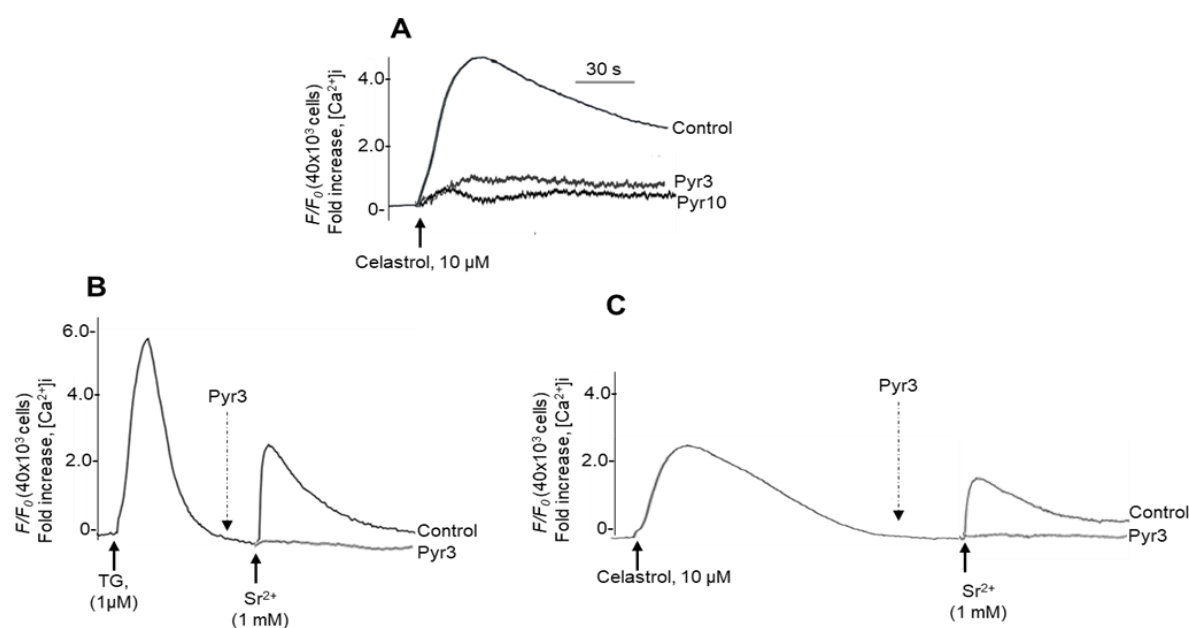
**Figure 16** : Effets de la thapsigargine (TG), de l'ionomycine et du célastrol sur la signalisation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules gustatives des souris (mTBC). Les changements de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ont été surveillés comme sur la figure 1 et décrits dans Matériels et méthodes. Des augmentations de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sont indiquées en réponse à TG à  $5 \mu\text{M}$  (A). En B et C, TG ( $5 \mu\text{M}$ ) et célastrol ont été ajoutés l'un après l'autre. D montre les changements de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dans la réponse à l'ionomycine, alors que E montre les changements dans  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , induits par l'ajout de l'ionomycine, suivie de l'ajout de célastrol (E). Les traces montrent les images identiques, reproduit indépendamment.

Afin d'évaluer l'implication des canaux  $\text{Ca}^{2+}$ , appelés canaux  $\text{Ca}^{2+}$  (SOC) exploités en magasin, nous avons utilisé deux inhibiteurs, à savoir le YM-58483 et l'éconazole (Fig. 17).



**Figure 17 :** Effets de différents agents sur les augmentations de  $[Ca^{2+}]_i$  dans les mTBC. Les histogrammes sur la thapsigargine et l'ionomycine représentent les expériences menées dans la Figure 16. Certaines expériences ont également été menées sur la pré-incubation du mTBC avec des inhibiteurs des canaux SOC (YM-56483 à 1  $\mu$ M et Econazole à 30  $\mu$ M). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (n=5). Le test tt à deux queues a été utilisé pour les calculs statistiques. Les astérisques indiquent les valeurs significatives ( $p < 0,001$ ) par rapport au célastrol.

Nous avons observé que les deux inhibiteurs de SOC diminuaient significativement les augmentations de  $[Ca^{2+}]_i$  par le célastrol. Nous avons déjà montré que les mTBC exprime le TRPC3, mais pas le TRPC6, les canaux et l'afflux de SOC dans les mTBC est provoqué par les canaux de  $Ca^{2+}$  composés de Orai1/TRPC3 (123). Par conséquent, nous utilisons, Pyr3 et Pyr10 qui sont les inhibiteurs de TRPC3. Nous avons observé que les deux TRPC3 les bloqueurs de canaux ont significativement diminué les augmentations de  $[Ca^{2+}]_i$  dans les cellules des bourgeons gustatifs (Fig 16E, et Fig 18).

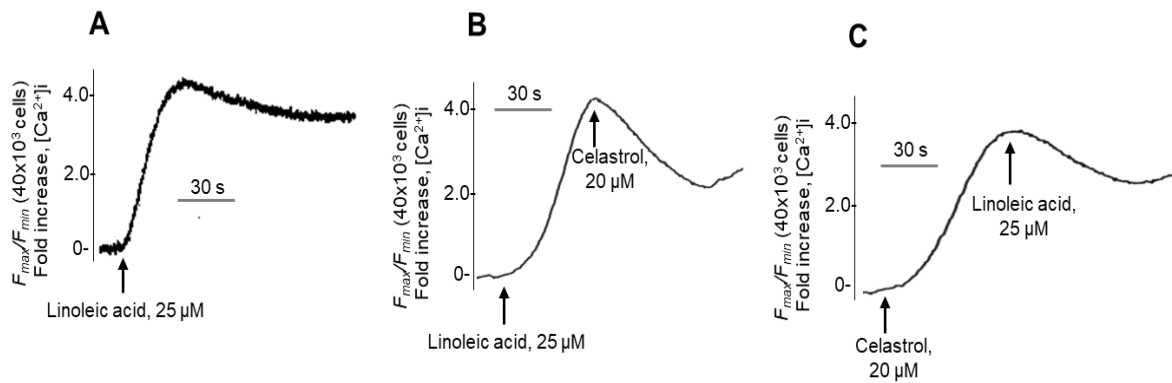


**Figure 18 :** Implication du canal TRCP3 dans l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  induite par le célastrol dans les cellules des papilles gustatives de souris (mTBC). Dans l'exemple A, les cellules ont été préincubées avec Pry3 (20  $\mu$ M) et Pyr 10 (1  $\mu$ M) pendant 15 min et les enregistrements de  $Ca^{2+}$  ont commencé. B et C, les expériences ont été réalisées dans un milieu à 0 % de  $Ca^{2+}$  (sans  $Ca^{2+}$ ). Après l'ajout de TG ou de célastrol, du Sr<sup>2+</sup> a été ajouté

avec ou sans ajout préalable de Pyr3 à 20  $\mu\text{M}$  (flèche hachurée). Les tracés montrent les mêmes images, reproduites indépendamment.

#### 4. Célastrol partage la signalisation de $\text{Ca}^{2+}$ induite par un acide gras alimentaire

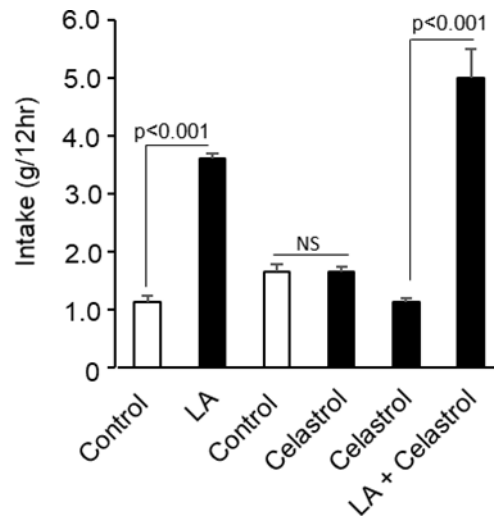
Pour déterminer si le célastrol interfère avec la signalisation de  $\text{Ca}^{2+}$  évoquée par l'acide linoléique (LA), nous avons ajouté du Célastrol avant et après LA dans différentes configurations expérimentales. LA a induit une augmentation soutenue de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dans les mTBC (Fig. 19A). Une réponse additive de  $\text{Ca}^{2+}$  a été observée lorsque LA a été ajoutée pendant la réponse de  $\text{Ca}^{2+}$  soutenue induite par le célastrol (Figure 19B, D). Cependant, les réponses du célastrol et de l'acide linoléique ont été significativement diminuées lorsqu'ils ont été ajoutés l'un après l'autre (Fig. 19C, D).



**Figure 19** : Effets additifs du célastrol et de l'acide linoléique (LA) sur le  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dans les cellules gustatives des souris. Les changements de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ont été surveillés comme décrit dans la figure 1 et Matériels et méthodes. Les pointes de flèches indiquent l'heure d'ajout de célastrol ou de LA sans interruption de l'enregistrement. Les traces montrent les images identiques, reproduites indépendamment.

#### 5. Célastrol interfère avec la préférence spontanée pour les graisses

Dans un test avec deux flacons, les souris ont montré une préférence spontanée pour une solution contenant du LA (Figure 20). Cependant, l'ajout de célastrol aux solutions contenant du LA a augmenté l'apport en acides gras (Figure 20).

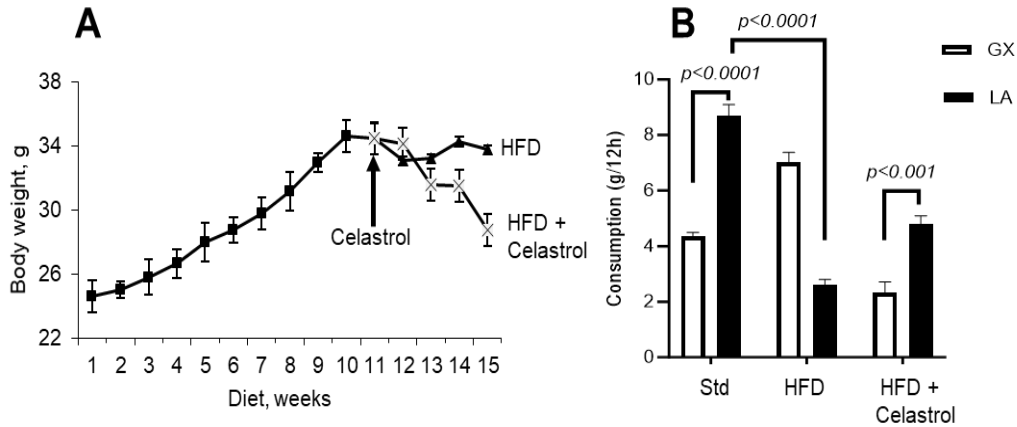


**Figure 20 :** Les tests de préférence à deux bouteilles. Le test de préférence gustative a été réalisé chez des souris privées d'eau pendant 6 heures puis placées dans des cages avec deux flacons : Contrôle (0,3% gomme xanthane) et LA à 0,2% ou célastrol 20  $\mu$ M seul ou célastrol plus LA à 0,2%. Toutes les solutions pour ces tests ont été préparées dans du véhicule gomme xanthane (3%). Les valeurs sont en moyenne  $\pm$  SEM. Le test t bilatéral a été utilisé pour les calculs statistiques.

## 6. Effets de célastrol chez les souris obèse, nourries par un régime hyper gras :

### 6.1. Célastrol diminue la prise de poids et module la préférence pour les lipides alimentaires chez les souris nourries avec un régime riche en lipides :

La Figure 21 montre le gain de poids corporel chez des souris maintenues sous régime HFD pendant 15 semaines. Les souris maintenues sous HFD ont pris du poids en fonction du temps (Fig. 21A). Cependant, le poids corporel est resté presque le même à partir de la 11e semaine chez les souris nourries avec HFD. Il est intéressant de noter une réduction significative et progressive du gain de poids corporel après 4 semaines de début de l'administration de Célastrol chez les souris obèses, administrés avec le Célastrol.

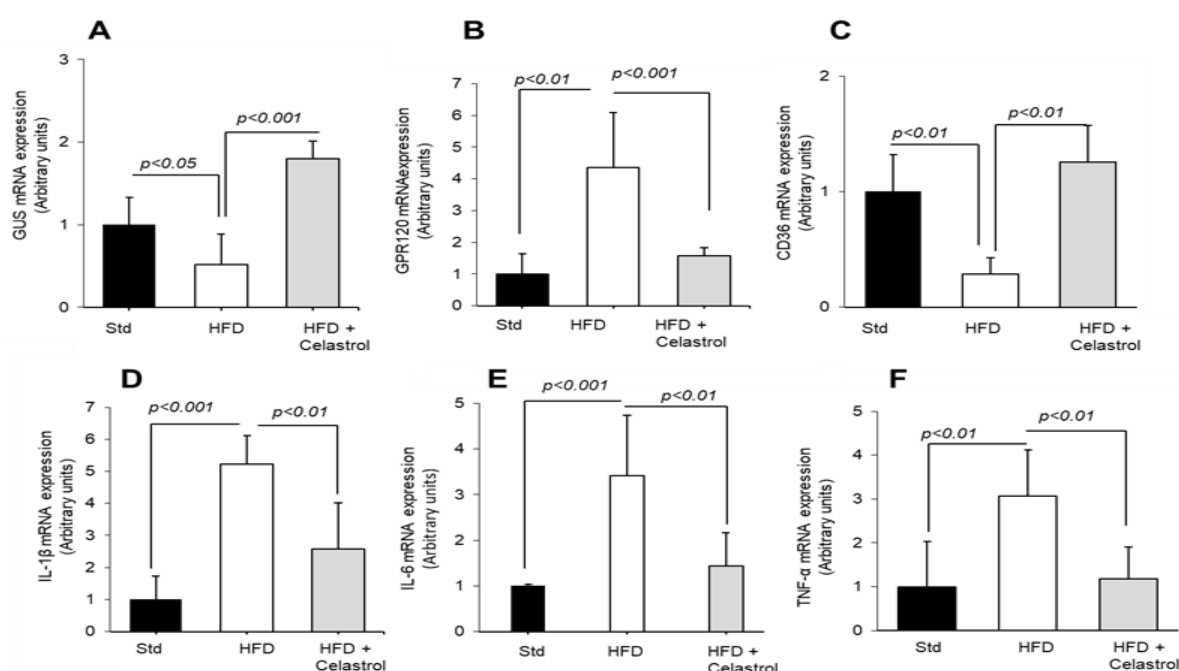


**Figure 21** : Effet de Célastrol sur l'obésité induite par l'alimentation et la préférence pour un acide gras alimentaire. A : Les souris sont soumises au régime hyper-gras (HFD) pendant 15 semaines (n 10). À la 11e semaine de HFD, les souris ont été divisés en deux groupes : l'un des groupes a continué à être maintenu sous HFD seul (triangles remplis), tandis que le second a été nourri avec le même HFD et a reçu du Célastrol (100 µg/kg/jour), par voie intrapéritonéale pendant 4 semaines supplémentaires (dépassement des valeurs). La flèche sur la figure montre la 11ème semaine du HFD lorsque les souris ont été divisées en deux groupes. Le poids corporel a été mesuré chaque semaine. Les astérisques (\*) montrent les différences significatives entre les deux groupes ( $p < 0,01$ ). B : Un autre groupe de souris (n = 5), soumis à un régime alimentaire standard pendant la même durée, soit 15 semaines, sert de groupe témoin (Figures 21B). Après 15 semaines, les animaux sont privés d'eau pendant 6 heures et un test de préférence à deux biberons est réalisé. GX : gomme xanthane ; LA : acide linoléique.

Afin de comparer l'attirance gustative pour les lipides chez la souris, le test de préférence sur deux bouteilles a été réalisé en utilisant un acide gras alimentaire à longue chaîne (LCFA), à savoir l'acide linoléique, à 0,1 % (p/v). Les souris nourries au régime standard ont montré une forte préférence pour une solution contenant des LCFA ; cependant, les souris nourries avec HFD ont montré une diminution significative de leur préférence pour les acides gras. Fait intéressant, le traitement avec le célastrol a régulé positivement la diminution de la préférence pour la graisse chez les souris maintenues sur un HFD (Fig. 21B).

## 6.2. Célastrol module l'expression des ARNm des récepteurs du goût du gras et des cytokines pro-inflammatoires chez les souris nourries avec un régime hyper-lipidiques

Afin de déterminer si l'altération de la préférence pour les acides gras chez les souris obèses est due à une expression altérée des récepteurs du goût des graisses dans l'épithélium de la langue, nous avons examiné l'expression de l'ARNm des principaux récepteurs lipidiques (CD36 et GPR120) ainsi que de la gustducine (GUS), un marqueur des cellules réceptrices du goût, dans les cellules des papilles gustatives de souris (Figures 22A–C). Nous avons observé une diminution significative de l'expression des ARNm de CD36 et de GUS dans les papilles gustatives chez les souris nourries avec un régime riche en lipides (HFD). Les souris obèses ayant reçu du célastrol (HFD+ célastrol), présentaient une expression de l'ARNm de CD36 et de la gustducine significativement plus élevée que celles nourries avec un régime riche en lipides (HFD). Cependant, les ARNm de GPR120 n'a pas suivi la même tendance : son expression était régulée à la hausse chez les souris obèses, tandis que le célastrol la limitait également.



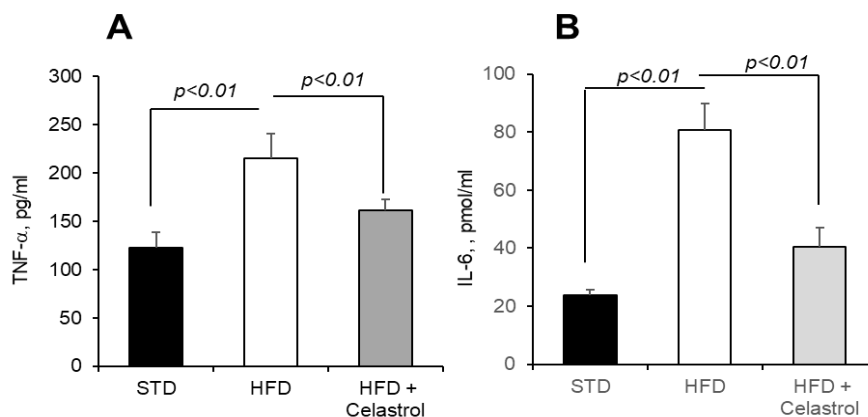
**Figure 22** : Effet du Célastrol sur l'expression des ARNm codant pour la gustducine, les récepteurs du goût des graisses et les cytokines pro-inflammatoires dans les cellules des papilles gustatives. Après 15 semaines d'expériences (voir légendes de la figure 21), les animaux ont été sacrifiés et les papilles gustatives fongiformes ont été récupérées afin

d'isoler les cellules des papilles gustatives. Ces dernières ont été soumises à des analyses RT-qPCR pour l'expression de l'ARNm de la gustducine, de GUS (A), de GPR120 (B), de CD36 (C) et des cytokines pro-inflammatoires, IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  (D–F) dans les mTBC.

Nous avons également examiné les taux des ARNm des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$ ) dans les mTBC isolé de souris obèses, traitées ou non au Celastrol. Comme indiqué, l'expression des ARNm de gènes tels que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  était augmentée par un régime riche en lipides, et leur expression était régulée à la baisse par le traitement au Celastrol (Figures 22D–F). Dans cette étude, il aurait été préférable de déterminer l'expression des capteurs lipidiques au niveau protéique par Western blot.

### 6.3. Célastrol diminue les concentrations circulantes de cytokines pro-inflammatoires

L'obésité étant associée à une inflammation de bas grade, nous avons déterminé les concentrations sanguines d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  par ELISA (Fig. 23A, B). Les concentrations d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  ont augmenté chez les souris nourries avec HFD, tandis que le célastrol a abaissé leurs niveaux chez les souris obèses (Fig. 23A, B).



**Figure 23 :** Effet du célastrol sur les cytokines pro-inflammatoires circulantes chez la souris. Le protocole était identique à celui décrit sur la figure 21 et mentionné dans Matériels et méthodes. Après 15 semaines d'expérimentation, les souris ont été sacrifiées et les sérums ont été isolés et utilisés pour la détermination des concentrations d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  par ELISA. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (n = 5). ANOVA établie par le test de Tukey.

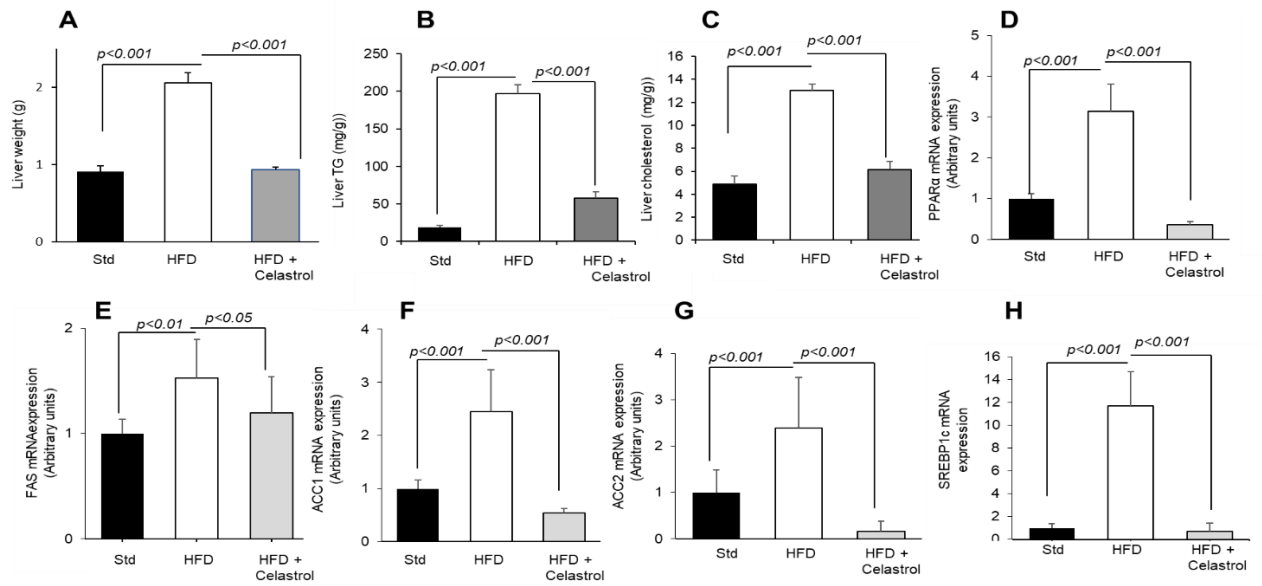
#### **6.4. Célastrol régule l'expression des ARNm des médiateurs métaboliques lipidiques dans le foie**

Dans un premier temps, nous avons déterminé le poids du foie et observé qu'une alimentation riche en graisses augmentait le poids du foie, tandis que le traitement au Célastrol le diminuait significativement (figure 24A). Il est intéressant de noter qu'une augmentation des taux de triglycérides et de cholestérol dans le foie des animaux soumis à un régime riche en graisses a été observée, tandis que le Célastrol a diminué leurs concentrations hépatiques (figures 24B, C).

Nous avons également déterminé les taux des ARNm des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique. Plusieurs résultats suggèrent que l'activation du gène PPAR $\alpha$  est impliquée non seulement dans le métabolisme lipidique, mais aussi dans l'induction de la « réponse de phase aiguë » de l'inflammation dans le foie (124-125). Par conséquent, il a été constaté que le déficit du gène PPAR $\alpha$  régule à la baisse l'ARNm de certains agents pro-inflammatoires, comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 chez la souris (126). Nos résultats suggèrent que l'action anti-inflammatoire du célastrol dans le foie pourrait être, en partie, contribué par son action sur la diminution de l'expression des ARNm du PPAR $\alpha$  (Figure 24D).

L'ACC et le FAS ont été considérés comme des biomarqueurs hépatiques de la lipogénèse et de la synthèse de novo des acides gras (127). Le FAS est principalement impliqué dans le stockage des graisses lorsque des aliments riches en énergie sont consommés. Concernant l'ACC, il existe deux iso-formes : l'ACC1 a été identifiée dans le cytosol et impliquée dans la réaction de contrôle de la vitesse de la lipogénèse de novo, tandis que l'ACC2 est intégrée dans la membrane plasmique des mitochondries et régule l'oxydation des acides gras en produisant du malonyl-CoA (128). L'action inhibitrice du célastrol sur l'expression de l'ARNm de FAS et d'ACC (1 et 2) (Figure 24E–G) chez des souris nourries avec un régime riche en graisses montre que ce terpénoïde diminue la lipogénèse, déclenchée par un régime riche en graisses et, par conséquent, peut entraîner une faible masse grasse chez les souris obèses lors d'une alimentation riche en graisses. De plus, le SREBP1c, un facteur de transcription qui régule la synthèse des lipides dans le foie, a également été régulé à la hausse dans le foie des souris obèses et célastrol a encore diminué l'expression de son

ARNm dans le foie (Figure 24H).



**Figure 24 :** Effet de célastrol sur le poids du foie, de cholestérol et de TG hépatique, et l'expression des ARNm des gènes lipogéniques hépatiques. Le protocole était identique à celui décrit dans la figure 21 et mentionné dans la section Matériels et méthodes. Après 15 semaines d'expérimentation, les animaux ont été sacrifiés, le poids du foie(A), les concentrations de TG hépatiques (B) et de cholestérol (C) ont été déterminés. Les échantillons de foie ont également été utilisés pour l'expression de l'ARNm des gènes métaboliques, à savoir PPAR $\alpha$  (D), FAS (E), ACC1 (F), ACC2 (G) et SREBP1c (H) par RT-qPCR.

## Discussion :

*Tripterygium Wilfordii* (TW), est abondamment présente dans la région de l'Asie de l'Est, de la Chine jusqu'en Corée et au Japon, (16). Cette plante est utilisée en médecine chinoise pour traiter une série de troubles immunologiques, y compris la polyarthrite rhumatoïde (PR), avec des résultats prometteurs dans une série d'essais cliniques (129). TW est une vigne vivace de la famille des Celastracées, également appelée Thunder God Vine ou « lei gong teng » (nom chinois). Le composé bioactif le plus abondant et le plus prometteur dérivé de la racine de cette plante est le célastrol, également appelé triptérine, qui possède un large éventail d'activités biologiques y compris les effets anti-obésité (16). Il a été démontré que le Célastrol exerce son action en augmentant l'IL-1R1 et d'autres médiateurs comme la leptine et l'adiponectine (130). Cependant, on ne sait pas grand-chose sur son récepteur membranaire plasmique et sa cascade de signalisation. Dans la présente étude, nous avons élucidé le mécanisme d'action de ce terpénoïde dans les cellules des bourgeons gustatifs de souris (mTBC) fraîchement isolées.

Nous avons observé que le célastrol déclenchait une augmentation rapide de  $[Ca^{2+}]_i$  dans les mTBC. Nous avons précédemment démontré que les agents appartenant aux terpénoïdes, comme Zizyphin, exercent leur action via TGR5, le récepteur couplé aux protéines G (GPCR) des acides biliaires (120). En effet, le Célastrol partage une homologie structurale avec les acides biliaires. Par conséquent, l'inhibiteur de TGR5 a bloqué les augmentations de  $[Ca^{2+}]_i$  induites par le célastrol dans les mTBC. Étant GPCR, le TGR5 est couplé à l'hydrolyse du phosphatidyl-inositol-bis-phosphate (PIP<sub>2</sub>), catalysée par la phospholipase-C, libérant ainsi l'inositol-tris-phosphate (IP<sub>3</sub>). Il est intéressant de noter qu'un inhibiteur du PLC a considérablement réduit l'action du célastrol sur les augmentations de  $[Ca^{2+}]_i$ , ce qui suggère que le célastrol exerce son action via la voie PLC/IP<sub>3</sub> dans les mTBC. Selon le modèle capacitif de signalisation de  $Ca^{2+}$ , la libération de  $Ca^{2+}$  du pool du réticulum endoplasmique (RE) est suivie d'un afflux de  $Ca^{2+}$  pour remplir le pool ER via l'ouverture de canaux  $Ca^{2+}$  (SOC) exploités en magasin (131). Fait intéressant, les expériences menées en l'absence de  $Ca^{2+}$  extracellulaire ont abouti à une diminution drastique des augmentations de  $[Ca^{2+}]_i$  dans ces cellules, suggérant que ce terpénoïde mobilise le  $Ca^{2+}$  à la fois à partir des pools intracellulaires et extracellulaires. L'implication de l'ouverture des canaux de  $Ca^{2+}$  par le

célastrol est en outre confirmée par les expériences dans lesquelles nous avons utilisé l'ionomycine à la concentration connue pour ouvrir les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrane plasmique (122). Par conséquent, l'ajout de célastrol au pic de réponse de  $\text{Ca}^{2+}$  induit par l'ionomycine a diminué de manière significative l'action du premier. Afin d'approfondir l'implication du pool extracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$ , nous avons utilisé la thapsigargine (TG) qui, en bloquant la ER  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, épuise le remplissage du ER du pool extracellulaire et, par conséquent, induit une augmentation du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (131).

Il est à noter que l'ajout de TG avant ou après le célastrol a réduit, mais pas complètement supprimé, l'action de chacun, démontrant que le célastrol mobilise en effet également le calcium extracellulaire, après la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  des réserves du ER, selon l'effet modèle capacitif d'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  (131). De plus, notre étude démontre également que l'afflux de  $\text{Ca}^{2+}$  est amené par l'ouverture de canaux SOC composés, en partie, de canaux TRPC3, en ces cellules gustatives.

Notre laboratoire (Inserm, Nutox) a clairement démontré qu'il existe un signal gustatif des acides gras alimentaires qui, en se liant au CD36, un capteur de graisse, dans les cellules des bourgeons gustatifs de la langue, transmettent le message du goût gras au cerveau (68). Par conséquent, nous avons montré que le CD36 dans les papilles gustatives est couplé au mécanisme de signalisation de  $\text{Ca}^{2+}$  dépendant du PLC lors de la perception gustative des acides gras alimentaires à longue chaîne (72). Nous souhaitons savoir si le célastrol interférait avec la signalisation de  $\text{Ca}^{2+}$  déclenchée par l'acide linoléique (LA) dans les mTBC. Comme prévu, l'acide linoléique a induit une augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dans ces cellules. Cependant, l'ajout de célastrol après LA a entraîné une diminution de la signalisation de  $\text{Ca}^{2+}$  induite par le célastrol, ce qui suggère que le célastrol partage la libération de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induite par les acides gras.

Pour faire la lumière sur la pertinence physiologique de la « interférence » de signalisation de  $\text{Ca}^{2+}$  entre LA et célastrol, nous avons effectué des tests de préférence sur deux bouteilles. Nous avons observé que les souris présentaient une préférence spontanée pour LA par rapport à la solution témoin. Il est intéressant de noter que la préférence pour la solution LA était significativement accrue lorsque le Célastrol était ajouté à une solution contenant du LA plutôt qu'à une solution contenant uniquement du LA. Cette observation suggère que le Célastrol serait impliqué dans la modulation de la perception gustative des acides gras alimentaires. Cela implique que le Célastrol peut agir comme un exhausteur de goût de graisse, lorsqu'il est ajouté à des aliments gras, il

peut moduler le comportement alimentaire.

Dans ce travail, nous avons montré, pour la première fois, la modulation de la perception du goût par le célastrol et le TGR5 en tant que cible du célastrol dans les cellules des bourgeons gustatifs de souris. Nous proposons, à l'avenir, la synthèse d'analogues puissants du célastrol et l'étude de leurs effets sur la perception du goût des graisses. Ces « modificateurs du goût des graisses » peuvent servir de nouveaux agents pour le traitement de l'obésité et des troubles associés.

L'OMS (2003) rappelle l'importance de la prévention contre cette épidémie de l'obésité. Face à ce constat, une attention particulière a été accordée aux phytoconstituants présents dans les fruits, les légumes et les plantes médicinales, comme les flavonoïdes, et les tri-terpènes, qui peuvent aider la prévention de l'accumulation de graisse corporelle (132). Le potentiel riche de la nature pour lutter contre l'obésité n'a pas été entièrement exploré encore, et beaucoup de nouvelles pistes peuvent être obtenues à partir de sources naturelles.

Le célastrol, est un composé bioactif purifié à partir de plantes médicinales comme le *Tripterygium wilfordii*, est une plante utilisée en médecine chinoise et il a été démontré qu'il exerce des effets anti-obésité (07, 08). Dans la présente étude, nous avons étendu ces observations à d'autres aspects de l'obésité comme la perception orosensorielle d'un acide gras à longue chaîne (LCFA), l'expression des récepteurs de goût du gras, la lipogenèse hépatique et l'inflammation. Le traitement avec le célastrol a réduit le poids corporel chez les souris obèses conformément au rapport de Liu et al. (07) qui ont démontré son effet anti-obésité, en augmentant la sensibilité de l'hypothalamus à la leptine et en améliorant la sensibilité à l'insuline en inhibant la voie NF- $\kappa$ B. Il est également possible qu'en plus de la sensibilité à la leptine. Le célastrol ait diminué le poids corporel en augmentant la dépense énergétique et en améliorant le microbiote intestinal, comme cela a été rapporté dans un modèle de rat (133).

L'obésité nutritionnelle est généralement associée à une consommation alimentaire riche en graisses. Il a été rapporté que l'obésité induite par l'alimentation chez la souris est associée à une faible détection oro-gustative des acides gras à longue chaîne, et ce phénomène pourrait contribuer à un apport élevé en graisses (134). De même, dans plusieurs études sur la population humaine, le polymorphisme génétique CD36, responsable de la fonction atténuée du CD36, a été associé à un apport élevé en graisses chez les obèses (135-136). Par conséquent, un agent capable de restaurer la capacité

orosensorielle réduite à détecter les acides gras alimentaires chez les personnes obèses sera un bon agent thérapeutique. Dans la présente étude, nous avons observé que le HFD diminuait la préférence gustative pour un LCFA alimentaire conformément à plusieurs rapports (134- 137), et le célastrol a régulé positivement ce phénomène. Bien que nous n'ayons pas analysé l'expression des capteurs lipidiques (CD36 et GPR120) au niveau protéique par Western blot, nos analyses RT-qPCR suggèrent, une diminution de l'expression des ARNm de CD36 dans les mTBC chez les souris obèses et l'administration de célastrol a régulé positivement l'expression de CD36. Concernant le mécanisme d'action du célastrol sur les capteurs gustatifs des graisses, nous pouvons affirmer que ce terpénoïde pourrait avoir diminué l'inflammation des papilles gustatives chez les souris obèses. En effet, il a été rapporté que l'inflammation, induite soit par un régime riche en graisses, soit par un traitement au sulfate de dextrane sodique (DSS), diminuait les fonctions des papilles gustatives chez la souris (138-139).

Il convient également de noter qu'il y avait une tendance « opposée » entre l'expression des ARNm de CD36 et celle de GPR120. Par conséquent, nous affirmons que le CD36 est impliqué dans la « détection », tandis que le GPR120 est responsable de la « régulation post-orale » du comportement alimentaire, comme nous l'avons précédemment suggéré (134). Ce type d'expression opposée de CD36 et GPR120 a déjà été démontré chez les rongeurs (134). La régulation positive de CD36 par le célastrol pourrait être responsable de la restauration de la capacité orosensorielle à détecter un LCFA chez la souris, comme indiqué précédemment, selon lequel la diminution de la perception du goût des graisses chez les souris obèses peut être restaurée par des composés chimiques qui diminuent l'obésité et l'inflammation (140). Nous ne pensons pas que le célastrol puisse agir directement sur l'activation des récepteurs du goût des graisses. De plus, une diminution de l'expression des ARNm de la gustducine a été associée à un état inflammatoire important (141).

Nous avons été tentés d'évaluer si l'obésité induite par l'alimentation (HFD) dans notre modèle était associée à une inflammation des papilles gustatives. En effet, l'obésité induite par HFD dans notre étude est associée à une régulation positive des ARNm des cytokines inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$ ), ce qui pourrait affecter le renouvellement des papilles gustatives et entraîner également de faibles fonctions de détection du goût, comme le suggère Wang. et all. (142). En outre, notre équipe a étudié l'inflammation dans les cellules des papilles gustatives et a démontré que l'obésité

induite par l'alimentation ou l'inflammation déclenchée par le LPS augmentait l'expression du TNF- $\alpha$ , de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-6, à la fois au niveau des ARNm et des protéines, dans les cellules de bourgeons de gout (143). Cohen et al. (144) ont démontré que le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 peuvent réduire le taux de renouvellement des papilles gustatives, influencer la prolifération et la viabilité des cellules de type II et donc altérer la perception gustative. Nous rappelons que les récepteurs du goût des graisses (CD36 et GPR120) sont exprimés par les TBC de type II chez la souris (134). Le TNF- $\alpha$  dans le TBC est produit via la voie du récepteur Toll-like (TLR) par les cellules de type II, mais pas par les cellules de type I et de type III (145).

En ce qui concerne l'inflammation systémique, nous avons déterminé les concentrations circulantes d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  dans le sang. L'obésité alimentaire et génétique favorise l'inflammation en augmentant les concentrations de ces cytokines pro-inflammatoires (146). Il a été démontré que le tissu adipeux, outre les adipokines sécrétantes (adiponectine et leptine), sécrète également des cytokines pro-inflammatoires, principalement le TNF- $\alpha$  et l'IL-6. Concernant le TNF- $\alpha$ , on peut noter les observations suivantes : 1) le TNF- $\alpha$  est exprimé de manière constitutive par le tissu adipeux ; 2) génétiquement souris et rats obèses (ob/ob) (fa/fa Zucker) expriment abondamment cette cytokine dans leur tissu adipeux (147), et 3) le TNF- $\alpha$  médié la résistance à l'insuline chez ces animaux. Le tissu adipeux de sujets obèses contient significativement plus de TNF- $\alpha$  que les sujets maigres (148, 149). L'administration de la protéine réceptrice du TNF- $\alpha$  qui se lie au TNF- $\alpha$  endogène normalise la sensibilité à l'insuline (150). Il est à noter qu'entre 10 et 30 % de l'IL-6 en circulation provient de tissus adipeux. Il existe une corrélation positive entre les taux d'IL-6 circulants, l'adiposité (151) et la résistance à l'insuline (152). L'action de célastrol sur la diminution des taux circulants d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  démontre sa propriété anti-inflammatoire qui peut être à nouveau bénéfique chez les personnes obèses. Nos observations corroborent les conclusions de Wang et al. (153) qui ont démontré l'action anti-inflammatoire de ce terpénoïde lors de la fibrose hépatique chez la souris.

L'obésité induite par le régime alimentaire a entraîné une augmentation du poids du foie et des niveaux de triglycérides et de cholestérol et le célastrol a exercé des effets bénéfiques sur ces paramètres, indiquant que ce terpénoïde pourrait moduler le métabolisme des lipides hépatiques. De plus, nous avons étudié le profil d'expression de l'ARNm des gènes lipogéniques (FAS, ACC1 et ACC2) et liés à la dépense énergétique

(PPAR $\alpha$ , SREBP1c) dans le foie. FAS, ACC1 et ACC2 sont des enzymes lipogéniques (145, 146), et SREBP1c est un facteur de transcription induit par une concentration élevée de glucose dans le foie (146). Nous avons observé que leur expression était régulée positivement dans le foie de souris obèses induites par le régime alimentaire, conformément à plusieurs découvertes qui ont rapporté une augmentation de l'expression hépatique de l'ARNm de SREBP1c, FAS et SCD1 dans l'obésité (154, 155). Il est intéressant de noter que le traitement avec le célastrol a régulé négativement l'expression de ces gènes lipogéniques chez ces souris. Il semble qu'il existe une association entre l'expression de PPAR- $\alpha$  et de SREBP1c dans notre étude. En effet, l'ARNm de SREBP1c a été trouvé sous-régulé chez les souris PPAR $\alpha$ -null (156). Nos observations suggèrent que le célastrol pourrait réduire l'accumulation de lipides hépatiques via la voie de transcription médiée par SREBP1c au cours de l'obésité. Nos résultats corroborent plusieurs études montrant que le célastrol module le métabolisme lipidique, par exemple en supprimant le stress du RE, la lipogenèse et en favorisant la lipolyse hépatique (157). De plus, il a été démontré que le célastrol supprime efficacement les taux élevés de TC, TG et LDL-c induits par un régime hyper lipidique en améliorant l'expression du transporteur de cassette de liaison à l'ATP A1 (ABCA1) (158-159). Dans la présente étude, nous n'avons pas étudié l'impact du célastrol sur le métabolisme des glucides ; cependant, il a été rapporté que ce terpénoïde atténuait considérablement l'obésité induite par le régime alimentaire (HFD) via une meilleure utilisation du glucose (160). En effet, il a été démontré que le célastrol améliorait la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose chez les animaux obèses. Le célastrol a notamment augmenté les fonctions oxydatives mitochondriales en augmentant l'activité du complexe pyruvate déshydrogénase (PDC) et en diminuant la pyruvate déshydrogénase kinase 4 (PDK4) chez les souris obèses (160).

## **Conclusion :**

De nombreuses études démontrant les propriétés thérapeutiques d'extraits des plantes utilisés en médecine traditionnelle ont été développées. En effet, l'utilisation de tels extraits comme médecine complémentaire a récemment augmenté. Il a été indiqué que le célastrol, un terpénoïde purifié à partir d'une plante chinoise, largement répandu dans la racine de plante de *Tripterygium Wilfordii*, présent de nombreuses propriétés biologiques au potentiel thérapeutique.

Dans ce travail, nous avons montré, pour la première fois que le célastrol module la perception de gout du gras, via le récepteur TGR5 dans les papilles gustatives des souris.

Nous avons observé les effets anti-obésité, modulateur du goût du gras et anti-inflammatoire du célastrol chez des souris obèses. Le célastrol a également normalisé le poids du foie ainsi que les taux de cholestérol et de triglycérides hépatiques.

## **Perspectives :**

La thèse actuelle présente plusieurs perspectives d'avenir qui restent sans réponse. Certains d'entre eux sont comme ci-dessous :

- Notre étude présente certaines limites, car nous n'avons pas étudié l'expression des cytokines pro-inflammatoires et d'autres facteurs au niveau protéique par Western blot dans les cellules du foie et des papilles gustatives. À l'avenir, sur la base des propriétés structurales de ce terpénoïde, il pourrait être envisagé de synthétiser des analogues pharmacologiques plus stables, susceptibles d'être des agents anti-obésité plus puissants que la molécule principale.
- Les effets in vivo de célastrol ont besoin encore de nombreuses recherches et doivent être bien établis pour faire mieux connaître les autres avantages possibles de ce produit naturel telles que la toxicité.
- Nous réaliserons de telles expériences où nous évaluerons les effets de célastrol sur la prise alimentaire chez les sujets obèses.

## Références bibliographiques :

1. Organisation mondiale de la santé, (2015). Obésité et surpoids, Aide-mémoire, n° 311, janvier 2015.
2. Organisation mondiale de la santé, (2020). Obesity and over weight. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/obesity-andoverweighte>, (20 aout2020).
3. Drewnowski A, Brunzell JD, Sande K, Iverius PH, Greenwood MR, (1985). Sweet tooth reconsidered: taste responsiveness in human obesity. *Physiol. Behav.* 35: 617-622.
4. Takeda M, Imaizumi M, Fushiki T, (2000). Preference for vegetable oils in the two-bottle choice test in mice. *Life Sci.* 67: 197-204.
5. Berrichi M, Benammar C, Murtaza B, Hichami A, Belarbi M, Khan NA, (2019). Zizyphus lotus L. fruit attenuates obesity-associated alterations: in vivo mechanisms. *Arch Physiol Biochem.* 2021 Apr; 127(2):119-126. doi: 10.1080/13813455.2019.1621349. Epub 2019 Jun 1. PMID: 31155964.
6. Wu S, Sun C, Wang K, Pan Y, (2004). Preparative isolation and purification of celastrol from *Celastrus orbiculatus* Thunb. by a new counter-current chromatography method with an upright coil planet centrifuge, *J. Chromatogr. A* 1028:171-174, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.11.072>
7. Liu J, Lee J, Salazar Hernandez MA, Mazitschek R, Ozcan U. Treatment of obesity with celastrol. *Cell.* 2015 May 21; 161(5):999-1011. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.011. PMID: 26000480; PMCID: PMC4768733.
8. Lan GC, Zhang J, Ye WB, Yang F, Li A, He WW, Zhang W, (2019). Celastrol as a tool for the study of the biological events of metabolic diseases, *Sci. China Chem.* 62:409-416, <https://doi.org/10.1007/s11426-018-9404-9>.
9. Organisation mondiale de la santé, (2024). Principaux repères su l'Obésité et le surpoids, <https://www.who.int>.
10. Oppert J (2004). Activité physique, sédentarité et gain de poids. *Sciences des aliments* 24:115-120.
11. Drewnowski A, Brunzell JD, Sande K, Iverius PH, Greenwood MR, (1985). Sweet tooth reconsidered: taste responsiveness in human obesity. *Physiol. Behav.* 35: 617-622.
12. OMS, (2020). <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/obesity-andoverweighte>. 20/08/2020.
13. Michaël CHEVROT, (2013). Impact de l'obésité sur la détection orosensorielle des

lipides alimentaires chez la souris et chez l'Homme ; P : 4-18.  
<http://www.theses.fr/2013DIJOS019/document>.

14. Pichon B, Thureau S, Delpon G, Barillot I, et Mahé M. A, (2013). Obésité et irradiation: difficultés techniques, toxicité et efficacité. *Cancer/Radiothérapie*, 17(5-6), 543–548.
15. Ikram Aboura, (2018). Effet anti-inflammatoire et anti obésité des extraits polyphénoliques de feuilles de caroube "Ceratonia siliqua" et cladode de figuier de barbarie "Opuntia ficus-indica" ; P : 10-17. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01912093>.
16. Alberti K, Eckel R.H, Grundy S.M, Zimmet P.Z, Cleeman J.I, Donato K.A, Smith S.C, (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; national heart, lung, and blood institute; American heart association; world heart federation; international atherosclerosis society; and international association for the study of obesity. *Circulation*, 120(16), 1640–1645.
17. Inserm; institut national de la santé et de la recherche médicale, (2019). <https://www.inserm.fr/dossier/obesite/>.
18. Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1796–808.
19. Atek M, Traissac P, El Ati J, Laid Y, Aounallah-Skhiri H, Eymard-Duvernay S, Mézimèche N, Bougatef S, Béji C, Boutekdjiret L, Martin-Prével Y, Lebcir H, Gartner A, Kolsteren P, Delpuech F, Ben Romdhane H, Maire B, (2010). Obesity and association with area of residence, gender and socio-economic factors in Algerian and Tunisian adults. *PLoS One*. 2013 Oct 8;8 (10):e75640. doi: 10.1371/journal.pone.0075640. PMID: 24116063; PMCID: PMC3792975. TAHINA 2010.
20. ObEpi (2012). Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité (INSERM / KANTAR HEALTH / ROCHE).
21. OCDE et UE, Health at a glance Europe 2010.
22. Faucher, P., & Poitou, C. (2016). Physiopathologie de l'obésité. *Revue Du Rhumatisme Monographies*, 83(1), 6–12.
23. MM. Bonnamy, Kurtz, (2014). Le guide de l'obésité, P : 26-28. <http://obesite.comprendrechoisir.com/ebibliotheque/liste>.
24. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.

25. Phillips, M S, Q Liu, H A Hammond, V Dugan, P J Hey, C J Caskey, and J F Hess. 1996. "Leptin Receptor Missense Mutation in the Fatty Zucker Rat." *Nature Genetics* 13 (1) (May): 18–19. Doi:10.1038/ng0596-18.
26. Meyre, David, Jérôme Delplanque, Jean-Claude Chèvre, Cécile Lecoeur, Stéphane Lobbens, Sophie Gallina, Emmanuelle Durand, et al, (2009). "Genome-wide Association Study for Early-onset and Morbid Adult Obesity Identifies Three New Risk Loci in European Populations." *Nature Genetics* 41 (2) (February): 157–159. doi:10.1038/ng.301.
27. Dubern, Beatrice, Cecile Lubrano-Berthelier, Monica Mencarelli, Baran Ersoy, Marie-Laure Frelut, Dominique Bouglé, Bruno Costes, et al, (2008). "Mutational Analysis of the Pro-opiomelanocortin Gene in French Obese Children Led to the Identification of a Novel Deleterious Heterozygous Mutation Located in the Alpha-melanocyte Stimulating Hormone Domain." *Pediatric Research* 63 (2) (February): 211–216. doi:10.1203/PDR.0b013e31815ed62b.
28. Frayling, T. M., N. J. Timpson, M. N. Weedon, E. Zeggini, R. M. Freathy, C. M. Lindgren, J. R. B. Perry, et al. 2007. "A Common Variant in the FTO Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity." *Science* 316 (5826) (May 11): 889–894. doi:10.1126/science.1141634.
29. Junien, Claudine, Catherine Gallou-Kabani, Alexandre Vigé, and Marie-Sylvie Gross. 2005. "[Nutritional Epigenomics of Metabolic Syndrome]." *Médecine Sciences: M/S* 21 Spec No (December): 44–52.
30. Waterland, Robert A, and Randy L Jirtle. 2004. "Early Nutrition, Epigenetic Changes at Transposons and Imprinted Genes, and Enhanced Susceptibility to Adult Chronic Diseases." *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 20 (1) (January): 63–68.
31. Xiao, J., & Yang, W. (2012). Weight Loss Is Still an Essential Intervention in Obesity and its Complications: A Review. *Journal of Obesity*, 369097.
32. NCEP ATP, (2001).
33. Matsuo R, (2000). Role de la salive dans le maintien de la sensibilité gustative ; *Revue critique en biologie et médecine oral*. 2000 ;11(2) :216-229.
34. Rozengurt, E., & Sternini, C. (2007). Taste receptor signaling in the mammalian gut. *Current Opinion in Pharmacology*, 7(6), 557-562.
35. Suzuki, T. (2007). Cellular mechanisms in taste buds. *The Bulletin of Tokyo Dental College*, 48(4), 151-161.
36. Wakisaka, S. (2005). Lectin histochemistry of taste buds in the circumvallate papilla of the rat. *Chemical Senses*, 30 SUPPL.(1), 46–47.

37. Takeda, M., Sawano, S., Imaizumi, M., & Fushiki, T. (2001). Preference for corn oil in olfactory-blocked mice in the conditioned place preference test and the two-bottle choice test. *Life Sciences*, 69(7), 847–854.
38. Bartel, D. L., Sullivan, S. L., Lavoie, É. G., Sévigny, J., & Finger, T. E. (2006). Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is the ecto-ATPase of type I cells in taste buds. *Journal of Comparative Neurology*, 497(1), 1-12.
39. Dvoryanchilov, G., Sinclair, M. S., Perea-Martinez, I., Wang, T., & Chaudhari, N. (2009). Inward rectifier channel, ROMK, is localized to the apical tips of glial-like cells in mouse taste buds. *Journal of Comparative Neurology*, 517(1), 1–14.
40. Vandenbeuch, A., Clapp, T. R., & Kinnamon, S. C. (2008). Amiloride-sensitive channels in type I fungiform taste cells in mouse. *BMC Neuroscience*, 9(1), 1-13.
41. Chaudhari, N., & Roper, S. D. (2010). The cell biology of taste. *Journal of Cell Biology*, 190(3), 285–296.
42. Dvoryanchilov, G., Sinclair, M. S., Perea-Martinez, I., Wang, T., & Chaudhari, N. (2009). Inward rectifier channel, ROMK, is localized to the apical tips of glial-like cells in mouse taste buds. *Journal of Comparative Neurology*, 517(1), 1–14.
43. Clapp, T. R., Yang, R., Stoick, C. L., Kinnamon, S. C., & Kinnamon, J. C. (2004). Morphologic Characterization of Rat Taste Receptor Cells That Express Components of the Phospholipase C Signaling Pathway. *Journal of Comparative Neurology*, 468(3), 311–321.
44. Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2001). Mammalian sweet taste receptors. *Cell*, 106(3), 381-390.
45. Romanov, R. A., Rogachevskaja, O. A., Khokhlov, A. A., & Kolesnikov, S. S. (2008). Voltage dependence of ATP secretion in mammalian taste cells. *Journal of General Physiology*, 132(6), 731–744.
46. Yang, R., Crowley, H. H., Rock, M. E., & Kinnamon, J. C. (2000). Taste cells with synapses in rat circumvallate papillae display SNAP-25-like immunoreactivity. *Journal of Comparative Neurology*, 424(2), 205–215.
47. Miyoshi, M. A., Abe, K., & Emori, Y. (2001). IP3 receptor type 3 and PLC $\beta$ 2 are coexpressed with taste receptors T1R and T2R in rat taste bud cells. *Chemical senses*, 26(3), 259-65.
48. Hamid u, (2022) . Role of leptin in the modulation of gustatory preference for fat in mice.
49. Huang, Y. A., Maruyama, Y., Stimac, R., & Roper, S. D. (2008). Presynaptic (Type III) cells in mouse taste buds sense sour (acid) taste. *Journal of Physiology*, 586(12), 2903–2912.

50. Nelson, G. M., & Finger, T. E. (1993). Immunolocalization of different forms of neural cell adhesion molecule (NCAM) in rat taste buds. *Journal of Comparative Neurology*, 336(4), 507–516.
51. Chandrashekar, J., Kuhn, C., Oka, Y., Yarmolinsky, D. A., Hummler, E., Ryba, N. J. P., & Zuker, C. S. (2010). The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature*, 464(7286), 297–301.
52. Murray, R. G. (1986). The mammalian taste bud type III cell: A critical analysis. *Journal of Ultrastructure Research and Molecular Structure Research*, 95 (1-3), 175–188.
53. Kim, D. -J., & Roper, S. D. (1995). Localization of serotonin in taste buds: A comparative study in four vertebrates. *Journal of Comparative Neurology*, 353(3), 364–370.
54. Yang, R., Crowley, H. H., Rock, M. E., & Kinnamon, J. C. (2000). Taste cells with synapses in rat circumvallate papillae display SNAP-25-like immunoreactivity. *Journal of Comparative Neurology*, 424(2), 205–215.
55. Ston SL , Kwong LW, Yee KM , Pelletier J, Lepiniec L, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ, (2001). Leafy cotyledon2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development; *Proc Natl Acad Sci USA*; 25; 98(20):11806-11.
56. Avau, B., & Depoortere, I. (2016). The bitter truth about bitter taste receptors: Beyond sensing bitter in the oral cavity. *Acta Physiologica*, 216(4), 407–420.
57. Liman, E. R. (2007). TRPM5 and taste transduction. *Transient receptor potential (TRP) channels*, Springer, 287-298.
58. Strazullo P, D'Elia L, Kandala NB, Cappuccio FP, (2009). Salt intake, stroke and cardiovascular diseases: meta-analysis of prospective studies, *BMJ*; 24;339:b4567.
59. Canessa, C. M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J., & Rossier, B. C. (1994). three homologous subunits Yl. *Nature*, 367(6462), 463–467.
60. Brondel, L., Jacquin, A., Meillon, S., & Pénicaud, L. (2013). Taste: Physiology, roles and dysfunction. *Nutrition Clinique et Metabolisme*, 27(3), 123–133.
61. Montmayeur, J. P., Liberles, S. D., Matsunami, H., & Buck, L. B. (2001). A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus. *Nature Neuroscience*, 4(5), 492–498.
62. Ugawa, S., Minami, Y., Guo, W., Saishin, Y., Takatsuji, K., Yamamoto, T., .& Shimada, S. (1998). Receptor that leaves a sour taste in the mouth. *Nature*, 395(6702), 555-556.
63. Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Cook, B., Wu, D., & Ryba, N. J. (2003). Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell*, 112(3), 293-301.
64. Gutiérrez- Rosale F, Rios JJ, Gomez-Rey ML, (2003). Main polyphenol in the bitter taste of virgin olive oil. Structural confirmation by on-line high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry; *J Agric Food Chem*; 24; 51(20):6021-5.

65. Behrens, M., & Meyerhof, W. (2011). Gustatory and extragustatory functions of mammalian taste receptors. *Physiology and Behavior*, 105(1), 4–13.
66. Meyerhof, W., Batram, C., Kuhn, C., Brockhoff, A., Chudoba, E., Bufe, B., Appendino, G., & Behrens, M. (2009). The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chemical Senses*, 35(2), 157–170.
67. C. Martin, M. Chevrot, P. Passilly-Degrace, P. Besnard, (2020). Détection orosensorielle des lipides alimentaires : Impacts sur le comportement alimentaire et la santé ; hal-02654363.
68. Besnard, P., Passilly-Degrace, P., & Khan, N. A. (2016). Taste of Fat: A Sixth Taste Modality? *Physiological Reviews*, 96(1), 151–176.
69. Stewart, J. E., Feinle-Bisset, C., Golding, M., Delahunty, C., Clifton, P. M., & Keast, R. S. J. (2010). Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 104(1), 145–152.
70. Deborah A, (2015). Détection orosensorielle des lipides alimentaires chez la souris : mécanismes impliqués et altérations au cours de l'obésité ; HAL Id:tel-01459102.
71. Djezirri F Z, (2019). Perception orosensorielle de l'acide oléanolique : Ses effets anti-obésité et anti-inflammatoire chez la souris ;
72. El-Yassimi, A., Hichami, A., Besnard, P., & Khan, N. A. (2008). Linoleic acid induces calcium signaling, Src kinase phosphorylation, and neurotransmitter release in mouse CD36-positive gustatory cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(19), 12949–12959.
73. Liu, D., Archer, N., Duesing, K., Hannan, G., & Keast, R. (2016). Mechanism of fat taste perception: Association with diet and obesity. *Progress in Lipid Research*, 63, 41–49.
74. Dramane, G., Abdoul-Azize, S., Hichami, A., Vögtle, T., Akpona, S., Chouabe, C., Sadou, H., Nieswandt, B., Besnard, P., & Khan, N. A. (2012). STIM1 regulates calcium signaling in taste bud cells and preference for fat in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 122(6), 2267–2282.
75. Martin Céline, Chevrot Michael, Poirier Hélène, Passilly Degrace Patricia, Niot Isabelle, et Besnard Philippe. 2011. « CD36 as a lipid sensor ». *Physiology & Behavior* 105: 361-42.
76. Breslin, P. A. S. (2013). An Evolutionary Perspective on Food Review and Human Taste. *Curr Biol*, 23(9), R409–R418.
77. Adler, E., Hoon, M. A., Mueller, K. L., Chandrashekar, J., Ryba, N. J. P., & Zuker, C. S. (2000). A Novel Family of Mammalian Taste Receptors. *Cell*, 100, 693–702.
78. Murata, Y., Yasuo, T., Yoshida, R., Obata, K., Yanagawa, Y., Margolskee, R. F., & Ninomiya, Y. (2010). Action potential-enhanced ATP release from taste cells through hemichannels. *Journal of Neurophysiology*, 104(2), 896–901.

79. Tomchik, S. M., Berg, S., Kim, J. W., Chaudhari, N., & Roper, S. D. (2007). Breadth of Tuning and Taste Coding in Mammalian Taste Buds. *Journal Neuroscience*, 27(40), 10840–10848.
80. Chang, R. B., Waters, H., & Liman, E. R. (2010). A proton current drives action potentials in genetically identified sour taste cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(51), 22320–5.
81. Topolovec, J. C., Gati, J. S., Menon, R. S., Shoemaker, J. K., & Cechetto, D. F. (2004). Human cardiovascular and gustatory brainstem sites observed by functional magnetic resonance imaging. *The Journal of Comparative Neurology*, 471(4), 446–461.
82. Peng, Y., Gillis-Smith, S., Jin, H., Tränkner, D., Ryba, N. J. P., & Zuker, C. S. (2015). Sweet and bitter taste in the brain of awake behaving animals. *Nature*, 527(7579), 512–5.
83. Chale-Rush, A., Burgess, J. R., & Mattes, R. D. (2007). Evidence for Human Orosensory (Taste?) Sensitivity to Free Fatty Acids. *Chemical Senses*, 32(5), 423–431.
84. Hiraoka, T., Fukuwatari, T., Imaizumi, M., & Fushiki, T. (2003). Effects of oral stimulation with fats on the cephalic phase of pancreatic enzyme secretion in esophagostomized rats. *Physiology & Behavior*, 79(4–5), 713–717.
85. Kawai, T., & Fushiki, T. (2003). Importance of lipolysis in oral cavity for orosensory detection of fat. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 285(2), R447-54.
86. Kulkarni, B. V., & Mattes, R. D. (2014). Lingual lipase activity in the orosensory detection of fat by humans. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 306(12), R879–R885.
87. Emilly R, Liman, Yali V,Zhang, Craig M, (2014). Peripheral coding of taste; *Science direct*; MARCH 2014: 81(5).
88. Greenwalt, D. E., Lipsky, R. H., Ockenhouse, C. F., Ikeda, H., Tandon, N. N., & Jamieson, G. A. (1992). Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood*, 80(5), 1105–15.
89. Febbraio, M., Hajjar, D. P., & Silverstein, R. L. (2001). CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *The Journal of Clinical Investigation*, 108(6), 785–91.
90. Simons, P. J., Kummer, J. A., Luiken, J. J. F. P., & Boon, L. (2011). Apical CD36 immunolocalization in human and porcine taste buds from circumvallate and foliate papillae. *Acta Histochemica*, 113(8), 839–843.
91. Abumrad, N. a. (2005). CD36 may determine our desire for dietary fats. *Journal of Clinical Investigation*, 115(11), 2965–2967.

92. Kotarsky, K., Nilsson, N. E., Flodgren, E., Owman, C., & Olde, B. (2003). A human cell surface receptor activated by free fatty acids and thiazolidinedione drugs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301(2), 406–410.
93. Cartoni, C., Yasumatsu, K., Ohkuri, T., Shigemura, N., Yoshida, R., Godinot, N., ... Damak, S. (2010). Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(25), 8376–82.
94. Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., Fujino, M. (2003). Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic  $\beta$  cells through GPR40. *Nature*, 422(6928), 173–176.
95. Gilbertson, T. A., Yu, T., & Shah, B. P. (2010). Gustatory Mechanisms for Fat Detection. *Fat Detection: Taste, Texture, and Post Ingestive Effects*.
96. Montell, C. (1997). New light on TRP and TRPL. *Molecular Pharmacology*, 52(5), 755–763.
97. June, C. H., Fletcher, M. C., Ledbetter, J. A., Schieven, G. L., Siegel, J. N., Phillips, A. F., & Samelson, L.E. (1990). Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents T-cell receptormediated signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(19), 7722-7726.
98. Nishizuka Y, (1986). Studies and perspectives of protein kinase C; *Science*. 1996; 18;233(4761):305-12.
99. Berridge, M. J. (1984). Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *The Biochemical Journal*, 220(2), 345–60.
100. Abdoul-Azize, S., Selvakumar, S., Sadou, H., Besnard, P., & Khan, N. A. (2014).  $Ca^{2+}$  signaling in taste bud cells and spontaneous preference for fat: unresolved roles of CD36 and GPR120. *Biochimie*, 96(1), 8-13.
101. Gilbertson, T. A., & Khan, N. A. (2014). Cell signaling mechanisms of oro-gustatory detection of dietary fat: Advances and challenges. *Progress in Lipid Research*, 53, 82–92.
102. Smith, N. J., Hudson, B., & Chang, V. (2012). MINI REVIEW ARTICLE Low affinity GPCRs for metabolic intermediates: challenges for pharmacologists.
103. Liu, D., & Liman, E. R. (2003). Intracellular  $Ca^{2+}$  and the phospholipid PIP2 regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), 15160–15165.
104. Besnard, P., Passilly-Degrace, P., & Khan, N. A. (2015). Taste of fat: A sixth taste modality? *Physiological Reviews*, 96(1), 151–176.
105. R. Anton. A. Lobstein. *Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles*, (2005). Tec & Doc, Paris, 522.

106. Wu S, Sun C, Wang K, Pan Y, (2004). Preparative isolation and purification of celastrol from *Celastrus orbiculatus* Thunb. by a new counter-current chromatography method with an upright coil planet centrifuge, *J. Chromatogr. A* 1028:171-174, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.11.072>
107. Zhang Y, Mao X, Li W, Chen W, Wang X, Ma Z, Lin N, (2020). *Tripterygium wilfordii*: An inspiring resource for rheumatoid arthritis treatment, *Med. Res. Rev.* 14: 1337-1374. <https://doi.org/10.1002/med.21762>.
108. Dharambir K, Ajay S, Singh TH, Katrin S, Tapan M, Anupam P, (2018). Molecular targets of celastrol in cancer: Recent trends and advancements, *Crit. Rev. Oncol./ hematol.* 128:70-81, <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.05.019>
109. Traditional Chinese medicines containing lei gong teng (*Tripterygium wilfordii*) Drug Safety Update". [www.gov.uk](http://www.gov.uk). 8 August 2011. Retrieved 10 June 2016.
110. Xu H, Zhang Y, Liu Z, Chen T, Lv C, Tang S H, (2019). ETCM: an encyclopaedia of traditional chinese medicine. *Nucleic acids Res.* 47( D1), D976-d82. Doi: 10.1093/nar/gky978.
111. Jie G, Yifeng Z, Xihon L, Xiayi W, Luqi H, Wei G, (2021). Triptolide: pharmacological spectrum, biosynthesis, chemical synthesis and derivatives; *Theranostics* 11 (15): 7199-7221. Doi: 10.7150/thno.57745.
112. Liu J, Lee J, Salazar Hernandez MA, Mazitschek R, Ozcan U. Treatment of obesity with celastrol. *Cell.* 2015 May 21; 161(5):999-1011. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.011. PMID: 26000480; PMCID: PMC4768733.
113. Dramane G., Abdoul-Azize S., Hichami A. et al. Stim1 regulates calcium signaling in taste bud cells and preference for fat in mice. *J. Clin. Invest.* (2012) 122 2267–2282.
114. Yu Sh, Jianan Z, Kai W, Ping J, Lingxia X, Cen Ch , Linshuai X, Yiming Sh, Yixin Z, Yanqin B, Mi Z, Steven J S, Shicheng G, et Dongyi H. (2023). A comprehensive review of *Tripterygium Wilfordii* hook, F, in the treatment of rheumatic and autoimmune diseases: bioactive compounds, mechanisms of action, and future directions; *Front; pharmacol.* 14: 1282610. Doi: 10.3389/fphar.2023.1282610.
115. Rodríguez-Sureda, V.; Peinado-Onsurbe, J. A procedure for measuring triacylglyceride and cholesterol content using a small amount of tissue. *Anal. Biochem.* 2005, 343, 277–282. [CrossRef] [PubMed]
116. Murtaza, B.; Berrichi, M.; Bennamar, C.; Tordjmann, T.; Djeziri, F.Z.; Hichami, A.; Leemput, J.; Belarbi, M.; Ozdener, H.; Khan, N.A. Zizyphin modulates calcium signalling in human taste bud cells and fat taste perception in the mouse. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2017, 31, 486–494. [CrossRef].

117. I. Karmous, J. Plesník, A.S. Khan, O. Šerý, A. Abid, A. Mankai, A. Aouidet, N.A. Khan, Orosensory detection of bitter in fat-taster healthy and obese participants: Genetic polymorphism of CD36 and TAS2R38, *Clin. Nutr.* 37 (2018) 313-320.
118. A. Perino, H. Demagny, L. Velazquez-Villegas, et al., Molecular physiology of bile acid signaling in health, disease, and aging, *Physiol. Rev.* 101 (2021) 683–731.
119. A. Bensalem, B. Murtaza, A. Hichami, A.S. Khan, H. Oulamara, G. Merlen, M. Berrichi, A.N. Agli, T. Tordjmann, N.A. Khan, Bile acid receptor TGR5 is critically involved in preference for dietary lipids and obesity, *J. Nutr. Biochem.* 76 (2020) 108298.
120. B. Murtaza, M. Berrichi, C. Bennamar, T. Tordjmann, F.Z. Djeziri, A. Hichami, J. Leemput, M. Belarbi, H. Ozdener, N.A. Khan, Zizyphin modulates calcium signalling in human taste bud cells and fat taste perception in the mouse, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 31 (2017) 486-494.
121. M.N. Uddin, D.W. Thomas, SERCA Modulators Reveal Distinct Signaling and Functional Roles of T Lymphocyte Ca<sup>2+</sup> Stores, *Int. J. Mol. Sci.* 25(22) (2024) 12095.
122. H. Yoshida, C. Hirono, C. Shimamoto, E. Daikoku, T. Kubota, M. Sugita, Y. Shiba, T. Nakahari, Membrane potential modulation of ionomycin-stimulated Ca<sup>(2+)</sup> entry via Ca<sup>(2+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchange and SOC in rat submandibular acinar cells, *J. Physiol. Sci.* 60(5) (2010) 363-71.
123. B. Murtaza, A. Hichami, A.S. Khan, J. Plesnik, O. Sery, A. Dietrich, L. Birnbaumer, N.A. Khan, Implication of TRPC3 channel in gustatory perception of dietary lipids, *Acta. Physiol.* 231(2) (2021) e13554.
124. Jensen-Urstad, A.P.; Semenkovich, C.F. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: Housekeeper or messenger? *Biochim. Biophys. Acta* 2012, 1821, 747–753. [CrossRef].
125. Mansouri, R.M.; Baugé, E.; Staels, B.; Gervois, P. Systemic and distal repercussions of liver-specific peroxisome proliferator activated receptor-alpha control of the acute-phase response. *Endocrinology* 2008, 149, 3215–3223. [CrossRef].
126. Kim, M.J.; Kim, D.H.; Bang, E.; Noh, S.G.; Chun, P.; Yokozawa, T.; Moon, H.R.; Chung, H.Y. PPAR $\alpha$  Agonist, MHY3200, Alleviates Renal Inflammation during Aging via Regulating ROS/Akt/FoxO1 Signaling. *Molecules* 2021, 26, 3197.
127. Jensen-Urstad, A.P.; Semenkovich, C.F. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: Housekeeper or messenger? *Biochim. Biophys. Acta* 2012, 1821, 747–753.
128. Goedeke, L.; Bates, J.; Vatner, D.F.; Perry, R.J.; Wang, T.; Ramirez, R.; Li, L.; Ellis, M.W.; Zhang, D.; Wong, K.E.; et al. Acetyl-CoA Carboxylase Inhibition Reverses NAFLD and Hepatic Insulin Resistance but Promotes Hypertriglyceridemia in Rodents. *Hepatology* 2018, 68, 2197–2211.

129. 1. Y. Zhang, X. Mao, W. Li, W. Chen, X. Wang, Z. Ma, N. Lin, *Tripterygium wilfordii*: An inspiring resource for rheumatoid arthritis treatment, *Med. Res. Rev.* 41 (2021) 1337-1374.
130. Y. Zhao, K. Miettinen, S.C. Kampranis, Celastrol: A century-long journey from the isolation to the biotechnological production and the development of an antiobesity drug, *Curr. Opin. Plant. Biol.* 81 (2024) 102615.
131. M.H. Ozdener, S. Subramaniam, S. Sundaresan, O. Sery, T. Hashimoto, Y. Asakawa, P. Besnard, N.A. Abumrad, N.A. Khan, CD36- and GPR120-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in human taste bud cells mediates differential responses to fatty acids and is altered in obese mice, *Gastroenterology.* 146 (2014) 995-1005.
132. Djeziri, FZ.; Belarbi, M.; Murtaza, B.; Hichami, A.; Benammar, C.; Khan, NA. Oleanolic acid improves diet-induced obesity by modulating fat preference and inflammation in mice. *Biochimie.* 2018, 152, 110-120.
133. Hu, W.; Wang, L.; Du, G.; Guan, Q.; Dong, T.; Song, L.; Xia, Y.; Wang, X. Effects of Microbiota on the Treatment of Obesity with the Natural Product Celastrol in Rats. *Diabetes Metab. J.* 2020, 44, 747–763.
134. Khan, A.S.; Keast, R.; Khan, N.A. Preference for dietary fat: From detection to disease. *Prog. Lipid Res.* 2020, 78, 101032.
135. Love-Gregory, L.; Abumrad, N.A. CD36 genetics and the metabolic complications of obesity. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2011, 14, 527–534.
136. Jaime-Lara, R.B.; Brooks, B.E.; Vizioli, C.; Chiles, M.; Nawal, N.; Ortiz-Figueroa, R.S.E.; Livinski, A.A.; Agarwal, K.; Colina-Prisco, C.; Iannarino, N.; et al. A systematic review of the biological mediators of fat taste and smell. *Physiol. Rev.* 2023, 103, 855–918. [CrossRef] [PubMed].
137. Berrichi, M.; Benammar, C.; Murtaza, B.; Hichami, A.; Belarbi, M.; Khan, N.A. *Zizyphus lotus* L. fruit attenuates obesity-associated alterations: In vivo mechanisms. *Arch. Physiol. Biochem.* 2021, 127, 119–126.
138. Ahart, Z.C.; Martin, L.E.; Kemp, B.R.; Dutta Banik, D.; Roberts, S.G.E.; Torregrossa, A.M.; Medler, K.F. Differential Effects of Diet and Weight on Taste Responses in Diet-Induced Obese Mice. *Obesity* 2020, 28, 284–292.
139. Dong, G.; Boothe, K.; He, L.; Shi, Y.; McCluskey, L.P. Altered peripheral taste function in a mouse model of inflammatory bowel disease. *Sci. Rep.* 2023, 13, 18895. [CrossRef] [PubMed].
140. Khan, A.S.; Hichami, A.; Murtaza, B.; Louillat-Habermeyer, M.L.; Ramseyer, C.; Azadi, M.; Yesylevskyy, S.; Mangin, F.; Lirussi, F.; Leemput, J.; et al. Novel Fat Taste Receptor Agonists Curtail Progressive Weight Gain in Obese Male Mice. *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2023, 15, 633–663.

141. Feng, P.; Chai, J.; Yi, H.; Redding, K.; Margolskee, R.F.; Huang, L.; Wang, H. Aggravated gut inflammation in mice lacking the taste signaling protein  $\alpha$ -gustducin. *Brain Behav. Immun.* 2018, 71, 23–27.
142. Wang, H.; Zhou, M.; Brand, J.; Huang, L. Inflammation and taste disorders: Mechanisms in taste buds. *Ann. NY Acad. Sci.* 2009, 1170, 596–603.
143. Hichami, A.; Saidi, H.; Khan, A.S.; Degbeni, P.; Khan, N.A. In Vitro Functional Characterization of Type-I Taste Bud Cells as Monocytes/Macrophages-like Which Secrete Proinflammatory Cytokines. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 10325. [CrossRef]
144. Cohn, Z.J.; Kim, A.; Huang, L.; Brand, J.; Wang, H. Lipopolysaccharide-induced inflammation attenuates taste progenitor cell proliferation and shortens the life span of taste bud cells. *BMC Neurosci.* 2010, 11, 72.
145. Feng, P.; Zhao, H.; Chai, J.; Huang, L.; Wang, H. Expression and secretion of TNF- $\alpha$  in mouse taste buds: A novel function of a specific subset of type II taste cells. *PLoS ONE* 2012, 7, e35588.
146. Park, E.J.; Lee, J.H.; Yu, G.Y.; He, G.; Ali, S.R.; Holzer, R.G.; Osterreicher, C.H.; Takahashi, H.; Karin, M. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell* 2010, 140, 197–208.
147. Hotamisligil, G.S.; Arner, P.; Caro, J.F.; Atkinson, R.L.; Spiegelman, B.M. Increased adipose expression of tumor necrosis factor in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 1995, 95, 2409–2415.
148. Li, X.; Ren, Y.; Chang, K.; Wu, W.; Griffiths, H.R.; Lu, S.; Gao, D. Adipose tissue macrophages as potential targets for obesity and metabolic diseases. *Front Immunol.* 2023, 14, 1153915.
149. Kim, E.Y.; Noh, H.M.; Choi, B.; Park, J.E.; Kim, J.E.; Jang, Y.; Lee, H.K.; Chang, E.-J. Interleukin-22 induces the infiltration of visceral fat tissue by a discrete subset of Duffy antigen receptor for chemokine-positive M2-like macrophages in response to a high fat diet. *Cells* 2019, 8, 587.
150. Hotamisligil, G.S.; Murray, D.L.; Choy, L.N.; Spiegelman, B.M. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 4854–4858.
151. Hotamisligil, G.S.; Budavari, A.; Murray, D.; Spiegelman, B.M. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *J. Clin. Invest.* 1994, 94, 1543–1549.
152. Hotamisligil, G.S.; Shargill, N.S.; Spiegelman, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993, 259, 87–91.

153. Mohamed-Ali, V.; Goodrick, S.; Rawesh, A.; Katz, D.R.; Miles, J.M.; Yudkin, J.S.; Klein, S.; Coppel, S.W. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6 but not tumour necrosis factor- $\alpha$ , in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997, 82, 4196–4200.
154. Bastard, J.P.; Maachi, M.; Van Nhieu, J.T.; Jardel, C.; Bruckert, E.; Grimaldi, A.; Robert, J.-J.; Capeau, J.; Hainque, B. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000, 87, 2084–2089.
155. Wang, Y.; Li, C.; Gu, J.; Chen, C.; Duanmu, J.; Miao, J.; Yao, W.; Tao, J.; Tu, M.; Xiong, B.; et al. Celastrol exerts anti-inflammatory effect in liver fibrosis via activation of AMPK-SIRT3 signalling. *J. Cell Mol. Med.* 2020, 24, 941–953.
156. Inoue, M.; Ohtake, T.; Motomura, W.; Takahashi, N.; Hosoki, Y.; Miyoshi, S.; Suzuki, Y.; Saito, H.; Kohgo, Y.; Okumura, T. Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 336, 215–222.
157. Knight, B.L.; Hebbachi, A.; Hauton, D.; Brown, A.M.; Wiggins, D.; Patel, D.D.; Gibbons, G.F. A role for PPARalpha in the control of SREBP activity and lipid synthesis in the liver. *Biochem. J.* 2005, 89, 413–421.
158. Luo, D.; Fan, N.; Zhang, X.; Ngo, F.Y.; Zhao, J.; Zhao, W.; Huang, M.; Li, D.; Wang, Y.; Rong, J. Covalent inhibition of endoplasmic reticulum chaperone GRP78 disconnects the transduction of ER stress signals to inflammation and lipid accumulation in diet-induced obese mice. *Elife* 2022, 11, e72182.
159. Wang, C.; Shi, C.; Yang, X.; Yang, M.; Sun, H.; Wang, C. Celastrol suppresses obesity process via increasing antioxidant capacity and improving lipid metabolism. *Eur. J. Pharmacol.* 2014, 744, 52–58.
160. Abu Bakar, M.H.; Nor Shahril, N.S.; Mohamad Khalid, M.S.F.; Mohammad, S.; Shariff, K.A.; Karunakaran, T.; Mohd Salleh, R.; Mohamad Rosdi, M.N. Celastrol alleviates high-fat diet-induced obesity via enhanced muscle glucose utilization and mitochondrial oxidative metabolism-mediated upregulation of pyruvate dehydrogenase complex. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2022, 449, 116099. [CrossRef]

## Article

# Celastrol Improves Preference for a Fatty Acid, and Taste Bud and Systemic Inflammation in Diet-Induced Obese Mice

Manal Benmouna <sup>1,2</sup>, Chahid Benammar <sup>1</sup>, Amira Sayed Khan <sup>2</sup>, Fatima Zohra Djeziri <sup>1</sup>, Aziz Hichami <sup>2</sup>   
and Naim A. Khan <sup>2,\*</sup> 

<sup>1</sup> Physiologie de Nutrition & Toxicology (NUTox), UMR UB/INSERM 1231 Center for Cellular & Translational Molecular Medicine (CTM), Université Bourgogne Europe, & FCS Bourgogne-Franche Comté, LipSTIC LabEx, 21000 Dijon, France; benmanel84@gmail.com (M.B.); chabena62@yahoo.fr (C.B.); fatimazohradj@yahoo.fr (F.Z.D.)

<sup>2</sup> Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA), Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen 13000, Algeria; amira.khan@u-bourgogne.fr (A.S.K.); aziz.hichami@u-bourgogne.fr (A.H.)

\* Correspondence: naim.khan@u-bourgogne.fr; Tel.: +33634471599

**Abstract:** Background: Obesity is associated with the altered gustatory perception of dietary fatty acids. Celastrol, a triterpene, has been demonstrated to exert anti-obesity effects in rodents. We assessed the role of Celastrol in the modulation of the oro-sensory perception of lipids in control and high-fat diet (HFD)-induced obese mice. Methods: Male mice of the C57B/6J strain were fed a HFD for 11 weeks and then were administered or not with Celastrol further for 4 weeks. The body weight was recorded weekly. Before the sacrifice, the animals were subjected to oro-sensory detection of a dietary long-chain fatty acid in a two-bottle choice paradigm. After the sacrifice, the fungiform taste buds were isolated and analyzed for mRNA expression, encoding fat sensors (CD36 and GPR120) and pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ). Circulating concentrations of IL-6 and TNF- $\alpha$  were also determined, and liver was used to analyze the mRNA expression of lipogenic genes. Results: Celastrol administration in obese mice decreased body weight and also re-established the loss of oro-sensory perception for a dietary fatty acid, and this phenomenon was, in part, due to the upregulation of mRNA, encoding fat taste receptors (CD36 and GPR120) in tongue taste bud cells. Furthermore, Celastrol decreased inflammation both in taste buds and blood circulation. Conclusions: Our findings suggest that Celastrol decreases body weight gain, ameliorates the gustatory perception of lipids, and downregulates inflammation in obese mice.

**Keywords:** fat taste; terpenoid; gustation; CD36; GPR120; inflammation; liver; high-fat diet



Academic Editor: Alessandra Bordoni

Received: 5 March 2025

Revised: 2 April 2025

Accepted: 4 April 2025

Published: 9 April 2025

**Citation:** Benmouna, M.; Benammar, C.; Khan, A.S.; Djeziri, F.Z.; Hichami, A.; Khan, N.A. Celastrol Improves Preference for a Fatty Acid, and Taste Bud and Systemic Inflammation in Diet-Induced Obese Mice. *Nutrients* **2025**, *17*, 1308. <https://doi.org/10.3390/nu17081308>

**Copyright:** © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Obesity, a global epidemic, is characterized by the excessive accumulation of fat in adipose tissue. According to the WHO [1], there are more than 1.9 billion adults who are overweight, and more than 777 million adults who are clinically obese. Overweight and obesity represent the fifth leading cause of death worldwide. Each year, 2.8 million adults die from these conditions: 44% because of diabetes, 23% by ischemic heart disease, and 7 to 47% of deaths are caused by certain cancers that are also attributed to overweight and obesity [1].

Obesity is a multifactorial disease, including genetic susceptibility under the influence of environmental factors and other factors such as diet, excessive sedentary lifestyle, and a lack of physical activity. The interactions between these factors may create a favorable

pattern for the expression of genes that may trigger obesity [2]. It is generally accepted that eating fat-rich food may contribute to increased fat accumulation and increases the incidence of obesity. In addition, several studies have reported a relationship between fat accumulation and chronic inflammation that promote insulin resistance in the obese. In obesity, the pro-inflammatory mediators released by inflamed adipose tissue target the liver and, consequently, trigger hepatic steatosis, which is considered the initial stage of non-alcoholic steatohepatitis [3]. The inflammatory condition in the liver of the obese is so important that, even after weight loss, signs of inflammation, like fibrosis, in the liver, still persist and may contribute to an increased risk for rebound weight gain [4]. We, therefore, in the present study, assessed the inflammatory cytokines in the liver of obese animals before and after Celastrol administration.

Obesity is also associated with a strong attraction for dietary fat in rodents [5]. In human beings, several studies have shown that obese subjects prefer lipids compared with lean subjects [5,6]. There is a positive correlation between obesity and fat detection thresholds; i.e., the higher the body mass index (BMI), the higher the oro-sensory detection threshold in obese participants [7]. It is important to mention that a fat-rich obesogenic diet that leads to obesity also alters fat taste perception, viz., increasing fat intake causes a decrease in fat taste detection sensitivity. Multiple cross-sectional studies, conducted on human volunteers, have confirmed these observations [8,9], meaning that individuals who consume high fat-rich food were found to have reduced taste oral sensitivity to fat. One of the plausible mechanisms involved in the attraction to dietary lipids is the attenuated function of CD36, expressed by tongue taste bud cells. Indeed, CD36 acts as a sensor to detect and to respond to dietary fat during mastication to signal to the brain and help regulate fat intake [10,11]. Several studies on CD36 SNP have demonstrated reduced sensitivity (or high threshold) to the taste of fat that may lead to fat overeating or a high preference for fat-rich foods in the obese [7,12]. Hence, an anti-obesity strategy should trigger the restoration of reduced fat taste sensitivity.

Over the past two decades, chemical substances derived from plants have attracted public and scientific interest in their role in preventing disease and maintaining good health [13]. Several epidemiological studies suggest that plant-based foods rich in polyphenolic agents reduce inflammation [14]. In vivo and in vitro studies suggest that pentacyclic triterpenes, purified from plants, modulate different factors linked to metabolic syndrome [14]. These phytochemicals could be promising candidates for clinical trials for the treatment of metabolic syndrome. They can be powerful anti-obesity agents because they regulate the different stages of adipogenesis, lipolysis, and fatty acid oxidation and target transcription factors involved in adipocyte development [15]. Our team proposes that certain molecules of the terpenoid family can play a role in the modulation of gustatory perception of fat and exert beneficial effects in obesity in the mouse [16,17]. Oleanolic acid, a triterpene purified from *Olea europaea*, exerts an anti-obesity effect in mice [18]. Zizyphine, a triterpene purified from *Zizyphus lotus*, and oleanolic acid exhibit close structural homology to tauroolithocholic acid (TLC), a bile acid, which acts via TGR5 (Takeda-G-protein-receptor-5, a bile salt receptor). Indeed, our team has identified the expression of TGR5 in mice and human taste bud cells [19].

Celastrol is a naturally occurring triterpenoid isolated from Celastraceae plants such as *Tripterygium wilfordii* [20] and *Celastrus orbiculatus* [21]. It is noteworthy that these two plants have been used in Chinese medicine to treat inflammatory pathologies like rheumatoid arthritis [22]. Celastrol has been purified as an active ingredient from these plants [23]. Since the anti-obesity effect of Celastrol has been reported [24], and fat intake is altered in obesity as mentioned here before, we undertook the present study to assess the effects of

Celastrol on the modulation of fat preference and inflammation in diet-induced obesity in mice.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

Celastrol was purchased from Ficher Scientific (Illkirch-Graffenstaden, Strasbourg, France), and the standard diet was purchased from SAFE (Route de Saint Bris, Augy, France). The palm oil was purchased from Huilerie Vigean (Clion, France). All of the solvents and other products were obtained from Merck (St. Quentin Fallavier, Lyon, France). The ELISA kits for TNF- $\alpha$  (ref. LS-F12798-1) and IL-6 (ref. OKBB00190) were purchased from Clinisciences (Nanterre, France).

### 2.2. Animals and Diets

Eight-week-old male C57B/6J mice were obtained from Janvier Elevage (Le Genest-St-Isle, France). The general guidelines for the care and use of laboratory animals, recommended by the council of European Economic Communities, were followed. The experimental protocol (C21231008EA) was approved on 05/08/2021 by the Regional Ethical Committee of Burgundy (France). Mice were housed in animal husbandry facility under controlled conditions at a constant temperature ( $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) and humidity ( $60 \pm 5\%$ ), with light/dark cycle of 12 h with food and water ad libitum. The mice ( $n = 15$ ) were divided into two groups: standard (Std) diet-fed group ( $n = 5$ ) and HFD-fed group ( $n = 10$ ). The palm oil was the main fat component in high-fat diet. The different diets and their fatty acid compositions can be seen in Tables 1 and 2. The diets were prepared every week and stored at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  until further use.

**Table 1.** Fatty acid composition of the diets.

Fatty Acids (g/100 g)	STD	HFD
SFA	0.56	15.42
MUFA	0.78	13.46
PUFA	1.62	4.75

Abbreviations: STD: standard diet. HFD: high fat-diet. SFA: saturated fatty acids. MUFA: monounsaturated acids. PUFA: polyunsaturated acids.

**Table 2.** Composition of the diets.

Composition (g/100 g)	STD	HFD
Starch	66.8	40.07
Proteins	16.10	14.6
Fats	3.10	35.3
Cholesterol	-	0.03
Cellulose	3.9	2.7
Vitamins	5.0	3.4
Minerals	5.1	3.9
Energy (Kcal 100 g)	359.5	536.65
Fat Energy (% of total Energy)	8.0	60.0

Abbreviations: STD: standard diet. HFD: high fat-diet.

### 2.3. Diet-Induced Obesity

C57B/6J male mice were fed a high-fat diet (HFD) for 15 weeks. After 11 weeks of HFD, obese animals were divided into two groups: one continued to receive HFD and vehicle, whereas another received the same HFD and Celastrol at  $100\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  [25] intraperitoneally for four weeks further. Mice were weighed weekly, and food and energy

intake were determined daily. After 15 weeks, mice were fasted overnight and sacrificed by using isoflurane to anesthetize. Serum was isolated by centrifugation from clotted blood, and liver samples were weighed and immediately stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until analysis. Tongues were immediately removed and placed in Tyrode solution for papillae isolation.

#### 2.4. Determination of Pro-Inflammatory Cytokines

At the time of sacrifice, blood was drawn in dry tubes and centrifuged at  $200\times g \times 10\text{ min}$ . The supernatant/serum was stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until the dosage of cytokines (IL-6 and TNF- $\alpha$ ). The ELISA kits were used for the quantification of IL-6 and TNF- $\alpha$ , and the dosages were performed as per manufacturer's protocol, furnished with the kits.

#### 2.5. Liver Cholesterol and Triglyceride Determinations

Liver samples were thawed and homogenized in 9 mL of chloroform–methanol (2:1) solution. Methanol (3 mL) was added into the homogenates that were vortexed and further centrifuged ( $3000\times g \times 15\text{ min}$ ). The resulting supernatant (8.25 mL) was transferred to glass tubes and was added with 4 mL of chloroform and 2.75 mL of 0.73% NaCl, and it was further centrifuged ( $3000\times g \times 3\text{ min}$ ). The lower phase, after evaporation, was resuspended in 1 mL of buffer containing 1,4-piperazinediethanesulfonic acid (28.75 mM), magnesium chloride (57.76 mM), free fatty acid–bovine serum albumin (8.76 microM), and sodium dodecyl sulfate (0.1%), and lipids were emulsified by sonication [25]. Total cholesterol and triglyceride (TG) levels were determined by colorimetric enzymatic methods (DiaSys, Holzheim, Germany).

#### 2.6. Two-Bottle Preference Test

In order to study the preference for a lipid solution, we employed a two-bottle preference test, according to previously published procedure [17]. Before starting the experiment, mice were provided with two drinking bottles for 24 h. The mice were further subjected to two bottles: one contained 0.1% of linoleic acid in gum of xanthan, GX (0.3%, *w/v*) in water, and the other bottle contained vehicle, GX (0.3% *w/v*). The intake was determined by weighing the bottles after 12 h, i.e., overnight.

#### 2.7. Isolation of Mouse Taste Bud Cells

Tongue fungiform papillae were dissected under microscope. The mouse taste bud cells (mTBCs) were isolated, as previously described [18], by enzymatic dissociation by using the mixture of elastase and dispase, 2 mg/mL each in Tyrode buffer: 120 mM of NaCl, 5 mM of KCl, 10 mM HEPES, 1 mM of  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM of glucose, 1 mM of  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM of Na pyruvate, and pH 7.4. Isolated mTBCs were stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  for RT-qPCR analysis.

#### 2.8. mRNA Expression by Real-Time-Quantitative PCR (RT-qPCR)

The sequences of the primers used can be seen in Table 3. Total RNA was extracted from liver and taste bud cells by using TRizol (Fischer Scientific, Illkirch-Graffenstaden, Strasbourg, France), then treated with DNAase, and reverse-transcribed with cDNA synthesis kit according to the manufacturer's instruction.

**Table 3.** Sequences of the primers.

Gene	Primer Sequence
Beta-Actin	Forward: TGTTACCAACTGGGACGACA Reverse: CTGGGTCATCTTTTCACGGT
Gustducin	Forward: ACACATTGCAGTCCATCCTAGC Reverse: ATCACCATCTTCTAGTGTATTTGCC
CD36	Forward: ATGGGCTGTGATCGGAACTG Reverse: TTTGCCACGTCATCTGGGTTT
GPR120	Forward: GTGCCGGGACTGGTCATTGTG Reverse: TTGTTGGGACACTCGGATCTGG
IL-1 $\beta$	Forward: CACAGCAGCACATCAACAAG Reverse: GTGCTCATGTCCTCATCCTG
IL-6	Forward: CCGCTATGAAGTTCCTCTCTGC Reverse: ATCCTCTGTGAAGTCTCCTCTCC
TNF- $\alpha$	Forward: CCCTCACACTCAGATCATCTTCT Reverse: GCTACGACGTGGGCTACAG
PPAR $\alpha$	Forward: AGAGCCCCATCTGTCCTCTC Reverse: ACTGGTAGTCTGCAAAACCAAA
SREBP1c	Forward: CCCACCTCAAACCTGGATCT Reverse: AAGCAGCAAGATGTCCTCCT
FAS	Forward: GGCTCTATGGATTACCCAAGC Reverse: CCAGTGTTTCGTTCTCCTCGGA
ACC1	Forward: CGGACCTTTGAAGATTTTGTGAGG Reverse: GCTTTATTCTGCTGGGTGAACTCTC
ACC2	Forward: GGAAGCAGGCACACATCAAGA Reverse: CGGGAGGAGTTCTGGAAGGA

RT-qPCR was performed using stepOnePlus real-time PCR system by employing SYBR Green I (Merck, St. Quentin Fallavier, Lyon, France). The relative gene expression was determined using ( $\Delta$ Ct) by the comparative 2.CT method. Beta-actin was used as a housekeeping gene.

### 2.9. Statistical Analysis of Data

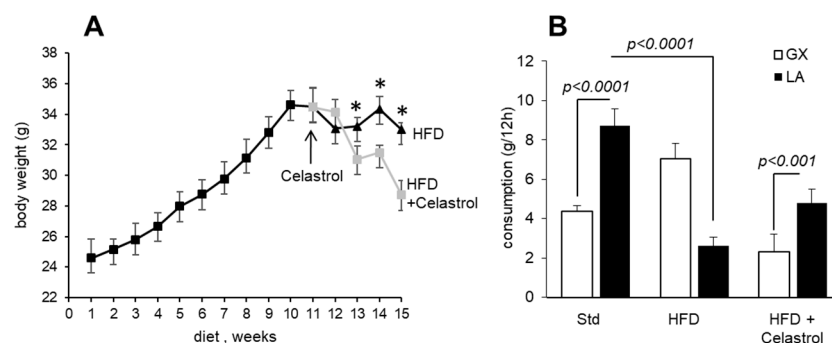
Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n = 5). The significance of difference between mean values was determined by analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's least-significant-difference (LSD) test. Significant differences were considered at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Celastrol Decreases Body Weight Gain and Modulates Fat Preference in HFD-Fed Mice

Figure 1 shows the body weight gain in mice maintained on a HFD during 15 weeks. Mice maintained on a HFD gained weight as a function of time (Figure 1A). However, the body weight remained almost the same from the 11th week onwards in HFD-fed animals. Interestingly, a significant and progressive reduction in body weight gain was observed after 4 weeks of Celastrol administration in obese animals.

In order to compare gustatory attraction for lipids in mice, the two-bottle preference test was performed using a dietary long-chain fatty acid (LCFA), i.e., linoleic acid, 0.1% ( $w/v$ ). Hence, the individually caged mice were allowed to choose between 0.1% LCFA emulsified in 0.3% xanthan gum in water or water with vehicle alone (0.3% xanthan gum) over a period of 12 h. The standard diet-fed mice showed a strong preference for a solution containing LCFA; however, HFD-fed mice showed significantly decreased preference for this fatty acid. Interestingly, Celastrol treatment upregulated the preference for LCFA in mice maintained on a HFD (Figure 1B).



**Figure 1.** Effect of Celastrol on diet-induced obesity and preference for fat: (A) Mice maintained on a HFD for 15 weeks ( $n = 10$ ). On the 11th week of a HFD, obese animals ( $n = 10$ ) are divided into two groups: one is continued on a HFD alone (filled triangles), whereas the second one is fed the same HFD and administered with Celastrol ( $100 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) intraperitoneally for 4 more weeks (gray squares). The arrow in the Figure shows the 11th week of the HFD when the mice are divided into two groups. The body weight is measured weekly. The asterisks (\*) show significant differences between two groups ( $p < 0.01$ ). (B) Another group of mice ( $n = 5$ ), maintained on a standard diet for the same duration, i.e., 15 weeks, is used as the control group from Figures 1B,2–4. After 15 weeks, the animals are deprived of water for 6 h, and a two-bottle preference test is performed. GX, gum of xanthan; LA, linoleic acid.

### 3.2. Celastrol Modulates Fat Taste Receptor and Pro-Inflammatory Cytokines mRNA Expression in HFD-Fed Mice

To explore whether the alteration in fatty acid preference in obese mice is due to the altered expression of fat taste receptors in tongue epithelium, we examined the mRNA expression of main lipid receptors (CD36 and GPR120) and also gustducin (GUS), a marker of taste receptor cells, in mouse taste bud cells (Figure 2A–C). We observed that there was a significant decrease in taste bud CD36 and GUS mRNA expression in HFD-fed mice. Obese mice that received Celastrol exhibited significantly higher CD36 and gustducin mRNA expression than HFD-fed mice. However, GPR120 mRNA did not follow the same trend, its expression was upregulated in obese mice, and Celastrol curtailed the same.

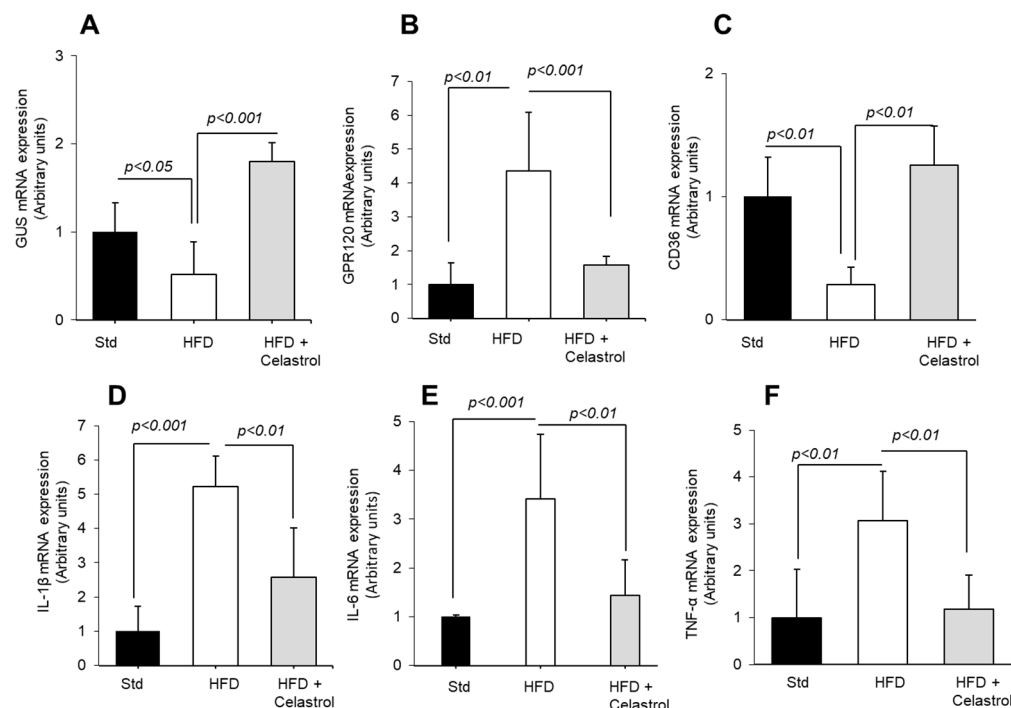
We further examined the mRNA levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ ) in mTBCs isolated from obese mice administered or not with Celastrol. As shown, the mRNA expression of genes, like IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF $\alpha$ , was increased by the HFD, and their expression was downregulated by Celastrol treatment (Figure 2D–F). In this study, it would have been better, if we had determined the expression of lipid sensors at the protein level by Western blot.

### 3.3. Celastrol Decreases the Circulating Concentrations of Pro-Inflammatory Cytokines

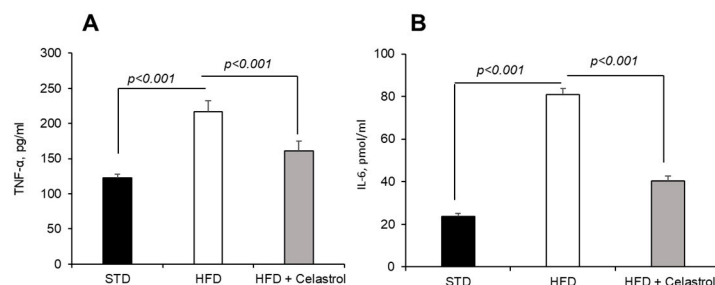
Since obesity is associated with low-grade inflammation, we determined blood concentrations of IL-6 and TNF- $\alpha$  by ELISA (Figure 3A,B). The concentrations of IL-6 and TNF- $\alpha$  increased in HFD-fed mice, whereas Celastrol lowered their levels in obese mice (Figure 3A,B).

### 3.4. Celastrol Regulates Hepatic Lipid Levels and mRNA Expression of Lipid Metabolic Mediators

At first, we determined liver weight, and we observed that feeding a high-fat diet increased liver weight, and Celastrol treatment decreased the same significantly (Figure 4A). Interestingly, there was an increase in triglycerides and cholesterol levels in the liver of animals, maintained on a high-fat diet, and Celastrol decreased their liver concentrations (Figure 4B,C).



**Figure 2.** Effect of Celastrol on the expression of mRNA encoding gustducin, fat taste receptors, and pro-inflammatory cytokines in taste bud cells. After 15 weeks of the experiments (see Figure 1 legends), the animals are sacrificed, and fungiform taste papillae are recuperated to isolate taste bud cells that are subjected to RT-qPCR analyses for gustducin, GUS (A), GPR120 (B), CD36 (C), and pro-inflammatory cytokines, IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  (D–F) mRNA expression in mTBCs.

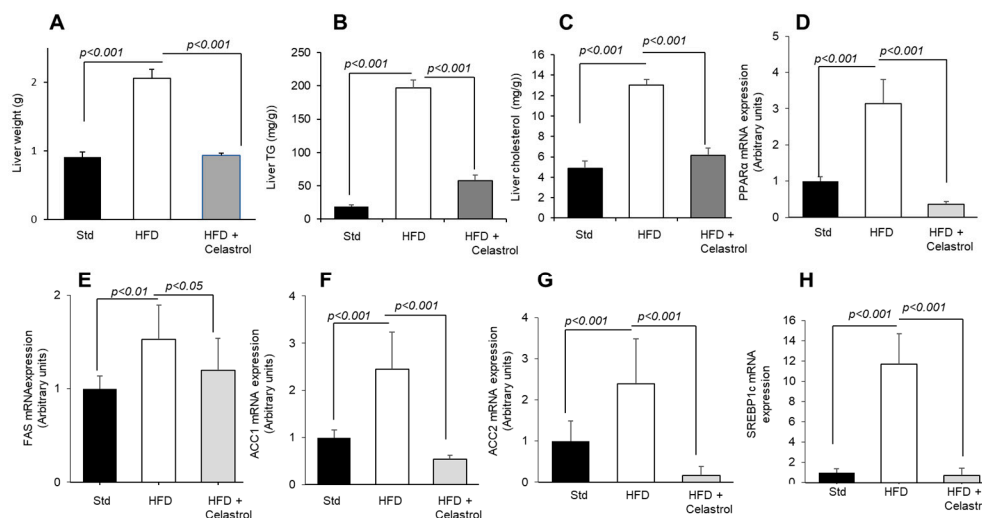


**Figure 3.** Effect of Celastrol on circulating pro-inflammatory cytokines in mice. The protocol is identical as described in Figure 1 and mentioned in Section 2. The figure shows the levels of pro-inflammatory cytokines, TNF- $\alpha$  (A) and IL-6 (B).

We also examined the genes involved in lipid metabolism. Several findings suggest that the activation of PPAR $\alpha$  is involved not only in lipid metabolism but also in the induction of “acute phase response” of inflammation in the liver [26–28]. Consequently, PPAR $\alpha$  gene deficiency has been found to downregulate the mRNA of certain pro-inflammatory agents, like TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 in the mice [29]. Our results suggest that the anti-inflammatory action of Celastrol in the liver might be, in part, contributed by its action on lowering PPAR $\alpha$  mRNA expression (Figure 4D).

The ACC and FAS have been considered as hepatic biomarkers of lipogenesis and the de novo synthesis of fatty acids [26]. FAS is principally involved in fat storage when energy-dense food is consumed. Concerning ACC, there are two isoforms: ACC1 has been identified in cytosol and involved in the rate-controlling reaction of de novo lipogenesis, whilst ACC2 is embedded into the mitochondria plasma membrane and regulates fatty acid oxidation by producing malonyl-CoA [27]. The inhibitory action of Celastrol on FAS and ACC (1 and 2) mRNA expression (Figure 4E–G) in HFD-fed mice shows that this terpenoid

decreases lipogenesis, triggered by the high-fat diet and, consequently, may result into low fat mass in obese mice during high-fat diet feeding. Furthermore, the SREBP1c, a transcription factor, which regulates lipid synthesis in the liver, was also upregulated in the liver of obese mice, and Celastrol further decreased the expression of its mRNA in liver (Figure 4H).



**Figure 4.** Effect of Celastrol on the expression of hepatic mRNA encoding lipogenic genes. The protocol is identical as described in Figure 1 and mentioned in Materials and Methods. After 15 weeks of experimentation, the animals are sacrificed, liver was weighed (A), and liver TG (B) and cholesterol (C) concentrations were determined. The liver was also used for the mRNA expression of metabolic genes, i.e., PPAR $\alpha$  (D), FAS (E), ACC1 (F), ACC2 (G), and SREBP1c (H).

#### 4. Discussion

Celastrol, a bioactive compound, purified from medicinal plants like *Tripterygium wilfordii*, is a herb used in Chinese medicine and has been shown to exert anti-obesity effects [24,30]. In the present study, we extended these observations on other aspects of obesity, for example, the oro-sensory perception of a long-chain fatty acid (LCFA), the expression of fat taste receptors, liver lipogenesis, and inflammation. Celastrol treatment reduced body weight in obese mice in accordance with the report of Liu et al. [24] who demonstrated its anti-obesity action via increasing leptin sensitivity to hypothalamus and improving insulin sensitivity by inhibiting the NF- $\kappa$ B pathway. It is also possible that, in addition to leptin sensitivity, Celastrol decreased body weight by increasing energy expenditure and improving gut microbiota as reported in a rat model [31].

Nutritional obesity is generally associated with high-fat, rich food intake. It has been reported that diet-induced obesity in mice is associated with the low oro-gustatory detection of long-chain fatty acids, and this phenomenon might contribute to high fat intake [10]. Similarly, in several studies on human populations, the CD36 genetic polymorphism, responsible for the attenuated function of CD36, has been associated with high fat intake in the obese [7,12,32]. Hence, an agent that can restore the decreased oro-sensory capacity to detect dietary fatty acids in the obese will be a good therapeutic agent. In the present study, we observed that a HFD decreased the gustatory preference for a dietary LCFA in accordance with several reports [10,16]. Decreased sensitivity to a fatty acid might be due to the downregulation of CD36 in taste bud cells [10]. Though we did not analyze the expression of lipid sensors (CD36 and GPR120) at protein level by Western blot, our RT-qPCR analyses suggest a decreased CD36 mRNA expression in TBCs in obese mice, and the administration of Celastrol upregulated it. Concerning the mechanism of action

of Celastrol on fat taste sensors, we can state that this terpenoid might have decreased the taste bud inflammation in obese mice. Indeed, the inflammation, induced either by a high-fat diet or by treatment with dextran sodium sulfate (DSS), has been reported to decrease taste bud functions in the mice [33,34]. Furthermore, there seems to be an “opposite” tendency between CD36 and GPR120 mRNA expression. Hence, we would like to state that CD36 is involved in “detection”, whereas GPR120 is responsible for the “post-oral regulation” of fat-eating behavior as we have previously proposed [10]. This kind of opposite expression of CD36 and GPR120 has been previously shown in rodents [10]. The upregulation of CD36 by Celastrol might be responsible to restore the oro-sensory capacity to detect an LCFA in the mice, as reported previously that decreased fat taste perception in obese mice can be restored by chemical compounds that decrease obesity and inflammation [35]. We do not think that there would be a direct action of Celastrol on fat taste receptor activation. In addition, decreased gustducin mRNA expression has been associated with high inflammatory conditions [36]. We were tempted to assess whether diet-induced obesity in our model was associated with taste bud inflammation. We employed the RT-qPCR technique and observed that obesity induced by a HFD was associated with upregulated inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ) mRNA, which could affect taste bud renewal and also result into low taste-detection capacity as suggested by Wang et al. [37]. In addition, our team has studied the inflammation in taste bud cells and demonstrated that diet-induced obesity or LPS-triggered inflammation increased TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 expression, both at mRNA and protein levels, in taste bud cells [38]. Cohen et al. [39] have demonstrated that TNF- $\alpha$  and IL-6 might decrease the renewal of taste bud cells, exert an impact on the proliferation of type II cells, and, therefore, alter taste perception. We would like to recall that fat taste receptors (CD36 and GPR120) are expressed by Type II TBC in mice [10]. TNF- $\alpha$  in TBCs is produced via the toll-like receptor (TLR) pathway by Type II cells but not by Type I and Type III cells [40].

As regards systemic inflammation, we determined the circulating concentrations of IL-6 and TNF- $\alpha$  in blood. Dietary and genetic obesity promotes inflammation by increasing the concentrations of these pro-inflammatory cytokines [41]. It has been shown that adipose tissue, apart from secreting adipokines (adiponectin and leptin), also secretes pro-inflammatory cytokines, mainly TNF- $\alpha$  and IL-6. Regarding TNF- $\alpha$ , the following observations can be noted: (1) TNF- $\alpha$  is constitutively expressed by adipose tissue, and (2) genetically obese rodents (ob/ob mice and fa/fa Zucker rats) express TNF- $\alpha$  in their adipose tissue [42]. It has been demonstrated that adipose tissues can be the subject of macrophage infiltration during obesity. Indeed, macrophage infiltration into adipose tissue plays a key role in the pathogenesis and dysfunction of adipose tissue, thus contributing to obesity-induced inflammation [43]. These infiltrated cells represent a novel family of cell subtypes, which are CD9<sup>+</sup> and DARC<sup>+</sup> macrophages, principally localized in crown-like structures within adipose tissue during obesity [44]. Adipose tissue from obese subjects contains significantly more TNF- $\alpha$  than lean subjects [45,46]. The administration of the TNF- $\alpha$  receptor protein that binds to endogenous TNF- $\alpha$  normalizes insulin sensitivity [47]. It is noteworthy that between 10 and 30% of circulating IL-6 is derived from adipose tissues. There is a positive correlation between circulating IL-6 levels, adiposity [48], and insulin resistance [49]. The action of Celastrol on decreasing the circulating levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  demonstrates its anti-inflammatory property that can be again beneficial in the obese. Our observations corroborate the findings of Wang et al. [50], who have demonstrated the anti-inflammatory action of this terpenoid during liver fibrosis in the mice.

Diet-induced obesity resulted into increased liver weight and triglyceride and cholesterol levels, and Celastrol exerted beneficial effects on these parameters, indicating that this terpenoid might modulate liver lipid metabolism. Furthermore, we investigated the mRNA

expression profile of lipogenic (FAS, ACC1, and ACC2) and energy expenditure-related transcription factors (PPAR $\alpha$ , SREBP1c) in the liver. FAS, ACC1, and ACC2 are lipogenic enzymes [40,41], and SREBP1c is a transcription factor induced by high glucose concentration in the liver [42]. We observed that their expression was upregulated in the liver of diet-induced obese mice in accordance with several findings that have reported an increase in the hepatic mRNA expression of SREBP1c, FAS, and SCD1 in obesity [51]. It seems that there is an association between PPAR- $\alpha$  and SREBP1c expression in our study. Indeed, the mRNA of SREBP1c was found downregulated in PPAR $\alpha$ -null mice [52]. Interestingly, Celastrol treatment downregulated the expression of these lipogenic genes in obese mice. Our observations suggest that Celastrol may lower hepatic lipid accumulation via SREBP1c-mediated transcription pathway during obesity. Our results corroborate several reports that have shown that Celastrol modulates lipid metabolism; for example, it suppresses ER stress and lipogenesis and promotes hepatic lipolysis [53]. Furthermore, Celastrol has been found to effectively suppress high-fat diet-mediated increased levels of TC, TG, and LDL-c by improving ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) expression [54]. In the present study, we did not investigate the impact of Celastrol on carbohydrate metabolism; however, it has been reported that this terpenoid remarkably attenuated diet-induced obesity via enhanced glucose utilization [55]. Indeed, Celastrol was found to improve insulin sensitivity and glucose tolerance in obese animals. Celastrol notably increased mitochondrial oxidative functions by increasing pyruvate dehydrogenase complex (PDC) activity and decreasing pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) in obese mice [55].

## 5. Conclusions

We have observed anti-obesity, fat taste modulatory and anti-inflammatory actions of Celastrol in obese mice. Celastrol also normalized liver weight and hepatic cholesterol and triglyceride levels. However, our study has some limitations as we did not study the expression of pro-inflammatory cytokines and other factors at protein level by Western blot in liver and taste bud cells. In future studies, on the basis of structural properties of this terpenoid, it may be envisaged to synthesize more stable pharmacological analogs that might be more potent anti-obesity agents than the lead molecule.

**Author Contributions:** Conceptualization, N.A.K.; methodology, F.Z.D., M.B., A.S.K. and A.H.; formal analysis, M.B., A.S.K. and A.H.; investigation, M.B.; resources, N.A.K. and C.B.; data curation, M.B. and A.H.; writing—original draft preparation, M.B.; writing—M.B., A.H. and N.A.K., supervision, N.A.K.; project administration, M.B. and N.A.K.; funding acquisition, N.A.K. and C.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** We gratefully thank the Ministry of External Affairs (France) that granted the PHC Tassili project, grant number AL/2023-003. Authors are also thankful to the Région Bourgogne-Franche-Comté (BFC) that sanctioned the project AMEDIASH for the contingent grant.

**Institutional Review Board Statement:** This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Regional Ethics Committee (Protocol No. 16198, 5 August 2021).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in this study.

**Data Availability Statement:** Data can be made available by the corresponding author upon reasonable request.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. World Health Organisation. *Obesity and Overweight*; WHO: Geneva, Switzerland, 2015; p. 311.

2. Fukuwatari, T.; Shibata, K.; Iguchi, K.; Saeki, T.; Iwata, A.; Tani, K.; Sugimoto, E.; Fushiki, T. Role of gustation in the recognition of oleate and triolein in anosmic rats. *Physiol. Behav.* **2003**, *78*, 579–583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Donnelly, K.L.; Smith, C.I.; Schwarzenberg, S.J.; Jessurun, J.; Boldt, M.D.; Parks, E.J. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 1343–1351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Fischer, I.; Irmiler, M.; Meyer, C.; Sachs, S.J.; Neff, F.; Hrabě de Angelis, M.; Beckers, J.; Tschöp, M.H.; Hofmann, S.M.; Ussar, S. A history of obesity leaves an inflammatory fingerprint in liver and adipose tissue. *Int. J. Obes.* **2018**, *42*, 507–517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Mela, D.J.; Sacchetti, D.A. Sensory preferences for fats: Relationships with diet and body composition. *Am. J. Clin. Nutr.* **1991**, *53*, 908–915. [[CrossRef](#)]
6. Drewnowski, A.; Brunzell, J.D.; Sande, K.; Iverius, P.H.; Greenwood, M.R. Sweet tooth reconsidered: Taste responsiveness in human obesity. *Physiol. Behav.* **1985**, *35*, 617–622. [[CrossRef](#)]
7. Love-Gregory, L.; Abumrad, N.A. CD36 genetics and the metabolic complications of obesity. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2011**, *14*, 527–534. [[CrossRef](#)]
8. Costanzo, A.; Liu, D.; Nowson, C.; Duesing, K.; Archer, N.; Bowe, S.; Keast, R. A low-fat diet up-regulates expression of fatty acid taste receptor gene *FFAR4* in fungiform papillae in humans: A co-twin randomised controlled trial. *Br. J. Nutr.* **2019**, *122*, 1212–1220. [[CrossRef](#)]
9. Stewart, J.E.; Feinle-Bisset, C.; Golding, M.; Delahunty, C.; Clifton, P.M.; Keast, R.S. Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects. *Br. J. Nutr.* **2010**, *104*, 145–152. [[CrossRef](#)]
10. Khan, A.S.; Keast, R.; Khan, N.A. Preference for dietary fat: From detection to disease. *Prog. Lipid Res.* **2020**, *78*, 101032. [[CrossRef](#)]
11. Besnard, P.; Passilly-Degrace, P.; Khan, N.A. Taste of Fat: A Sixth Taste Modality? *Physiol. Rev.* **2016**, *96*, 151–176. [[CrossRef](#)]
12. Subramanian, G.; Ponnusamy, V.; Vasanthakumar, K.; Panneerselvan, P.; Krishnan, V.; Subramaniam, S. The gustin gene variation at rs2274333 and PROP taster status affect dietary fat perception: A stepwise multiple regression model study. *J. Nutr. Biochem.* **2024**, *128*, 109619. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Xie, X.; Zhai, Y.; Cheng, H.; Wei, W.H.; Ren, M. From Taxus to paclitaxel: Opportunities and challenges for urban agriculture to promote human health. *Plant Physiol. Biochem.* **2025**, *220*, 109502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ye, H.; Wang, Y.; Zhang, X.; Yang, L.; Cai, B.; Zhang, D.; Peng, B. Characterization of global research trends and prospects on celastrol, a principal bioactive ingredient of *Tripterygium wilfordii* Hook F: Bibliometric analysis. *Pharm. Biol.* **2025**, *63*, 15–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Rao, P.P. Phytochemicals in Obesity Management: Mechanisms and Clinical Perspectives. *Curr. Nutr. Rep.* **2025**, *14*, 17. [[CrossRef](#)]
16. Berrichi, M.; Benammar, C.; Murtaza, B.; Hichami, A.; Belarbi, M.; Khan, N.A. *Zizyphus lotus* L. fruit attenuates obesity-associated alterations: In vivo mechanisms. *Arch. Physiol. Biochem.* **2021**, *127*, 119–126. [[CrossRef](#)]
17. Djeziri, F.Z.; Belarbi, M.; Murtaza, B.; Hichami, A.; Benammar, C.; Khan, N.A. Oleanolic acid improves diet-induced obesity by modulating fat preference and inflammation in mice. *Biochimie* **2018**, *152*, 110–120. [[CrossRef](#)]
18. Murtaza, B.; Berrichi, M.; Benammar, C.; Tordjmann, T.; Djeziri, F.Z.; Hichami, A.; Leemput, J.; Belarbi, M.; Ozdener, H.; Khan, N.A. Zizyphin modulates calcium signalling in human taste bud cells and fat taste perception in the mouse. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2017**, *31*, 486–494. [[CrossRef](#)]
19. Bensalema, A.; Murtazaa, B.; Hichamia, A.; Khan, A.S.; Oulamarab, H.; Merlenc, G.; Berrichi, M.; Aglib, A.N.; Tordjmann, T.; Khan, N.A. Bile acid receptor TGR5 is critically involved in preference for dietary lipids and obesity. *J. Nutri. Biochem.* **2020**, *76*, 108–298. [[CrossRef](#)]
20. Lu, Y.; Liu, J.; Zhou, D.; Li, W. Biosynthesis, total synthesis, structural modifications, bioactivity, and mechanism of action of the quinone-methide triterpenoid celastrol. *Med. Res. Rev.* **2021**, *41*, 1022–1060. [[CrossRef](#)]
21. Wu, S.; Sun, C.; Wang, K.; Pan, Y. Preparative isolation and purification of celastrol from *Celastrus orbiculatus* Thunb. by a new counter-current chromatography method with an upright coil planet centrifuge. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1028*, 171–174. [[CrossRef](#)]
22. Zhang, Y.; Mao, X.; Li, W.; Chen, W.; Wang, X.; Ma, Z.; Lin, N. *Tripterygium wilfordii*: An inspiring resource for rheumatoid arthritis treatment. *Med. Res. Rev.* **2020**, *14*, 1337–1374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Dharambir, K.; Ajay, S.; Singh, T.H.; Katrin, S.; Tapan, M.; Anupam, P. Molecular targets of celastrol in cancer: Recent trends and advancements. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2018**, *128*, 70–81.
24. Liu, J.; Lee, J.; Salazar Hernandez, M.A.; Mazitschek, R.; Ozcan, U. Treatment of obesity with celastrol. *Cell* **2015**, *161*, 999–1011. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Rodríguez-Sureda, V.; Peinado-Onsurbe, J. A procedure for measuring triacylglyceride and cholesterol content using a small amount of tissue. *Anal. Biochem.* **2005**, *343*, 277–282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Jensen-Urstad, A.P.; Semenkovich, C.F. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: Housekeeper or messenger? *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1821*, 747–753. [[CrossRef](#)]

27. Goedeke, L.; Bates, J.; Vatner, D.F.; Perry, R.J.; Wang, T.; Ramirez, R.; Li, L.; Ellis, M.W.; Zhang, D.; Wong, K.E.; et al. Acetyl-CoA Carboxylase Inhibition Reverses NAFLD and Hepatic Insulin Resistance but Promotes Hypertriglyceridemia in Rodents. *Hepatology* **2018**, *68*, 2197–2211. [[CrossRef](#)]
28. Mansouri, R.M.; Baugé, E.; Staels, B.; Gervois, P. Systemic and distal repercussions of liver-specific peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  control of the acute-phase response. *Endocrinology* **2008**, *149*, 3215–3223. [[CrossRef](#)]
29. Kim, M.J.; Kim, D.H.; Bang, E.; Noh, S.G.; Chun, P.; Yokozawa, T.; Moon, H.R.; Chung, H.Y. PPAR $\alpha$  Agonist, MHY3200, Alleviates Renal Inflammation during Aging via Regulating ROS/Akt/FoxO1 Signaling. *Molecules* **2021**, *26*, 3197. [[CrossRef](#)]
30. Lan, G.C.; Zhang, J.; Ye, W.B.; Yang, F.; Li, A.; He, W.W.; Zhang, W. Celastrol as a tool for the study of the biological events of metabolic diseases. *Sci. China Chem.* **2019**, *62*, 409–416. [[CrossRef](#)]
31. Hu, W.; Wang, L.; Du, G.; Guan, Q.; Dong, T.; Song, L.; Xia, Y.; Wang, X. Effects of Microbiota on the Treatment of Obesity with the Natural Product Celastrol in Rats. *Diabetes Metab. J.* **2020**, *44*, 747–763. [[CrossRef](#)]
32. Jaime-Lara, R.B.; Brooks, B.E.; Vizioli, C.; Chiles, M.; Nawal, N.; Ortiz-Figueroa, R.S.E.; Livinski, A.A.; Agarwal, K.; Colina-Prisco, C.; Iannarino, N.; et al. A systematic review of the biological mediators of fat taste and smell. *Physiol. Rev.* **2023**, *103*, 855–918. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ahart, Z.C.; Martin, L.E.; Kemp, B.R.; Dutta Banik, D.; Roberts, S.G.E.; Torregrossa, A.M.; Medler, K.F. Differential Effects of Diet and Weight on Taste Responses in Diet-Induced Obese Mice. *Obesity* **2020**, *28*, 284–292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Dong, G.; Boothe, K.; He, L.; Shi, Y.; McCluskey, L.P. Altered peripheral taste function in a mouse model of inflammatory bowel disease. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 18895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Khan, A.S.; Hichami, A.; Murtaza, B.; Louillat-Habermeyer, M.L.; Ramseyer, C.; Azadi, M.; Yesylevskyy, S.; Mangin, F.; Lirussi, F.; Leemput, J.; et al. Novel Fat Taste Receptor Agonists Curtail Progressive Weight Gain in Obese Male Mice. *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2023**, *15*, 633–663. [[CrossRef](#)]
36. Feng, P.; Chai, J.; Yi, H.; Redding, K.; Margolskee, R.F.; Huang, L.; Wang, H. Aggravated gut inflammation in mice lacking the taste signaling protein  $\alpha$ -gustducin. *Brain Behav. Immun.* **2018**, *71*, 23–27. [[CrossRef](#)]
37. Wang, H.; Zhou, M.; Brand, J.; Huang, L. Inflammation and taste disorders: Mechanisms in taste buds. *Ann. NY Acad. Sci.* **2009**, *1170*, 596–603. [[CrossRef](#)]
38. Hichami, A.; Saidi, H.; Khan, A.S.; Degbeni, P.; Khan, N.A. In Vitro Functional Characterization of Type-I Taste Bud Cells as Monocytes/Macrophages-like Which Secrete Proinflammatory Cytokines. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 10325. [[CrossRef](#)]
39. Cohn, Z.J.; Kim, A.; Huang, L.; Brand, J.; Wang, H. Lipopolysaccharide-induced inflammation attenuates taste progenitor cell proliferation and shortens the life span of taste bud cells. *BMC Neurosci.* **2010**, *11*, 72. [[CrossRef](#)]
40. Feng, P.; Zhao, H.; Chai, J.; Huang, L.; Wang, H. Expression and secretion of TNF- $\alpha$  in mouse taste buds: A novel function of a specific subset of type II taste cells. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e35588. [[CrossRef](#)]
41. Park, E.J.; Lee, J.H.; Yu, G.Y.; He, G.; Ali, S.R.; Holzer, R.G.; Osterreicher, C.H.; Takahashi, H.; Karin, M. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell* **2010**, *140*, 197–208. [[CrossRef](#)]
42. Hotamisligil, G.S.; Arner, P.; Caro, J.F.; Atkinson, R.L.; Spiegelman, B.M. Increased adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **1995**, *95*, 2409–2415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Li, X.; Ren, Y.; Chang, K.; Wu, W.; Griffiths, H.R.; Lu, S.; Gao, D. Adipose tissue macrophages as potential targets for obesity and metabolic diseases. *Front Immunol.* **2023**, *14*, 1153915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Kim, E.Y.; Noh, H.M.; Choi, B.; Park, J.E.; Kim, J.E.; Jang, Y.; Lee, H.K.; Chang, E.-J. Interleukin-22 induces the infiltration of visceral fat tissue by a discrete subset of Duffy antigen receptor for chemokine-positive M2-like macrophages in response to a high fat diet. *Cells* **2019**, *8*, 587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Hotamisligil, G.S.; Murray, D.L.; Choy, L.N.; Spiegelman, B.M. Tumor necrosis factor  $\alpha$  inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 4854–4858. [[CrossRef](#)]
46. Hotamisligil, G.S.; Budavari, A.; Murray, D.; Spiegelman, B.M. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Clin. Invest.* **1994**, *94*, 1543–1549. [[CrossRef](#)]
47. Hotamisligil, G.S.; Shargill, N.S.; Spiegelman, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **1993**, *259*, 87–91. [[CrossRef](#)]
48. Mohamed-Ali, V.; Goodrick, S.; Rawesh, A.; Katz, D.R.; Miles, J.M.; Yudkin, J.S.; Klein, S.; Coppel, S.W. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6 but not tumour necrosis factor- $\alpha$ , in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1997**, *82*, 4196–4200.
49. Bastard, J.P.; Maachi, M.; Van Nhieu, J.T.; Jardel, C.; Bruckert, E.; Grimaldi, A.; Robert, J.-J.; Capeau, J.; Hainque, B. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2000**, *87*, 2084–2089. [[CrossRef](#)]
50. Wang, Y.; Li, C.; Gu, J.; Chen, C.; Duanmu, J.; Miao, J.; Yao, W.; Tao, J.; Tu, M.; Xiong, B.; et al. Celastrol exerts anti-inflammatory effect in liver fibrosis via activation of AMPK-SIRT3 signalling. *J. Cell Mol. Med.* **2020**, *24*, 941–953. [[CrossRef](#)]

51. Inoue, M.; Ohtake, T.; Motomura, W.; Takahashi, N.; Hosoki, Y.; Miyoshi, S.; Suzuki, Y.; Saito, H.; Kohgo, Y.; Okumura, T. Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *336*, 215–222. [[CrossRef](#)]
52. Knight, B.L.; Hebbachi, A.; Hauton, D.; Brown, A.M.; Wiggins, D.; Patel, D.D.; Gibbons, G.F. A role for PPARalpha in the control of SREBP activity and lipid synthesis in the liver. *Biochem. J.* **2005**, *89*, 413–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Luo, D.; Fan, N.; Zhang, X.; Ngo, F.Y.; Zhao, J.; Zhao, W.; Huang, M.; Li, D.; Wang, Y.; Rong, J. Covalent inhibition of endoplasmic reticulum chaperone GRP78 disconnects the transduction of ER stress signals to inflammation and lipid accumulation in diet-induced obese mice. *Elife* **2022**, *11*, e72182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
54. Wang, C.; Shi, C.; Yang, X.; Yang, M.; Sun, H.; Wang, C. Celastrol suppresses obesity process via increasing antioxidant capacity and improving lipid metabolism. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *744*, 52–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Abu Bakar, M.H.; Nor Shahril, N.S.; Mohamad Khalid, M.S.F.; Mohammad, S.; Shariff, K.A.; Karunakaran, T.; Mohd Salleh, R.; Mohamad Rosdi, M.N. Celastrol alleviates high-fat diet-induced obesity via enhanced muscle glucose utilization and mitochondrial oxidative metabolism-mediated upregulation of pyruvate dehydrogenase complex. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2022**, *449*, 116099. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

**Abstract:** Obesity is associated with the altered gustatory perception of dietary fatty acids. Celastrol, a triterpene, has been demonstrated to exert anti-obesity effects in rodents. We assessed the role of Celastrol in the modulation of the oro-sensory perception of lipids in control and high-fat diet (HFD)-induced obese mice. Methods: Male mice of the C57B/6J strain were fed a HFD for 11 weeks and then were administered or not with Celastrol further for 4 weeks. The body weight was recorded weekly. Before the sacrifice, the animals were subjected to oro-sensory detection of a dietary long-chain fatty acid in a two-bottle choice paradigm. After the sacrifice, the fungiform taste buds were isolated and analyzed for mRNA expression, encoding fat sensors (CD36 and GPR120) and pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ). Circulating concentrations of IL-6 and TNF- $\alpha$  were also determined, and liver was used to analyze the mRNA expression of lipogenic genes. Results: Celastrol administration in obese mice decreased body weight and also re-established the loss of oro-sensory perception for a dietary fatty acid, and this phenomenon was, in part, due to the upregulation of mRNA, encoding fat taste receptors (CD36 and GPR120) in tongue taste bud cells. Furthermore, Celastrol decreased inflammation both in taste buds and blood circulation. Conclusions: Our findings suggest that Celastrol decreases body weight gain, ameliorates the gustatory perception of lipids, and downregulates inflammation in obese mice.

**Keywords:** fat taste; terpenoid; gustation; CD36; GPR120; inflammation; liver; high-fat diet

**Résumé :** L'obésité est associée à une altération de la perception gustative des acides gras alimentaires. Il a été démontré que le célastrol, un triterpène, exerce des effets anti-obésité chez les rongeurs. Nous avons évalué le rôle du célastrol dans la modulation de la perception orosensorielle des lipides chez des souris obèses témoins et chez des souris obèses soumises à un régime riche en graisses (HFD). Méthodes : Des souris mâles de la souche C57B/6J ont été nourries avec un régime riche en graisses (HFD) pendant 11 semaines, puis ont reçu ou non du célastrol pendant 4 semaines supplémentaires. Leur poids corporel a été enregistré chaque semaine. Avant le sacrifice, les animaux ont été soumis à une détection orosensorielle d'un acide gras à longue chaîne alimentaire selon un modèle de choix de deux bouteilles. Après le sacrifice, les papilles gustatives fongiformes ont été isolées et analysées pour déterminer l'expression de l'ARNm codant pour les capteurs de graisse (CD36 et GPR120) et les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$ ). Les concentrations circulantes d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  ont également été déterminées, et le foie a été utilisé pour analyser l'expression de l'ARNm des gènes lipogènes. Résultats : L'administration de Célastrol à des souris obèses a diminué le poids corporel et rétabli la perte de perception orosensorielle d'un acide gras alimentaire. Ce phénomène était en partie dû à la régulation positive de l'ARNm codant pour les récepteurs du goût des graisses (CD36 et GPR120) dans les cellules des papilles gustatives de la langue. De plus, Célastrol a diminué l'inflammation des papilles gustatives et de la circulation sanguine. Conclusions : Nos résultats suggèrent que Célastrol diminue la prise de poids, améliore la perception gustative des lipides et régule négativement l'inflammation chez les souris obèses.

**Mots-clés :** goût des graisses ; terpénoïde ; gustation ; CD36 ; GPR120 ; inflammation ; foie ; régime riche en graisses.

**ملخص** ترتبط السمنة بتغير إدراك الأحماض الدهنية الغذائية. وقد ثبت أن سيلاسترول، وهو تربينيربين، يُمارس تأثيرات مضادة للسمنة لدى القوارض. وقد قِيمنا دور سيلاسترول في تعديل الإدراك الحسي الفموي للدهون لدى الفئران البدينة، سواء كانت فئراناً عادية أو فئراناً سميئة ناتجة نظاماً غذائياً عالي الدهون لمدة 11 أسبوعاً، ثم أعطيت C57B/6J عن نظام غذائي عالي الدهون. الطريقة: أُطعمت فئران ذكور من سلالة سيلاسترول أو لم تُعط لمدة 4 أسابيع أخرى. وسُجّل وزن الجسم أسبوعياً. وقبل التضحية، خضعت الحيوانات للكشف الحسي الفموي عن حمض ، الذي يُشَفّر mRNA دهني غذائي طويل السلسلة في نموذج اختبار زجاجتين. بعد التضحية، عُزلت براعم التذوق الفطرية وُخّلت لتحليل تعبير TNF- $\alpha$  و IL-6 كما حُدّدت تركيزات (IL-1 $\beta$  و IL-6 و TNF- $\alpha$ ) والسيتوكينات المُحفّزة للالتهابات (CD36 و GPR120) مُستشعرات الدهون للحيوانات المُؤدّة للدهون. النتائج: أدّى إعطاء سيلاسترول للفئران السميئة إلى انخفاض mRNA في الدورة الدموية، واستُخدم الكبد لتحليل تعبير ، الذي يُشَفّر مُستقبلات mRNA وزن الجسم، كما أعاد فقدان الإدراك الحسي الفموي للأحماض الدهنية الغذائية، ويُعزى هذا جزئياً إلى زيادة تنظيم في خلايا براعم التذوق باللسان. علاوة على ذلك، قلّ سيلاسترول من الالتهاب في كلّ من براعم التذوق (CD36 و GPR120) تذوق الدهون والدورة الدموية. الاستنتاجات: تُشير نتائجنا إلى أن سيلاسترول يُقلّل من زيادة وزن الجسم، ويُحسّن الإدراك التذوقي للدهون، ويُخفّض الالتهاب لدى الفئران السميئة.

**الكلمات المفتاحية:** طعم الدهون، تربينويد، حاسة التذوق، التهاب، الكبد، نظام غذائي غني بالدهون.

CD36, GPR120



# Celastrol modulates calcium signaling in mouse taste bud cells and gustatory preference for a dietary fatty acid in the mouse

Manal Benmouna<sup>a,b</sup>, Chahid Benammar<sup>b</sup>, Amira Sayed Khan<sup>a</sup>, Aziz Hichami<sup>a</sup>,  
Naim A. Khan<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Physiologie de Nutrition & Toxicologie (NUTox), UMR UB/INSERM 1231 Center for Cellular & Translational Molecular Medicine (CTM), Université Bourgogne Europe, Dijon-21000, France

<sup>b</sup>Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA), Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen - 13000, Algeria



## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 13 January 2025

Received in revised form

11 June 2025

Accepted 2 July 2025

Available online 7 July 2025

Handling Editor: C. Forest

### Keywords:

Fat taste

Terpenoid

Fatty acid

Lipids

## ABSTRACT

Celastrol, a terpenoid, has been shown to exert several beneficial properties in health and disease, particularly in obesity. Recent studies have demonstrated that orosensory detection of dietary fatty acids plays an important role in the pathogenesis of obesity. In the present report, we have studied the role of celastrol in the modulation of calcium signaling in Fluo-4/AM loaded mouse taste bud cells (mTBC) and fat taste perception in the mouse. Celastrol was found to induce increases in free intracellular calcium concentrations,  $[Ca^{2+}]_i$ , in mTBC. Celastrol seems to exert its action via bile acid TGR5 (Takeda-G-protein-receptor-5) receptor. Furthermore, U-73122, a phospholipase C (PLC) inhibitor, significantly curtailed celastrol-induced calcium signaling, suggesting that this agent triggers an increase from endoplasmic reticulum via inositol-tris-phosphate ( $IP_3$ ) production. Celastrol-recruited  $Ca^{2+}$  from intracellular pool that triggered the opening of TRPC3 channels. We further employed thapsigargin (TG), known to trigger an increase in  $[Ca^{2+}]_i$ . Celastrol shared the TG-recruited  $Ca^{2+}$  pool. Celastrol was observed to share linoleic acid-triggered  $Ca^{2+}$  signaling in these cells. In two-bottle choice paradigm, celastrol increased the gustatory preference for linoleic acid. Our study might be helpful for considering the synthesis of celastrol analogues as fat taste modifiers with a potential in the management of obesity.

© 2025 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

## 1. Introduction

Celastrol, a triterpene, is a natural compound, extracted from the medicinal plants such as, *Tripterygium wilfordii* [1] and *Celastrol orbiculatus* [2], which grow in Asian countries. Celastrol has been used in traditional oriental medicine as a natural remedy to treat inflammation-related diseases [3,4]. This triterpenoid has attracted considerable interest in recent years for its strong and, in some unique cases, anticancer [5], neuroprotective [6], and anti-rheumatoid arthritic properties [7]. Besides, celastrol has been shown to exert anti-obesity effects via several targets, including interleukin-1 receptor-1 (IL1-R1), tyrosine phosphatase (PTP) 1B,

and T-cell PTP in the hypothalamus [8,9]. It has been demonstrated that IL1-R1-deficient mice are resistant to celastrol-induced leptin sensitization and anti-obesity effects, which means that celastrol increases the expression of IL1-R1 and regulates pro-inflammatory signaling pathway in the obese [8]. However, not much is known on the mechanism of action of celastrol.

There are five basic well-characterized taste qualities [10]. However, in the last decade, there has been compelling evidence accumulating on the possibilities of 6th taste quality, i.e., the taste for fat [11]. The gustatory fat perception involves CD36 and GPR120 receptors in human beings [11–13]. A number of clinical and experimental studies have stressed on the relationship between fat taste perception and obesity [10,11]. In mouse model of obesity, a decreased fat taste perception is associated with downregulation of tongue CD36, a fat taste receptor, in taste bud cells [14]. Several clinical studies suggest that people with low sensitivity to fat taste fat might consume more fat-rich foods,

\* Corresponding author. Physiologie de la Nutrition & Toxicologie, UMR U1231 INSERM/Université de Bourgogne/Agro-Sup, 6, boulevard Gabriel, Dijon 21000, France

E-mail address: [naim.khan@u-bourgogne.fr](mailto:naim.khan@u-bourgogne.fr) (N.A. Khan).

potentially leading to high caloric intake and weight gain. Indeed, some obese subjects with CD36 SNP, responsible for its decreased function, exhibit low orogustatory detection of dietary fatty acids, like linoleic or oleic acid [15–17].

As far as receptor-coupled mechanisms are concerned, the activation of CD36 and GPR120 is associated with the phosphorylation of phospholipase- $\beta$ II (PLC- $\beta$ II) that, in turn, hydrolyses phosphatidyl-inositol biphosphate (PIP<sub>2</sub>), thus releasing diacylglycerol and inositol-tris-phosphate, IP<sub>3</sub> [13]. The IP<sub>3</sub>-triggered increase in free intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, is one of the early events, involved in gustatory perception of dietary fatty acids [18]. Interestingly, the increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in TBC has been used to assess the action of taste modifiers [19,20]. Hence, it is possible that celastrol, being an anti-obesity agent, might act as a fat taste modifier. Therefore, in the present study, we assessed the action of celastrol on calcium signaling in mouse taste bud cells, and also ascertained its action on the modulation of gustatory perception of a dietary fatty acid in behavioral experiments.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Celastrol was purchased from Ficher Scientific (France). Fluo-4/AM was from Life Technologies (France). RPMI-1640 medium and L-glutamine were bought from Dutsher (France). Trypsin-EDTA was purchased from Gibco (USA). The phospholipase C (PLC) inhibitor (U-73122), YM-58483 and the TGR5 inhibitor (SBI-115) were purchased from Biotechne (France). The 96-well black plates with glass bottoms, ibi Treated, for calcium signaling were purchased from Clinical Science (France). The standard A03 rodent diet was procured from Scientific Animal Food and Engineering, Villemoisson-sur-Orge, France. All other chemicals including linoleic acid and xanthan gum were purchased from Merck (France).

Two-month-old male mice of C57B/6J genetic background were purchased from Janvier Elevage (Le Genest-St-Isle, France). Mice were housed in the animal husbandry at a constant temperature of 22 ± 2 °C, with a relative humidity of 50 ± 20 %, and a 12-h light/dark cycle. The animals were maintained on A03 laboratory diet and water *ad libitum*. The protocol (n° 16198) was approved by the Regional Ethical Committee (Bourgogne) for the experiments conducted on mice. The animal experiments followed the European guidelines on the protection of animals. The mice were sacrificed by using 2 % isoflurane gas.

### 2.2. Mouse taste bud cells from fungiform papillae

We have developed a mouse taste bud cell line after the purification of TBC from fungiform papillae. Hence, initially the fungiform TBC were isolated as per our previously described method [18]. Briefly, the enzymes (elastase and dispase mixture, 2 mg/ml each, in Tyrode buffer: 120 mM, NaCl; 5 mM, KCl; 10 mM, HEPES; 1 mM, CaCl<sub>2</sub>; 1 mM, MgCl<sub>2</sub>; 10 mM, Glucose; 10 mM, Napyruvate, pH 7.4) were employed to peel off tongue epithelium that was further treated with EDTA (2 mM), elastase (1.2 mg/ml), type I-collagenase (0.6 mg/ml), and trypsin inhibitor (0.6 mg/ml) to dissociate TBC. The supernatant, containing released cells, was used to isolate TBC by centrifugation at 20 000g×10min. The isolated cells were transfected by mouse-*tert* retrovirus, and these cells exhibited all the functional characteristics of a type II taste receptor cell. The phenotype of the immortalized mouse TBC closely resembled to taste-responding type II TBCs. The immortalized mouse TBCs expressed the bitter, sweet, umami and fat taste receptors and responded to the agonists of these taste

qualities. The results on the development and characterization of these cells have been presented in a symposium [21]. According to the Budapest Treaty, we have protected the intellectual property by depositing their description with materials and methods as an “Enveloppe Soleau” to the INPI (*Institut National de la Propriété Industrielle, Paris*), file no. DSO2021002050, dated February 04, 2021. Two specimen samples of these cells have been deposited to the Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, Paris under file no. 3907 5.2006, dated February 05, 2020. At present, these TBC cells belong to the start-up, Ektah ([ektah.com](http://ektah.com)).

### 2.3. Measurements of calcium signaling

The increases in free intracellular calcium concentrations, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, were determined as described by Dramane et al. [22]. Briefly, mTBC were seeded onto 96-well plates and after 24 h of culture and washing, the cells were incubated with 100 μM Fluo-4/AM and RPMI medium, for 45 min at 37 °C prior to the experimentation in loading buffer containing: 110 mM, NaCl; 5.5 mM, KCl; 25 mM, NaHCO<sub>3</sub>; 0.8 mM, MgCl<sub>2</sub>; 0.4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.33 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 20 mM, HEPES; 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub>, at pH 7.4. The concentrations of intracellular free calcium, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, were measured by the Synergy HTX equipment (Biotex, USA) at excitation and emission spectra, respectively, λ<sub>ex</sub> = 485 nm and λ<sub>em</sub> = 528 nm, in the real-time mode and analyzed using Gen 53.11 software. For experiments conducted in the absence of external calcium (0 % Ca<sup>2+</sup>), CaCl<sub>2</sub> was replaced by 2 mM EGTA in the buffer. All test molecules were added in small volumes in continuous recordings at the time-point indicated by the arrows.

### 2.4. Two-bottle preference test

A two-bottle paradigm test was used for behavioral studies according to previously published procedure [22]. Briefly, male mice were divided into test and control groups (n = 05 each) and placed individually in plastic cages with cover filters. The mice were deprived of water for 6h. After that, each animal was offered with two bottles containing either the test or control solution for a period of 12h. Bottles were weighed before and after each experiment, and the difference between two weighing values was noted as intake over a period of 12h.

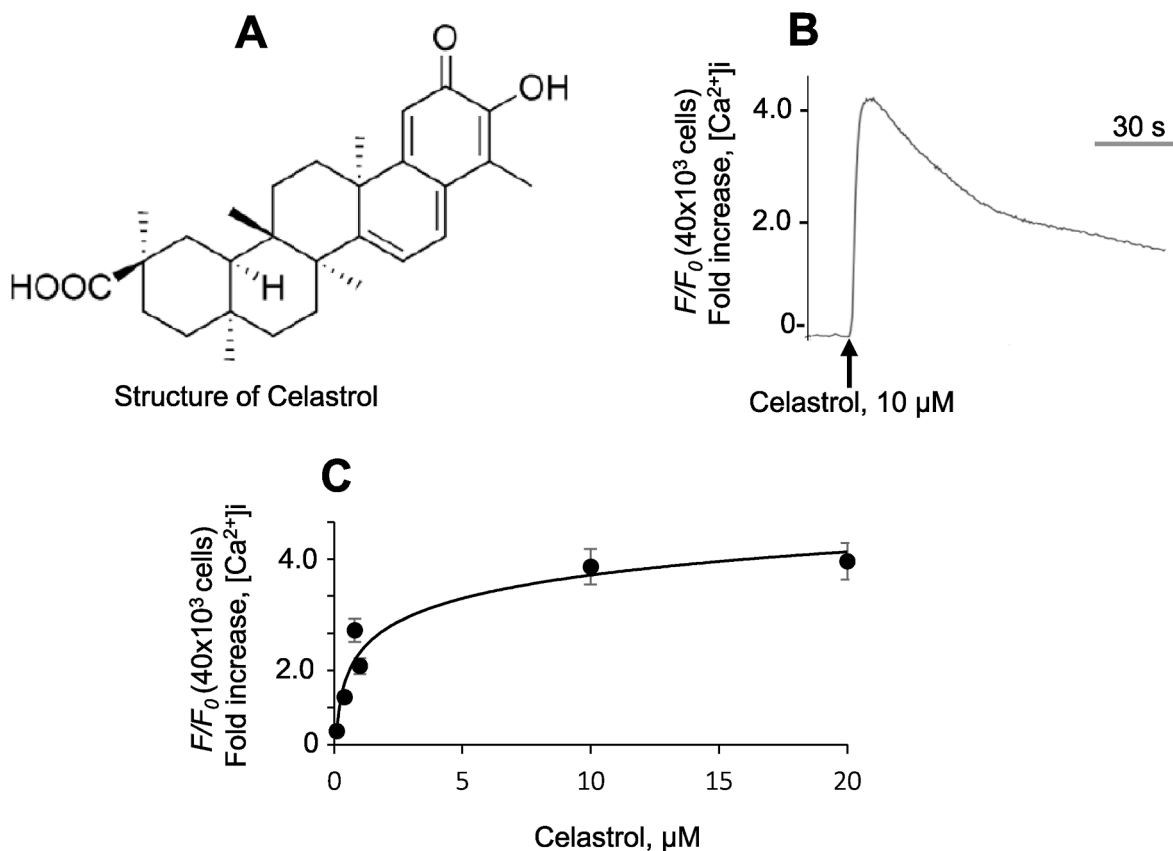
### 2.5. Statistical analysis

Results are shown as mean ± standard error of mean (SEM) for a given number of experiments (n). Data were analyzed by using Statistical 4.1 version (Stat soft, Tulsa, OK, USA). The significance of differences between mean values was determined by two-tailed student t-test. Differences with p < 0.05 were considered to be significant.

## 3. Results

### 3.1. Celastrol induces an increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in mouse taste bud cells (mTBC)

Fig. 1A shows the structure of celastrol which is a pentacyclic triterpenoid, i.e., 24, 25, 26-trinoroleana-1,3,5,7-tetraen-29-oicacid, bearing an Oxo substituent at position 2, a hydroxy substituent at position 3, and 2 methyl groups at positions 9 and 13. In mTBC, celastrol induced a sharp increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, followed by a decrease as a function of time (Fig. 1B). Celastrol-induced increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> is a dose-dependent phenomena with an EC<sub>50</sub> = 1 μM (Fig. 1C).



**Fig. 1.** Effects of celastrol on  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in mouse taste bud cells (mTBC). The cultured mTBC ( $40 \times 10^3$  cells/assay) were loaded with Fluo-4/AM, and the changes in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  were monitored as described in Materials and Methods. **A** shows the chemical structure of celastrol. The experiments were performed in  $\text{Ca}^{2+}$  containing buffer (**B**, **C**). A plateau response is observed at a concentration of 20  $\mu\text{M}$  by addition of celastrol to mTBC (**C**). Arrowhead indicates the time of addition of celastrol without interruption in the recording. The trace shows the identical image (**B**), reproduced independently ( $n = 5$ ).

### 3.2. Celastrol recruits $\text{Ca}^{2+}$ via TGR5 receptor, coupled to PLC activation

The natural triterpenoids have been found to act on TGR5 (Takeda G protein-coupled receptor 5), which is, in fact, a G-protein-coupled plasma membrane receptor for bile acids [16]. The TGR5 receptors have been expressed in a number of organs like liver, intestine, pancreas, adipose tissues and muscles [22]. Our laboratory has demonstrated that the TGR5 mRNA are also expressed by human and mouse taste bud cells [23]. We have proposed that taste bud TGR5 may be the target of taste modifiers such as Zizyphin, a triterpene [24].

To assess whether celastrol, being a terpenoid, acts via TGR5 receptor, we employed a TGR5 antagonist, i.e., SB-115. We observed that this inhibitor significantly blocked celastrol-induced increases in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in mTBC (Fig. 2A and D). Furthermore, we used a phospholipase C inhibitor, U-12273, which also decreased significantly the action of celastrol on the increases in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in mTBC (Fig. 2B–E). In 0 %  $\text{Ca}^{2+}$  buffer, both SB-115 and U-73122 completely abolished the increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in mTBC (Fig. 2D, E).

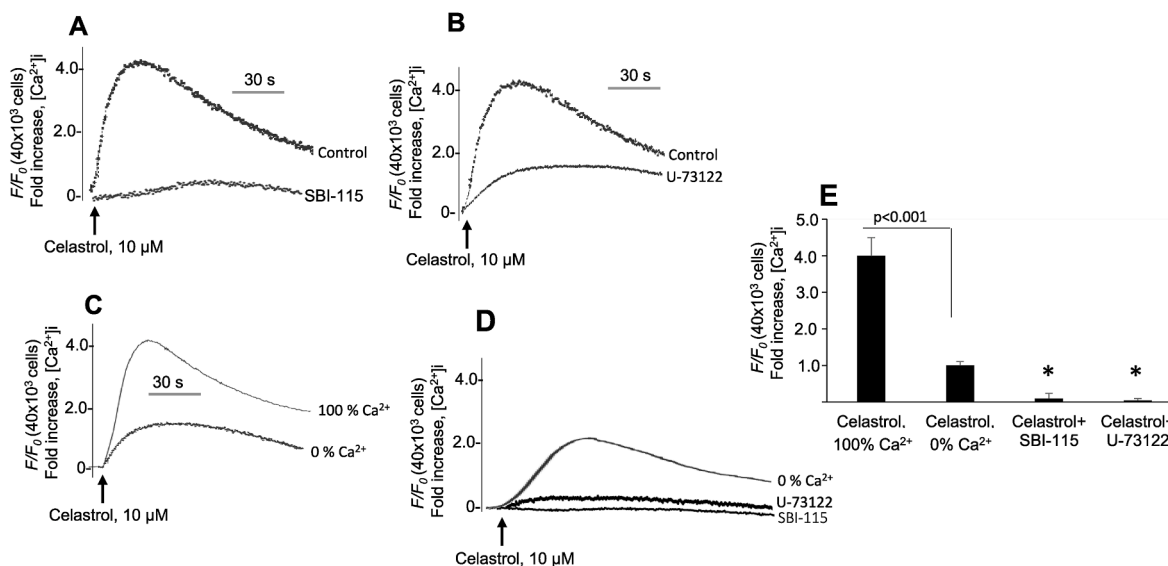
### 3.3. Celastrol recruits $\text{Ca}^{2+}$ from intracellular pool, followed by the opening of TRPC3 channels

We further conducted experiments in  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium and observed that the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  in the extracellular medium resulted in a decreased response of celastrol (Fig. 2C–E). In order to further probe the nature of  $\text{Ca}^{2+}$  recruitment, we employed

thapsigargin and ionomycin.

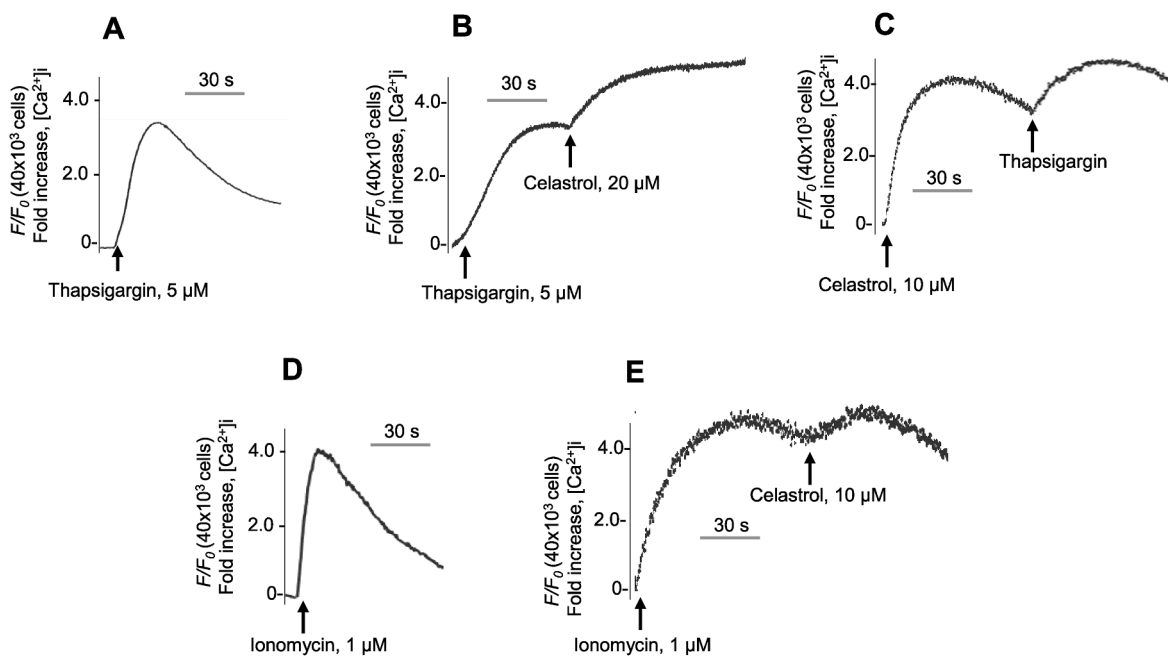
Thapsigargin (TG), an inhibitor of sarcoplasmic-endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, SERCA [25], triggered an increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in mTBC (Fig. 3A and 4). In a continuous recording mode, we also added thapsigargin before or after celastrol. We observed that the addition of “one after another” resulted into curtailed, but not suppressed, response of the respective agent (Fig. 3B and C and Fig. 4). Furthermore, we employed ionomycin that is, at 1  $\mu\text{M}$ , known to open store-operated calcium (SOC) channels [26]. Ionomycin induced a rise in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in mTBC (Fig. 3D and 4). Interestingly, the addition of celastrol after ionomycin resulted into celastrol-induced decreased  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in mTBC (Figs. 3E and 4).

In order to assess the implication of  $\text{Ca}^{2+}$  channels, called store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  (SOC) channels (Fig. 4), we employed two SOC inhibitors, i.e., YM-58483 and econazole [18]. We observed that the SOC inhibitors decreased significantly the increases in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , induced by celastrol. We have previously shown mTBC express TRPC3, but not TRPC6, channels, and SOC influx in mTBC is brought about by  $\text{Ca}^{2+}$  channels composed of Orai1/TRPC3 [27]. Hence, we employed, Pyr3 and Pyr10 which are the TRPC3 inhibitors. We observed that the two TRPC3 channel blockers significantly decreased the increases in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in taste bud cells (Fig. 5A). In order to further elucidate whether TRPC3 channels are SOC channels, we employed  $\text{SrCl}_2$  ( $\text{Sr}^{2+}$ ) that is known to enter cells via TRPC channels.  $\text{Sr}^{2+}$  entry has been measured in medium in which  $\text{Ca}^{2+}$ -containing medium is replaced with that containing  $\text{Sr}^{2+}$  [28]. He et al. [29], while working on HEK293 cells - expressing



**Fig. 2.** Effects of celastrol and pharmacological agents on the increases in  $[Ca^{2+}]_i$  in mouse taste bud cells (mTBC). The changes in  $[Ca^{2+}]_i$  are shown in response to celastrol after preincubation for 15 min with either SBI-115 (TGR5 antagonist) at 100  $\mu$ M (A) or U-73122 (PLC antagonist) at 10  $\mu$ M (B). The experiments were also performed in 100%  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}$ -containing) or 0%  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}$ -free) media (C). Arrowheads indicate the time of addition of celastrol. D shows the response of celastrol in 0%  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}$ -free) medium. The mTBC were preincubated or not with SBI-115 (40  $\mu$ g/ $\mu$ l) or U-73122 (10  $\mu$ M) for 15 min before starting  $Ca^{2+}$  recordings (A, B, D). The traces show the identical images, reproduced independently.

E shows the values as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ), derived from experiments performed in A–C. The two-tailed  $t$ -test was used for the statistical calculations. The asterisks show the significant values ( $p < 0.001$ ) as compared to celastrol.

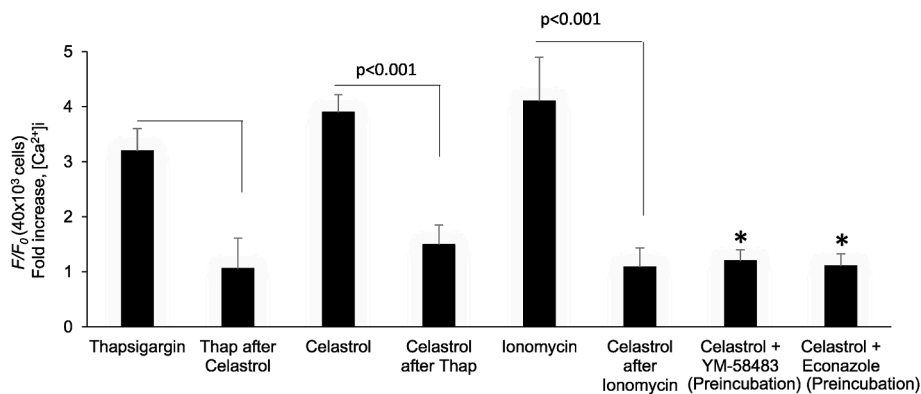


**Fig. 3.** Effects of thapsigargin (TG), ionomycin and celastrol on  $Ca^{2+}$  signaling in mouse taste bud cells (mTBC). The changes in  $[Ca^{2+}]_i$  were monitored as in Fig. 1 and described in Materials and Methods. Increases in  $[Ca^{2+}]_i$  are shown in response to TG at 5  $\mu$ M (A). In B and C, TG (5  $\mu$ M) and celastrol were added one after another. D shows the changes in  $[Ca^{2+}]_i$  in response to ionomycin, whereas E shows changes in  $[Ca^{2+}]_i$ , induced by the addition of ionomycin, followed by the addition of celastrol (E). The traces show the identical images, reproduced independently.

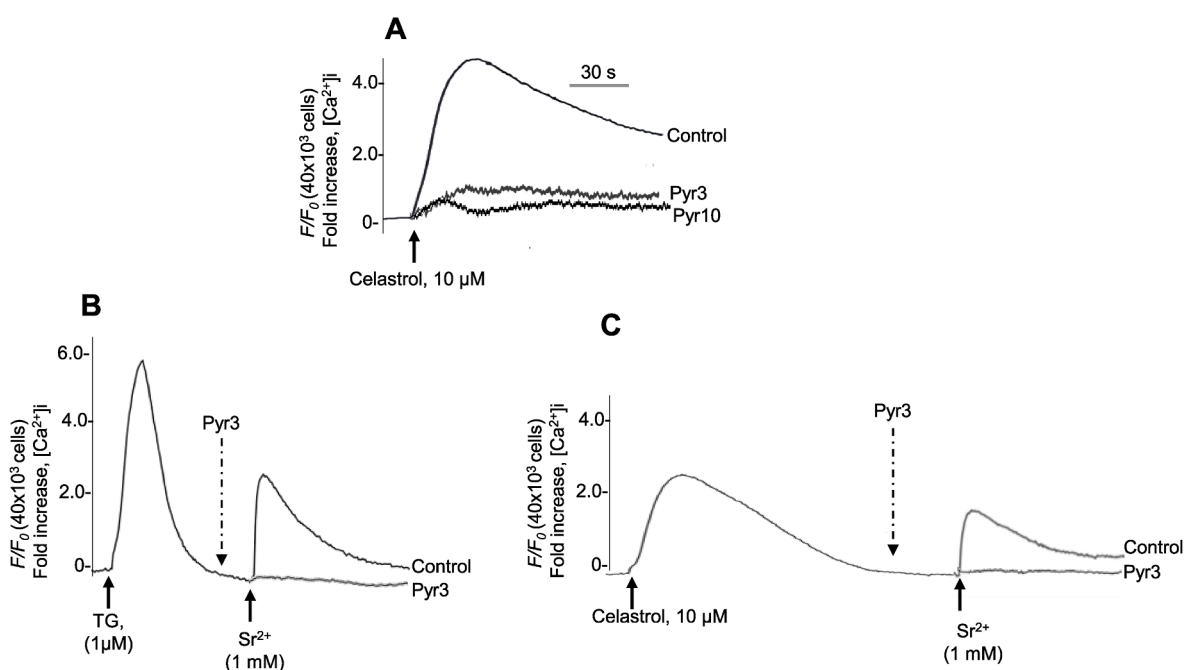
TRPC3 channels, demonstrated that TRPC3 channels selectively mediate  $Sr^{2+}$  entry that was blocked by BTP2, a SOC channel blocker. Hence, thapsigargin and celastrol both triggered  $Sr^{2+}$  entry via TRPC3 channels after store-depletion in  $Ca^{2+}$ -free medium (Fig. 5 B, C), and as expected, Pyr3 further blocked TG- and celastrol-induced  $Sr^{2+}$  influx in mTBC.

#### 3.4. Celastrol shares the dietary fatty acid-induced $Ca^{2+}$ signaling

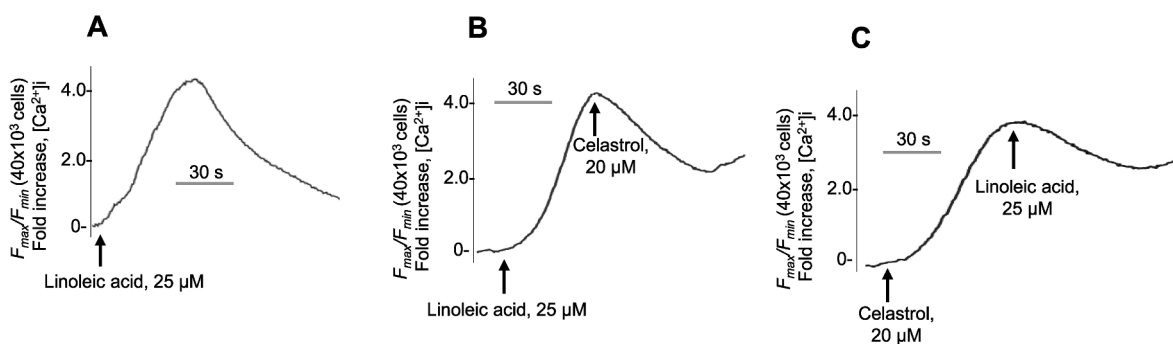
To determine whether celastrol interferes with  $Ca^{2+}$  signaling evoked by a dietary fatty acid, i.e., linoleic acid (LA), we added celastrol before and after LA in different experimental set-ups. LA induced a sustained increase in  $[Ca^{2+}]_i$  in mTBC (Fig. 6A). Interestingly, when LA was added during celastrol-induced sustained



**Fig. 4.** Effects of different agents on the increases in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in mTBC. The histograms on thapsigargin and ionomycin represent the experiments conducted in Fig. 3. Some experiments were also conducted on preincubation of mTBC with SOC channels blockers (YM-56483 at 1 μM and Econazole at 30 μM). The values as mean ± SEM (n = 5). The two-tailed *t*-test was used for the statistical calculations. The asterisks show the significant values (p < 0.001) as compared to celastrol alone.



**Fig. 5.** Implication of TRCP3 channel in celastrol-induced increases in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in mouse taste bud cells (mTBC). In **A**, the cells were preincubated with Pyr3 (20 μM) and Pyr 10 (1 μM) for 15 min and the Ca<sup>2+</sup> recordings started. In **B** & **C**, the experiments were performed in 0% Ca<sup>2+</sup> (Ca<sup>2+</sup>-free) medium. After the addition of TG or celastrol, Sr<sup>2+</sup> was added with or without pre-addition of Pyr3 at 20 μM (hatched arrow). The traces show the identical images, reproduced independently.



**Fig. 6.** Combined effects of celastrol and linoleic acid (LA) on the increases in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in mouse taste bud cells (mTBC). The changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> were monitored as described in Fig. 1 and Materials and Methods. Arrowheads indicate the time of addition of either celastrol or LA without interruption in the recording. The traces show the identical images, reproduced independently.

Ca<sup>2+</sup> response or vice versa, there was no additive increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (Fig. 6B and C), demonstrating that both the agents shares the same signaling cascade in mTBC.

### 3.5. Celastrol upregulates spontaneous preference for fat

In a two-bottle test, mice exhibited a spontaneous preference for a solution containing the LA (Fig. 7). Interestingly, the addition of celastrol to the solutions containing LA increased fatty acid intake (Fig. 7). There was no significant difference between the intake of celastrol and control solution, demonstrating that celastrol alone does not trigger a gustatory cue, though its presence in a solution containing a fatty acid upregulates the preference for the latter (Fig. 7).

## 4. Discussion

*Tripterygium wilfordii* is abundantly present in the East Asian region, throughout China to Korea and Japan [5]. This plant is used in Chinese medicine to treat a number of immunological disorders, including rheumatoid arthritis (RA), with promising results in a series of clinical trials [1]. The most abundant and promising bioactive compound derived from the root of this plant is celastrol, a tripterine, which possesses a broad range of biological activities including anti-obesity effects [17]. Celastrol has been found to exert its action by increasing IL-1R1 and other mediators like leptin and adiponectin [30,31]; however, not much is known on its plasma membrane receptor and its signaling cascade. In the present piece of investigation, we elucidated mechanism of action of this terpenoid in immortalized mouse taste bud cells (mTBC).

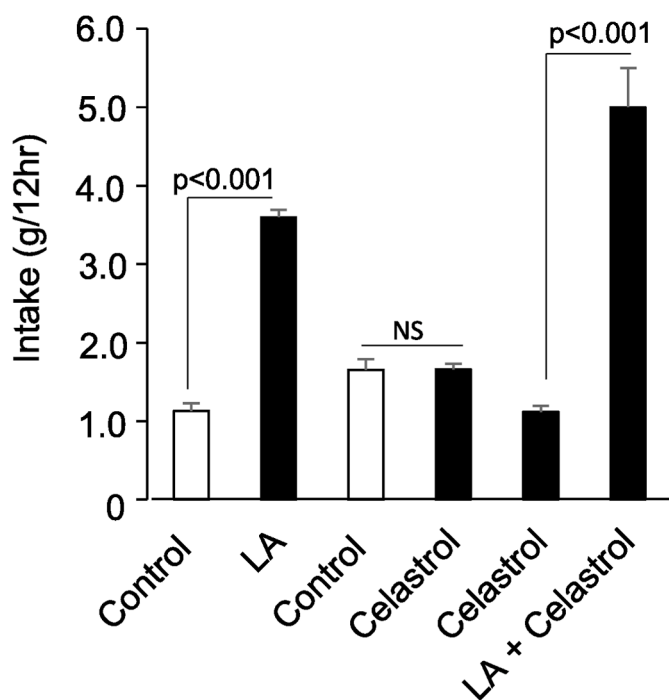
We observed that celastrol triggered a rapid increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in mTBC. We have previously demonstrated that the agents that

belong to terpenoids, like Zizyphin, exert their action via TGR5, the G-protein-coupled receptor (GPCR) for bile acids [24]. Indeed, celastrol shares structural homology with bile acids. Consequently, the TGR5 inhibitor blocked the celastrol-induced increases in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in mTBC. Being GPCR, the TGR5 is coupled to the hydrolysis of phosphatidyl-inositol-bis-phosphate (PIP<sub>2</sub>), catalyzed by phospholipase-C, thus releasing inositol-tris-phosphate (IP<sub>3</sub>). Interestingly, a PLC inhibitor significantly curtailed the action of celastrol on the increases in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, suggesting that celastrol exerts its action via PLC/IP<sub>3</sub> pathway in mTBC. According to capacitative model of Ca<sup>2+</sup> signaling, Ca<sup>2+</sup> release from the endoplasmic reticulum (ER) pool is followed by Ca<sup>2+</sup> influx to refill the ER pool via the opening of store-operated Ca<sup>2+</sup> (SOC) channels [14]. Hence, the experiments conducted in the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup> resulted into a drastic decrease in celastrol-induced increases in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in these cells, suggesting that this terpenoid mobilizes Ca<sup>2+</sup> from intracellular pool, followed by Ca<sup>2+</sup> influx. The implication of the opening Ca<sup>2+</sup> channels by celastrol is further confirmed by the experiments wherein we employed ionomycin at the concentration known to open plasma membrane SOC channels [26]. Hence, addition of celastrol after the ionomycin curtailed significantly the action of the former. In order to further probe the implication of extracellular Ca<sup>2+</sup> pool, we employed thapsigargin (TG) which, by blocking ER Ca<sup>2+</sup>-ATPase, depletes ER refilling from extracellular pool and, consequently, induces an increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> [14]. It is noteworthy that addition of TG before or after celastrol curtailed, but not suppressed completely, the action of one another, demonstrating that celastrol, indeed, also mobilizes the extracellular calcium, after the release of Ca<sup>2+</sup> from ER stores, according to the capacitive model of Ca<sup>2+</sup> homeostasis [14]. Furthermore, our study also demonstrates that Ca<sup>2+</sup> influx is brought about by the opening of SOC channels that are composed of, in part, by TRPC3 channels, in these gustatory cells. These observations are further confirmed on Sr<sup>2+</sup> entry in mTBC by thapsigargin and celastrol. There are a few studies on the action of celastrol on Ca<sup>2+</sup> signaling [32,33]. Hence, the study of Yoon et al. [32] is interesting that these authors demonstrated that celastrol increased mitochondrial Ca<sup>2+</sup> concentrations. These authors further postulated that celastrol-induced release of Ca<sup>2+</sup> from endoplasmic reticulum (ER) via IP<sub>3</sub>R might contribute to ER-derived vacuoles.

Our laboratory has clearly demonstrated that there is a gustatory cue of dietary fatty acids, which by binding to CD36, a fat sensor, in tongue taste bud cells, conveys the fat taste message to the brain [11]. Hence, we have shown that CD36 in taste buds is coupled to PLC-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling mechanism during gustatory perception of dietary long-chain fatty acids [20]. We were interested in elucidating whether celastrol interferes with linoleic acid (LA)-triggered Ca<sup>2+</sup> signaling in mTBC. As expected, linoleic acid induced an increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in these cells. However, addition of celastrol after LA resulted into celastrol-induced suppression of Ca<sup>2+</sup> signaling, suggesting that celastrol shares the fatty acid-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> release.

To shed light on the physiological relevance of Ca<sup>2+</sup> signaling “cross-talk” between LA and celastrol, we conducted two-bottle preference tests. We observed that mice exhibited spontaneous preference for LA over the control solution. Interestingly, the preference for LA solution was significantly increased when celastrol was added to LA-containing solution than the solution containing only LA. This observation suggests that celastrol is involved in the modulation of gustatory perception of dietary fatty acids. This implies that celastrol can act as an enhancer of fat taste and when added to fatty foods it may modulate fat-eating behaviour.

In this work, we have shown, for the first time, the modulation of fat taste perception by celastrol and the TGR5 as a target of



**Fig. 7.** The two-bottle preference tests. The gustatory preference test was performed in mice that were deprived of water for 6 h and then placed into cages with two bottles: Control (0.3 % Xanthan gum, w/v) and LA at 0.2 % in xanthan gum (w/v) or celastrol 20 μM alone or celastrol plus LA at 0.2 % in xanthan gum, w/v. All the solutions for these assays were prepared in vehicle xanthan gum (3 %, w/v). The values as mean ± SEM (n = 5). The two-tailed *t*-test was used for the statistical calculations.

celastrol in mouse taste bud cells. We suggest, in future, the synthesis of potent celastrol analogues and the investigation of their effects on fat taste perception. These “fat taste modifiers” can serve as novel agents for the treatment of obesity and related disorders. Indeed, our team has recently synthesized a number of linoleic acid analogues and two of them revealed to mimic “fat-like” taste in mice and, consequently, decreased body weight in obese animals [20].

### CRedit authorship contribution statement

**Manal Benmouna:** Methodology, Investigation. **Chahid Benammar:** Validation, Resources, Formal analysis. **Amira Sayed Khan:** Methodology, Investigation, Data curation. **Aziz Hichami:** Software, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Naim A. Khan:** Supervision, Project administration, Funding acquisition, Conceptualization.

### Institutional review board statement

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Regional Ethics Committee (Bourgoigne) of (protocol code n° 16198).” for studies involving animals.

### Declaration of competing interest

All of the authors have nothing to declare as far as the conflict of interest is concerned.

### Acknowledgements

We gratefully thank to the Ministry of External Affairs (France) that granted the PHC Tassili project, grant number 21MDU313.

### References

- [1] Y. Zhang, X. Mao, W. Li, W. Chen, X. Wang, Z. Ma, N. Lin, *Tripterygium wilfordii*: an inspiring resource for rheumatoid arthritis treatment, *Med. Res. Rev.* 41 (2021) 1337–1374.
- [2] C.W. Kim, R.E. Go, H.K. Lee, B.T. Kang, W.J. Cho, K.C. Choi, Anti-obesity effects of *Celastrus orbiculatus* extract containing celastrol on canine adipocytes, *Can. J. Vet. Res.* 85 (2021) 177–185.
- [3] G.F. Pinna, M. Fiorucci, J.M. Reimund, N. Taquet, Y. Arondel, C.D. Muller, Celastrol inhibits pro-inflammatory cytokine secretion in Crohn's disease biopsies, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322 (24) (2004) 778–786.
- [4] G.C. Lan, J. Zhang, W.B. Ye, F. Yang, A. Li, W.W. He, W. Zhang, Celastrol as a tool for the study of the biological events of metabolic diseases, *Sci. China. Chem.* 62 (2019) 409–416.
- [5] D. Kashyap, A. Sharma, H.S. Tuli, K. Sak, T. Mukherjee, A. Bishayee, Molecular targets of celastrol in cancer: recent trends and advancements, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 128 (2018) 70–81.
- [6] R. Cascão, J.E. Fonseca, L.F. Moita, Celastrol: a spectrum of treatment opportunities in chronic diseases, *Front. Med.* 4 (2017) 69.
- [7] V.K.W. Wong, C. Qiu, S.W. Xu, B.Y.K. Law, W. Zeng, H. Wang, F. Michelangeli, I. R.S.R. Dias, Y.Q. Qu, T.W. Chan, Y. Han, N. Zhang, S.W.F. Mok, X. Chen, L. Yu, H. Pan, S. Hamdoun, T. Efferth, W.J. Yu, W. Zhang, Z. Li, Y. Xie, R. Luo, Q. Jiang, L. Liu, Ca<sup>2+</sup> signalling plays a role in celastrol-mediated suppression of synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients and experimental arthritis in rats, *Br. J. Pharmacol.* 176 (2019) 2922–2944.
- [8] X. Feng, D. Guan, T. Auen, J.W. Choi, M.A. Salazar Hernández, J. Lee, H. Chun, F. Faruk, E. Kaplun, Z. Herbert, K.D. Copps, U. Ozcan, IL1R1 is required for celastrol's leptin-sensitization and antiobesity effects, *Nat. Med.* 25 (2019) 575–582.
- [9] E. Kyriakou, S. Schmidt, G.T. Dodd, K. Pfuhlmann, S.E. Simonds, D. Lenhart, A. Geerlof, S.C. Schriever, M. De Angelis, K.W. Schramm, O. Plettenburg, M. A. Cowley, T. Tiganis, M.H. Tschöp, P.T. Pfluger, M. Sattler, A.C. Messias, Celastrol promotes weight loss in diet-induced obesity by inhibiting the protein tyrosine phosphatases PTP1B and TCPTP in the hypothalamus, *J. Med. Chem.* 61 (2018) 11144–11157.
- [10] S.D. Roper, Encoding taste: from receptors to perception, *Handb. Exp. Pharmacol.* 275 (2022) 53–90.
- [11] P. Besnard, P. Passilly-Degrace, N.A. Khan, Taste of fat: a sixth taste modality? *Physiol. Rev.* 96 (2016) 151–176.
- [12] A.S. Khan, R. Keast, N.A. Khan, Preference for dietary fat: from detection to disease, *Prog. Lipid Res.* 78 (2020) 101032.
- [13] A. Hichami, A.S. Khan, N.A. Khan, Cellular and molecular mechanisms of fat taste perception, *Handb. Exp. Pharmacol.* 275 (2022) 247–270.
- [14] M.H. Ozdener, S. Subramaniam, S. Sundaresan, O. Sery, T. Hashimoto, Y. Asakawa, P. Besnard, N.A. Abumrad, N.A. Khan, CD36- and GPR120-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in human taste bud cells mediates differential responses to fatty acids and is altered in obese mice, *Gastroenterology* 146 (2014) 995–1005.
- [15] A. Sayed, O. Šerý, J. Plesník, H. Daoudi, A. Rouabah, L. Rouabah, N.A. Khan, CD36 AA genotype is associated with decreased lipid taste perception in young obese, but not lean, children, *Int. J. Obes.* 39 (2015) 920–924.
- [16] I. Karmous, J. Plesník, A.S. Khan, O. Šerý, A. Abid, A. Mankai, A. Aouidet, N. A. Khan, Orosensory detection of bitter in fat-taster healthy and obese participants: genetic polymorphism of CD36 and TAS2R38, *Clin. Nutr.* 37 (2018) 313–320.
- [17] J. Plesník, O. Šerý, A.S. Khan, P. Bielick, N.A. Khan, The rs1527483, but not rs3212018, CD36 polymorphism associates with linoleic acid detection and obesity in Czech young adults, *Br. J. Nutr.* 119 (2018) 472–478.
- [18] A. El-Yassimi, A. Hichami, P. Besnard, N.A. Khan, Linoleic acid induces calcium signaling, Src kinase phosphorylation, and neurotransmitter release in mouse CD36-positive gustatory cells, *J. Biol. Chem.* 283 (19) (2008) 12949–12959.
- [19] A.Y. Huang, S.Y. Wu, The effect of imiquimod on taste bud calcium transients and transmitter secretion, *Br. J. Pharmacol.* 173 (21) (2016) 3121–3133.
- [20] A.S. Khan, A. Hichami, B. Murtaza, M.L. Louillat-Habermeyer, C. Ramseyer, M. Azadi, S. Yesylevskyy, F. Mangin, F. Lirussi, J. Leemput, J.F. Merlin, A. Schmitt, M. Suliman, J. Bayardon, S. Semnanian, S. Jugé, N.A. Khan, Novel fat taste receptor agonists curtail progressive weight gain in obese male mice, *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 15 (2023) 633–663.
- [21] A. Hichami, A. Dumont, M. Rialland, J. Leemput, N.A. Khan, Immortalization of mouse fungiform and circumvallate taste bud cells: physiological characterization, *Proc. Physiol. Soc.* 41 (2019) 14–16.
- [22] A. Perino, H. Demagny, L. Velazquez-Villegas, et al., Molecular physiology of bile acid signaling in health, disease, and aging, *Physiol. Rev.* 101 (2021) 683–731.
- [23] A. Bensalem, B. Murtaza, A. Hichami, A.S. Khan, H. Oulamara, G. Merlen, M. Berrichi, A.N. Agli, T. Tordjmann, N.A. Khan, Bile acid receptor TGR5 is critically involved in preference for dietary lipids and obesity, *J. Nutr. Biochem.* 76 (2020) 108298.
- [24] B. Murtaza, M. Berrichi, C. Benammar, T. Tordjmann, F.Z. Djeziri, A. Hichami, J. Leemput, M. Belarbi, H. Ozdener, N.A. Khan, Zizyphin modulates calcium signalling in human taste bud cells and fat taste perception in the mouse, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 31 (2017) 486–494.
- [25] M.N. Uddin, D.W. Thomas, SERCA modulators reveal distinct signaling and functional roles of T lymphocyte Ca<sup>2+</sup> stores, *Int. J. Mol. Sci.* 25 (22) (2024) 12095.
- [26] H. Yoshida, C. Hirono, C. Shimamoto, E. Daikoku, T. Kubota, M. Sugita, Y. Shiba, T. Nakahari, Membrane potential modulation of ionomycin-stimulated Ca(2+) entry via Ca (2+)/H (+) exchange and SOC in rat submandibular acinar cells, *J. Physiol. Sci.* 60 (5) (2010) 363–371.
- [27] B. Murtaza, A. Hichami, A.S. Khan, J. Plesník, O. Sery, A. Dietrich, L. Birnbaumer, N.A. Khan, Implication of TRPC3 channel in gustatory perception of dietary lipids, *Acta, Physiologist* 231 (2) (2021) e13554.
- [28] H.T. Ma, R.L. Patterson, D.B. van Rossum, L. Birnbaumer, K. Mikoshiba, D. L. Gill, Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels, *Science* 287 (2000) 1647–1651.
- [29] L.P. He, T. Hewavitharana, J. Soboloff, M.A. Spassova, D.L. Gill, A functional link between store-operated and TRPC channels revealed by the 3,5-bis(trifluoromethyl)pyrazole derivative, BTP2, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 10997–11006.
- [30] L. Ye, Y. Gao, X. Li, X. Liang, Y. Yang, R. Zhang, Celastrol attenuates HFD-induced obesity and improves metabolic function independent of adiponectin signaling, *Arch. Physiol. Biochem.* 29 (2023) 1–7.
- [31] Y. Zhao, K. Miettinen, S.C. Kampranis, Celastrol: a century-long journey from the isolation to the biotechnological production and the development of an antiobesity drug, *Curr. Opin. Plant Biol.* 81 (2024) 102615.
- [32] X. Yuan, B. Tang, Y. Chen, L. Zhou, J. Deng, L. Han, Y. Zhai, Y. Zhou, D.L. Gill, C. Lu, Y. Wang, Celastrol inhibits store operated calcium entry and suppresses psoriasis, *Front. Pharmacol.* 14 (2023) 1111798.
- [33] M.J. Yoon, A.R. Lee, S.A. Jeong, Y.S. Kim, J.Y. Kim, Y.J. Kwon, K.S. Choi, Release of Ca<sup>2+</sup> from the endoplasmic reticulum and its subsequent influx into mitochondria trigger celastrol-induced paraptosis in cancer cells, *Oncotarget* 5 (2014) 6816–6831.

## Abstract

Celastrol, a terpenoid, has been shown to exert several beneficial properties in health and disease, particularly in obesity. Recent studies have demonstrated that orosensory detection of dietary fatty acids plays an important role in the pathogenesis of obesity. In the present report, we have studied the role of celastrol in the modulation of calcium signaling in Fluo-4/AM loaded mouse taste bud cells (mTBC) and fat taste perception in the mouse. Celastrol was found to induce increases in free intracellular calcium concentrations,  $[Ca^{2+}]_i$ , in mTBC. Celastrol seems to exert its action via bile acid TGR5 (Takeda-G-protein-receptor-5) receptor. Furthermore, U-73122, a phospholipase C (PLC) inhibitor, significantly curtailed celastrol-induced calcium signaling, suggesting that this agent triggers an increase from endoplasmic reticulum via inositol-tris-phosphate (IP3) production. Celastrol recruited  $Ca^{2+}$  both from intra and extra-cellular pool. We further employed thapsigargin (TG), known to trigger an increase in  $[Ca^{2+}]_i$ . Celastrol shared the TG-recruited  $Ca^{2+}$  pool. Celastrol was observed to share linoleic acid-triggered  $Ca^{2+}$  signaling in these cells. In two-bottle choice paradigm, celastrol increased the gustatory preference for linoleic acid. Our study might be helpful for considering the synthesis of celastrol analogues as fat taste modifiers with a potential in the management of obesity.

**Key words:** Triterpenes, fat, lipid, gustation.

## Résumé

Le célastrol, un terpénoïde, possède plusieurs propriétés bénéfiques pour la santé et la maladie, notamment l'obésité. Des études récentes ont démontré que la détection orosensorielle des acides gras alimentaires joue un rôle important dans la pathogenèse de l'obésité. Dans ce rapport, nous avons étudié le rôle du célastrol dans la modulation de la signalisation calcique dans les cellules des papilles gustatives de souris (mTBC) chargées en Fluo-4/AM et dans la perception du goût des graisses chez la souris. Il a été démontré que le célastrol induisait une augmentation des concentrations de calcium intracellulaire libre,  $[Ca^{2+}]_i$ , dans les mTBC. Le célastrol semble exercer son action via le récepteur TGR5 (récepteur de la protéine G de Takeda) des acides biliaries. De plus, l'U-73122, un inhibiteur de la phospholipase C (PLC), a significativement réduit la signalisation calcique induite par le célastrol, suggérant que cet agent déclenche une augmentation du réticulum endoplasmique via la production d'inositol-tris-phosphate (IP3). Le célastrol a recruté du  $Ca^{2+}$  à la fois dans le pool intra et extracellulaire. Nous avons également utilisé la thapsigargine (TG), connue pour déclencher une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$ . Le célastrol partageait le pool de  $Ca^{2+}$  recruté par la TG. Il a été observé que le célastrol partageait la signalisation calcique déclenchée par l'acide linoléique dans ces cellules. Dans le paradigme du choix de deux bouteilles, le célastrol a augmenté la préférence gustative pour l'acide linoléique. Notre étude pourrait être utile pour envisager la synthèse d'analogues du célastrol comme modificateurs du goût des matières grasses, avec un potentiel dans la prise en charge de l'obésité.

**Mots clés :** Triterpènes, graisse, lipide, gustation.

## ملخص

أظهرت مادة سيلاسترول، وهي مادة تربينية، خصائص مفيدة عديدة في الصحة والمرض، وخاصة في علاج السمنة. وقد أظهرت دراسات حديثة أن الكشف الحسي القموي عن الأحماض الدهنية الغذائية يلعب دورًا هامًا في التسبب بالسمنة. في هذا التقرير، درسنا دور سيلاسترول في تعديل إشارات لدى الفئران، وفي إدراك طعم الدهون لديها. وقد وجد أن سيلاسترول يُحفز Fluo-4/AM المحملة بـ (mTBC) الكالسيوم في خلايا براعم التذوق TGR5، في خلايا براعم التذوق. ويبدو أن سيلاسترول يُمارس تأثيره من خلال مستقبل  $[Ca^{2+}]_i$  زيادة تركيزات الكالسيوم الحر داخل الخلايا، بشكل ملحوظ (PLC)، وهو مثبط لفوسفوليبيز سي U-73122 مستقبل بروتين تاكيدا جي-5) للأحماض الصفراوية. علاوة على ذلك، قلص إشارات الكالسيوم المُحفزة بالسيلاسترول، مما يشير إلى أن هذا العامل يُحفز زيادة في الشبكة الإندوبلازمية عبر إنتاج إينوزيتول-تريس-فوسفات، المعروف بقدرته على تحفيز زيادة أيون (TG) استقدم السيلاسترول أيون الكالسيوم من داخل وخارج الخلايا. كما استخدمنا ثابسيجارجين (IP3) شارك السيلاسترول في مجموعة الكالسيوم المُحفزة بالثيران الثلاثية. ولوحظ أن السيلاسترول يشارك في إشارات الكالسيوم  $[Ca^{2+}]_i$  الكالسيوم المُحفزة بحمض اللينوليك في هذه الخلايا. في نموذج اختيار الزجاجتين، زاد السيلاسترول من تفضيل الذوق لحمض اللينوليك. قد تكون دراستنا مفيدة للنظر في تصنيع نظائر السيلاسترول كمعدلات طعم الدهون، مع إمكانية استخدامها في إدارة السمنة.

**الكلمات المفتاحية:** التربيينات الثلاثية، الدهون، الدهنيات، التذوق