



HAL
open science

Les astrocytes et la détection hypothalamique du glucose : rôle métabolique et implication des connexines astrocytaires

Camille Allard

► **To cite this version:**

Camille Allard. Les astrocytes et la détection hypothalamique du glucose : rôle métabolique et implication des connexines astrocytaires. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2012. Français. NNT : 2012DIJOS097 . tel-00935261

HAL Id: tel-00935261

<https://theses.hal.science/tel-00935261v1>

Submitted on 23 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



ÉCOLE DOCTORALE
PRES | Bourgogne | Franche-Comté
Environnements - Santé

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

UFR Sciences de la Vie et de la Terre

THESE

**Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne**

Discipline : Sciences de la vie (Physiologie et Neurobiologie)

par **Camille ALLARD**

Le vendredi 30 novembre 2012

**Les astrocytes et la détection hypothalamique du glucose :
rôle métabolique et implication des connexines astrocytaires**

Directrice de thèse : **Pr Corinne LELOUP**

Jury

Pr Michel NARCE, président

Dr Christian GIAUME, rapporteur

Pr Luc PELLERIN, rapporteur

Pr Christophe MAGNAN, examinateur

Dr Claude KNAUF, examinateur

Pr Corinne LELOUP, directrice de thèse

Dans la précipitation de la remise du manuscrit, alors que la fatigue d'écrire se fait sentir, je n'ai pas voulu « bacler » ces remerciements ; c'est pourquoi je les écris seulement maintenant, après ma soutenance. J'aimerai remercier toutes les personnes qui ont rendu possible la présentation de ce travail, après quatre années passées entre Toulouse et Dijon.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui ont pris la peine de venir m'écouter après m'avoir lue. Merci donc à Messieurs Christian Giaume, Claude Knauf, Christophe Magnan, Luc Pellerin et enfin Michel Narce, qui m'a fait l'honneur d'être le président du jury. L'émotion de la soutenance m'en a fait oublier de vous remercier publiquement au début de mon exposé ! Veuillez donc recevoir les remerciements et les excuses d'une étourdie.

J'aimerai adresser un grand merci à Luc (et Louis Casteilla avant lui) pour m'avoir accueillie dans son laboratoire depuis le M1. Merci pour vos conseils avisés, votre aide à la rédaction, votre bonne humeur... et parfois pour votre patience devant mon naturel à m'emporter ! Vos moux et dodelinements de la tête lors de nos discussions sont devenues cultes, mais avec le temps, on apprend que ce n'est (heureusement) pas toujours synonyme de désapprobation. J'espère que j'ai été à la hauteur de votre confiance pendant ces cinq années. Je voudrais aussi rajouter : vive les limougeauds !

Merci infiniment à Corinne, ma « maman » du labo (je sens que cette expression va rester !). Tu as toujours été à l'écoute et aux petits soins pour tes étudiants, pour les accompagner sur le chemin escarpé vers « l'indépendance » scientifique . Ton optimisme et ton entrain m'ont été d'une grande aide dans les moments où j'y croyais moins (« mais pourquoi mes western ne fonctionnent jamais alors que pour Lionel, lui, ça marche toujours ? », « mes rats perfusés ont encore mangés leurs cathéters dans la nuit... », « mais c'est complètement l'inverse de ce qu'on pensait ! »). J'ai beaucoup appris à tes côtés, tant au niveau scientifique que diplomatique. Je reste admirative de tes idées et de ton travail (de chercheuse comme d'enseignante), qui a notamment contribué à renforcer mon envie de devenir enseignant-chercheur. J'espère qu'on continuera longtemps à échanger ensemble.

Je remercie aussi chaleureusement Lionel, qui m'a appris presque toutes les techniques que je maîtrise aujourd'hui. Depuis que je t'ai rencontré, tu n'as cessé de m'impressionner par ta capacité de travail et de réflexion. Merci de m'avoir tant appris... et aussi de m'avoir laissé faire mes propres erreurs 😊. J'ai beaucoup aimé travailler avec toi, et ton départ pour le pays du chocolat a laissé un grand vide dans le bureau. Je te souhaite le meilleur dans la vie, tant au labo qu'à l'extérieur (oui, parce qu'il y a aussi autre chose à faire le weekend que de peser des rats !).

Tant qu'on est sur les gars du Sud, je voudrais remercier Xavier Fioramonti (malgré tout ce qu'il m'a fait subir... ;-)). C'est vrai que tu m'embêtes, mais on s'ennuierait si tu n'étais pas là ! J'ai découvert quelqu'un de presque aussi pointilleux que moi pour les manip et la propreté, ça fait plaisir ☺. Tu as apporté un nouveau dynamisme à l'équipe et je te remercie sincèrement d'avoir accepté (et d'avoir eu la patience) de m'apprendre le clamp. J'associe Stéphanie à ces remerciements pour les charmantes soirées et aprem' passées dans votre campagne de Mirebeau.

J'aimerai aussi remercier Géraldine Offer, de Toulouse, une technicienne au grand cœur, pipelette comme pas deux. Tu m'as fait découvrir mes premières manip en M1 (la joie des cultures et des PCR), j'ai adoré travailler et discuter avec toi. Ta bonne humeur était communicative. J'ai également eu la chance d'avoir l'aide de Sylvie Grall, technicienne de Dijon cette fois. Peu de doctorants ont l'opportunité d'avoir autant de soutien sur les manip. Merci beaucoup Sylvie pour les centaines de western-blots que tu as fait sur ma thèse, tu m'as fait gagner un temps fou. Je tiens aussi à remercier Claire et Fawzia, qui m'ont aussi consacré un peu de leur temps pour m'assister sur le clamp et la stéréotaxie. Je remercie Yue et Hélène, les étudiantes que j'ai encadrées et qui m'ont aidée dans mon travail.

Merci à Debhia qui a rendu possible que j'assiste à plusieurs heures de TP de biologie animale. Pour moi qui aimerait associer l'enseignement à la recherche, j'ai vraiment apprécié pouvoir me confronter à ce domaine. Je remercie aussi Aleth et Micheline, dont j'étais la « seconde », qui ont toujours été très disponibles. Je voudrais aussi remercier M. Elchinger, mon prof de physio de licence, qui m'a fait découvrir avec passion l'homéostasie énergétique et sa régulation nerveuse. C'est un peu grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui.

Que serait la thèse sans les copains de galère ? Je ne sais tout simplement pas comment j'aurais fait sans vous ! Partager les joies et les coups durs, ça a vraiment été un plaisir et c'est passé trop vite. Alexandra, que dire (pour reprendre ton expression ☺) ? Tu parlais fort et beaucoup, mais tu savais aussi écouter mes gérémiades et me conforter... et qu'est-ce que tu nous faisais rire, avec le Brenachot ! Merci pour tous ces bons moments ! Je te souhaite une vie toulousaine heureuse avec toute ta future petite famille. Outre Lionel, l'équipe avait aussi son deuxième doctorant, Xavier B., alias la petite Morula. Merci pour tes talents (ré)créatifs, avec notamment l'édition (et la récente publication) du Camillothon, pour m'avoir toujours fait « subir », avec Alexandra, vos délires acoustiques et cinématographiques (« Ca, c'est vraiment... »), le film de mon pourrissage de bureau et enfin celui pour la thèse d'Alex (très fort, pour arriver à prendre les virages, avec le masque de Luc ! ☺). Merci aux autres collègues de bureau de nous avoir supporté pendant tout ce temps : Imad, Caroline et Brandon. Je

voudrais remercier les « petites nouvelles » qui prennent maintenant nos places : Lucie, Chloé, je ne doute pas que vous aurez autant de bons moments que nous en avons eu ici, et que vos thèses seront de belles réussites. Vous avez tout pour : le sérieux... et la déconnade ☺ ! Merci aussi à tous les copains du Centre : Carole, Coralie, Syrina, Coralie, Aude-Reine, Cédric, Michel, Rachel, Ornella, Sébastien, et ceux que j'oublie... pour avoir rendu si agréable ces trois ans et demi.

Je tiens à remercier tout particulièrement ma famille : mes parents, mon frère, ma sœur et mes grands-parents, pour leur soutien à tous les niveaux. Vous m'avez toujours entourée quand je faisais mon petit bonhomme de chemin, en m'encourageant quand j'étais un peu perdue. Merci pour avoir été là, merci mille fois ! Et enfin, je terminerai ces longs remerciements avec David. Je te suis tellement reconnaissante pour être à mes côtés depuis toutes ces années. Je sais que vivre à Dijon n'a pas été facile pour toi. Et voilà une nouvelle aventure ensemble qui s'annonce aux Etats-Unis !!! Je te le redis encore : pas besoin de faire de longues études pour être exceptionnel. Merci d'être là, merci d'être toi. Je t'...

Résumé

L'hypothalamus est fortement impliqué dans la régulation nerveuse de l'homéostasie énergétique. Il existe dans cette structure des neurones spécialisés (gluco-sensibles) qui détectent notamment l'hyperglycémie puis déclenchent des réponses adaptées comme le maintien de la glycémie, en stimulant la sécrétion d'insuline ou encore le rassasiement. Les astrocytes sont suspectés de participer à la détection neuronale du glucose. Dans l'ensemble du cerveau, il existe un couplage métabolique entre astrocytes et neurones. Le lactate, issu de la métabolisation du glucose par les astrocytes, est transporté par les neurones par des transporteurs aux monocarboxylates (MCTs). De plus, il a récemment été montré que les jonctions gap (GJ), à l'origine de la formation de réseaux au sein des astrocytes sont indispensables au passage du glucose de la circulation sanguine vers les neurones en activité. Ces GJ astrocytaires sont formées majoritairement de connexines 43 et 30 (Cxs).

Mon travail de thèse s'est orienté suivant deux axes, qui ont visé à étudier le rôle des astrocytes dans la détection hypothalamique du glucose et du lactate. Dans un premier temps, nous avons montré que le lactate, comme le glucose, est détecté au niveau central et induit une sécrétion d'insuline. Dans un modèle de rat hyperglycémique pendant 48h (qui présente aussi une hyperlactatémie), nous avons montré que la détection du glucose et du lactate est altérée. Ces modifications ne sont pas dues à une variation de l'expression protéique des MCTs astrocytaires ou neuronale de l'hypothalamus.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés au rôle des Cxs astrocytaires. La Cx43 est très exprimée autour des micro-vaisseaux sanguins de l'hypothalamus médio-basal (MBH), un site présentant de nombreux neurones gluco-sensibles. L'expression de la Cx30 est plus diffuse dans cette structure. Nous montrons également que l'expression protéique des Cxs astrocytaires varie très rapidement suite à des modifications du statut métabolique (jeûne, réalimentation, hyperglycémie). Afin d'évaluer l'implication de la Cx43 astrocytaire (majoritaire) dans la détection hypothalamique du glucose, nous avons inhibé son expression dans le MBH, *in vivo*, en injectant des siRNA permettant d'inhiber la synthèse de cette protéine. L'inhibition de la Cx43 (30% à 72h) induit une diminution de la prise alimentaire sans modification du poids, de la glycémie et de l'insulinémie comparée aux témoins. Suite à l'injection carotidienne de glucose (censée mimer une hyperglycémie), la sécrétion d'insuline est fortement inhibée chez les animaux siCx43. De même, l'effet satiétogène du glucose semble inhibé chez ces animaux lors de la réalimentation après un jeûne.

Ces résultats montrent pour la première fois, de façon intégrée, l'importance des connexines, et probablement des réseaux astrocytaires, lors de la détection hypothalamique du glucose. Ces nouvelles données renforcent l'importance du rôle métabolique des astrocytes lors de fonctions neuronales précises.

Mots clé : Homéostasie énergétique, Détection hypothalamique du glucose et du lactate, Astrocytes, Connexines 30 et 43, Transporteurs aux Monocarboxylates (MCTs).

Abstract

The hypothalamus plays a pivotal role in the nervous control of glucose homeostasis. This area contains gluco-sensitive neurons. Some of them detect increases in glucose levels and regulate glucose homeostasis by stimulating insulin secretion or inhibiting food intake. It is widely accepted that astrocytes are metabolically coupled to neurons. Lactate, resulting from the metabolism of glucose by astrocytes, is transported *via* the monocarboxylate transporters (MCTs). In addition, gap junctions (GJ), that form networks within astrocytes, are essential to transfer glucose from the bloodstream to the active neurons. These astroglial GJ mainly consist of connexins 43 and 30 (Cxs).

The aims of my thesis are twofold: first, to show that an intracarotid lactate injection toward the brain, as for glucose, triggers insulin secretion and, second, to investigate the role of astroglial Cxs.

Our results demonstrate that lactate and glucose sensing are altered in 48h hyperglycemic rats (accompanied by high blood lactate level). These alterations are not due to changes in protein expression of astroglial or neuronal MCTs in the hypothalamus. We then show that Cx43 is highly expressed in astrocytic end-feet enwrapping blood vessels, in medio-basal hypothalamus (MBH) where many gluco-sensitive neurons are present. The Cx30 expression is more diffuse in this structure. We also show that the protein expression of astroglial Cxs varies very rapidly due to changes in metabolic status (fasting, refeeding and hyperglycemia). To evaluate the involvement of astroglial Cx43 (the major isoform) in the hypothalamic glucose sensing, we silenced its expression in the MBH *in vivo* by injecting specific siRNA. A 30% diminution in protein levels (after 72h) induced a decrease in food intake without changes in weight, blood glucose and insulin levels compared to vehicle treated animals. The central response to glucose is drastically inhibited in terms of insulin secretion in siCx43 animals. Similarly, an intracarotid injection of glucose towards the brain does not reduce refeeding in siRNA treated animals.

These results demonstrate for the first time *in vivo*, the importance of connexins and astroglial networks in hypothalamic glucose sensing mechanism. These new data reinforce the importance of the metabolic role of astrocytes in specific neuronal functions.

Keywords : Energy homeostasis, Hypothalamic glucose sensing, Astrocytes, Connexins 30 et 43, Monocarboxylate Transporters (MCTs).

Sommaire

RESUME	6
ABSTRACT	7
SOMMAIRE	8
LISTE DES ABREVIATIONS	10
LISTE DES FIGURES	11
PREAMBULE	13
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	15
I. REGULATION NERVEUSE DE L’HOMEOSTASIE ENERGETIQUE.....	15
A. <i>Le Système Nerveux Central : centre d’intégration</i>	15
B. <i>Régulation du métabolisme par le Système Nerveux Central</i>	27
C. <i>Signaux permettant le maintien de l’homéostasie énergétique</i>	35
II. LE GLUCOSE DANS LE CONTROLE DE L’HOMEOSTASIE ENERGETIQUE.....	42
A. <i>Détection extra-hypothalamique du glucose</i>	42
B. <i>Détection hypothalamique du glucose</i>	48
III. LES ASTROCYTES, PARTENAIRES DE LA DETECTION DU GLUCOSE.....	60
A. <i>Les astrocytes : à l’interface entre sang circulant et neurones</i>	60
B. <i>Le couplage métabolique astrocyte-neurone</i>	62
C. <i>Les réseaux astrocytaires</i>	69
OBJECTIF DU TRAVAIL ET APPROCHES EXPERIMENTALES	80
PARTIE I : LA DETECTION HYPOTHALAMIQUE DU GLUCOSE DANS UN MODELE PHYSIOPATHOLOGIQUE : IMPLICATION DU LACTATE ET DE SON TRANSFERT PAR LES MCTS ?	82
PARTIE II : ROLE DES CONNEXINES ASTROCYTAIRES DANS LA DETECTION DU GLUCOSE.....	89
I. MATERIELS ET METHODES.....	89
A. <i>Animaux</i>	89
B. <i>Conditions métaboliques</i>	89
C. <i>Stéréotaxie et injection de siRNA</i>	90
D. <i>Injection intracarotidienne de glucose vers le cerveau</i>	90
E. <i>Test de réalimentation</i>	91
F. <i>Immunohistochimie</i>	91
G. <i>Western blot</i>	91
H. <i>Analyses biochimiques</i>	92
I. <i>Statistiques</i>	92
II. RESULTATS.....	93
A. <i>Expression des connexines astrocytaires Cx43 et Cx30 dans le MBH</i>	93
B. <i>Effet du statut métabolique sur l’expression des connexines</i>	95
C. <i>Implication de la Cx43 dans la détection hypothalamique du glucose</i>	97
III. DISCUSSION.....	105

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	111
PRESENTATIONS	115
PARTICIPATION A DES TRAVAUX DE RECHERCHE.....	116
BIBLIOGRAPHIE.....	129

Liste des abréviations

2-DOG : 2-deoxy-glucose	IRS : <i>Insulin Receptor Substrate</i>
3V : Troisième ventricule	LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
5-HT : Sérotonine	LH : Hypothalamus Latéral
α -MSH : <i>α-Melanocyte Stimulating Hormon</i>	MBH : Hypothalamus Médio-Basal
AA : Acide Arachidonique	MCH : <i>Melanin Concentrating Hormone</i>
ACC : Acétyl-CoA Carboxylase	MCx-R : Récepteur aux mélanocortines x
ACS : AcylCoA Synthase	ME : Éminence médiane
ACTH : <i>AdrenoCorticoTropic Hormon</i>	mEAOs : Espèces Actives de l'Oxygène d'origine mitochondriale
AGL : Acides Gras Libres	mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
AgRP : <i>Agouti Related Peptide</i>	NA : Noyau Arqué
AMPK : <i>Adenosine MonoPhosphaste Activated Kinase</i>	Nac : Noyau Accumbens
AP : <i>Area Postrema</i>	NO : Monoxyde d'azote
ATP : Adénosine TriPhosphaste	NPY : Neuropeptide Y
BDNF : <i>Brain Derived Neurotrophic factor</i>	NTS : Noyau du Tractus Solitaire
BHE : Barrière Hémato-Encéphalique	PA : Prise Alimentaire
CART : <i>Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript</i>	PDK : Pyruvate Deshydrogénase
Cx : Connexine	PEPCK : Phosphoénolpyruvate Carboxy-kinase
CCK : Cholécystokinine	PFK : Phospho-fructose Kinase
CNTF : <i>Ciliary Neurotrophic Factor</i>	Pfkfb3 : 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-biphosphaye 3
CRH : <i>Corticotropin Releasing Hormone</i>	PGE2 : Prostaglandine E2
DMN : Noyau Dorso-Médian	PI3K : Phosphatidylinositide 3 Kinase
DMNV : Noyau Dorsal Moteur du nerf vague	PLA2 : Phospholipase A2
FAS : <i>Fatty Acid Synthase</i>	PLC : Phospholipase C
GABA : Gamma-aminobutyrique	PKA : Protéine Kinase A
GCs : Glucocorticoïdes	PKC : Protéine Kinase C
GE : Gluco-excité	POMC : Pro-Opio Mélano Cortine
GFAP : <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>	PPAR : <i>Peroxisome Proliferator-Activating Receptor</i>
GI : Gluco-inhibé	PVN : Noyau Paraventriculaire
GJ : <i>Gap Junctions</i> – Jonction communicante	SF1 : <i>Steroidinergic Factor 1</i>
GJC : Communication par les <i>Gap Junctions</i>	SGLT : <i>Sodium-Glucose Transport Protein</i>
GK : Glucokinase	SNA : Système Nerveux Autonome
GLAST : <i>Glutamate-Aspartate Transporter</i>	SNE : Système Neuroendocrinien
GLP1 : <i>Glucagon Like Peptide 1</i>	SNC : Système Nerveux Central
GLT : <i>Glutamate Transporter</i>	TA : Tissu Adipeux
GLUT : Transporteurs de glucose	TC : Tronc cérébral
GS : Gluco-sensible	TG : Triglycérides
HCx : Héli canaux	TRH : <i>Thyreotropin Releasing Hormone</i>
HGE : <i>High Glucose Excited</i>	TSH : <i>Thyroid Stimulating Hormone</i>
HGI : <i>High Glucose Inhibited</i>	UCP : <i>Uncoupling Protein</i>
HHS : Hypothalamo-hypophyso-surrénalien	VIP : Peptide intestinal vasoactif
ICV : Intra-Cerebro-Ventriculaire	VMH/VMN : Hypothalamus Ventro-Médian
IP : Intra-Péritonéal	VTA : Aire Tegmentale Ventrale
IP3 : Inositol tri-Phosphate	

Liste des figures

Figure 1 : Notion d'homéostasie énergétique	13
Figure 2 : Vue tridimensionnelle de l'hypothalamus de rat.....	16
Figure 3 : Projections neuronales des différents noyaux hypothalamiques.....	17
Figure 4 : Le système des mélanocortines dans le NA.....	21
Figure 5 : Schéma récapitulatif des circuits neuronaux impliqués lors de la détection hypothalamique des nutriments	24
Figure 6 : Organisation du complexe vagal dorsal.....	25
Figure 7 : Régulation autonome des organes clés impliqués dans le métabolisme	28
Figure 8 : Innervation autonome du pancréas et du foie.....	30
Figure 9 : Le système hypothalamo-hypophysaire	31
Figure 10 : La thermogenèse induite par le SNA et les hormones thyroïdiennes.....	32
Figure 11 : L'axe hypothalamo-surrénalien	33
Figure 12 : Représentation schématique du métabolisme cellulaire des lipides ainsi que leur implication dans la régulation nerveuse du métabolisme énergétique.....	39
Figure 13 : Schéma représentant la sécrétion d'insuline par la cellule β pancréatique en réponse à une augmentation de la glycémie.....	43
Figure 14 : Les cellules L de l'intestin sont sensibles au glucose.....	44
Figure 15 : Le système hépato-portal	45
Figure 16 : Localisation du tronc cérébral et de l'organe subfornical (SFO) sur une coupe sagittale de cerveau de rat (L=-0,1mm).....	47
Figure 17 : Effet du glucose hypothalamique sur les astrocytes	50
Figure 18 : Représentation schématique de l'activation électrique des quatre sous types neuronaux du NA en réponse à une variation de glucose	51
Figure 19 : Sécrétion d'insuline, <i>in vivo</i> , en réponse à un bolus carotidien de glucose, vers le cerveau.....	54
Figure 20 : Schéma illustrant les événements mitochondriaux conduisant à la production de mEAOs.....	56
Figure 21 : Les tanycytes en bordure du 3V.....	59
Figure 22 : Les astrocytes protoplasmiques sont organisés en micro-domaines.....	61
Figure 23 : Le passage du glucose au niveau de la BHE.....	62
Figure 24 : La métabolisation du glucose.....	63
Figure 25 : Le couplage métabolique entre astrocytes et neurones, lors de l'activation neuronale	65
Figure 26 : Représentation schématique de la modulation du couplage métabolique entre astrocytes et neurones.....	67
Figure 27 : Représentation schématique des voies principales par lesquelles les astrocytes régulent le flux sanguin cérébral.....	68
Figure 28 : Image en microscopie électronique de jonction communicante	69
Figure 29 : Représentation schématique d'une jonction communicante.....	70
Figure 30 : Représentation schématique d'une connexine et configuration du connexon	71

Figure 31 : Cycle de vie de la connexine 43.....	72
Figure 32 : Les vagues calciques.....	76
Figure 33 : Les vagues métaboliques.....	77
Figure 34 : La fourniture énergétique par les réseaux astrocytaires permet le maintien de l'activité synaptique en l'absence de glucose exogène.	78
Figure 35 : Les connexines astrocytaires sont exprimées dans l'hypothalamus	93
Figure 36 : Les connexines astrocytaires présentent une répartition différente au sein du MBH.....	94
Figure 37 : Expression des connexines astrocytaires après un jeûne (20h) et une réalimentation (4h).....	95
Figure 38 : Expression des connexines astrocytaires après une hyperglycémie.....	96
Figure 39 : Suivi de l'inhibition des connexines astrocytaires suite à l'injection de siRNA.....	97
Figure 40 : Inhibition représentative de l'expression de la Cx43 après injection des siCx43 dans le MBH.	98
Figure 41 : Suivi du poids et de la prise alimentaire après l'injection des siRNA.....	99
Figure 42 : Expression des transporteurs de glucose et de lactate 72h après l'injection de siRNA.	100
Figure 43 : Glycémie et Insulinémie à 72h après l'injection des siRNA.....	101
Figure 44 : Diminution de la sensibilité au glucose du MBH 72h après l'injection de siCx43.	102
Figure 45 : Suivi de la prise alimentaire suite à l'injection de glucose vers le cerveau lors d'un test de réalimentation chez le rat préalablement mis à jeun.....	103
Figure 46 : Expression des connexines astrocytaires chez des animaux siRNA après un jeûne de 20h et une réalimentation de 4h.	104
Figure 47 : Schéma de conclusion	110
Figure 48 : Hypothèses sur l'effet de l'hyperglycémie sur le métabolisme astrocytaire	112

Préambule

A la fin du XIX^{ème} siècle, deux grands physiologistes, Claude Bernard et Walter Cannon, décrivent pour la première fois la notion d'« **homéostasie** » comme la capacité de l'organisme à maintenir une stabilité relative de son milieu interne, malgré des fluctuations constantes de l'environnement. Un grand nombre de facteurs, tels que la température corporelle ou les battements cardiaques, sont relativement constants afin d'assurer le bon fonctionnement de l'organisme. L'homéostasie est le résultat de nombreux systèmes de régulation qui présentent les caractéristiques fondamentales suivantes : l'éloignement d'un facteur donné de sa valeur physiologique de référence est détecté par des récepteurs/ « *senseurs* » qui vont informer un centre de régulation. Ce dernier va ensuite acheminer une réponse adaptée vers un effecteur, qui dans un second temps, va agir pour permettre le retour à la valeur de référence.

Le maintien du poids corporel est le reflet de l'**homéostasie énergétique**. Au cours de la vie, les apports et dépenses énergétiques sont variables ; pourtant, dans des conditions physiologiques, le poids corporel reste relativement stable. Le retour à une valeur de référence (« pondérostasie ») est possible grâce à un ensemble de mécanismes qui assurent un équilibre dynamique entre les apports et les dépenses d'énergie (Figure 1). Cette notion peut être assimilée à une balance.



Figure 1 : Notion d'homéostasie énergétique

L'homéostasie énergétique résulte d'un équilibre entre les apports d'énergie par la prise alimentaire et les dépenses d'énergie représentées par le métabolisme de base et celui lié à l'activité physique, et la thermogénèse. Le maintien de cet équilibre permet la conservation d'un poids stable au cours de la vie de l'individu.

Lors d'un déséquilibre énergétique, un ensemble de régulations se met en place pour rétablir l'équilibre énergétique. Dans le cadre plus précis de l'homéostasie glucidique, suite à un repas, l'élévation de la glycémie induit une sécrétion d'insuline par le pancréas pour permettre l'utilisation du glucose par les muscles et le tissu adipeux, ainsi qu'un stockage du glucose dans le foie. Ces réactions permettent le retour rapide de la glycémie à sa valeur basale.

Pour permettre la préservation de l'homéostasie énergétique, il est nécessaire que tous les acteurs du métabolisme échangent des informations de diverses natures (humorales ou nerveuses) de façon à coordonner les actions permettant le maintien du statut énergétique. Cette communication fait intervenir plusieurs grands systèmes : les **Systèmes Nerveux Central (SNC)** et **Neuroendocrinien (SNE)**, le système nerveux entérique et le système endocrinien.

Le glucose est la première source d'énergie de l'organisme. L'implication du SNC dans la régulation de l'homéostasie glucidique en particulier a été démontrée dans les années 1950 par Jean Mayer qui énonça la théorie « glucostatique » (Mayer, 1953). Cette théorie reposait sur l'existence de « gluco-récepteurs », sensibles aux variations de glycémie, qui modulent en conséquence la prise alimentaire (PA). Dans la décennie suivante, Anand et Oomura démontrèrent l'existence de neurones sensibles au glucose (Anand et al., 1964; Oomura et al., 1969). Le SNC est en effet capable d'analyser des signaux de différentes natures : **nerveux**, *via* de nombreuses afférences en provenance de la périphérie ; et **circulants**, tels que des facteurs métaboliques ou hormonaux, comme le glucose ou l'insuline. L'intégration de cette multitude de signaux aboutit à une réponse adaptée, en modulant la PA et les voies anaboliques ou cataboliques selon les besoins. C'est donc un dialogue complexe qui s'établit entre les différents acteurs du métabolisme.

Le dialogue entre SNC et périphérie peut se dégrader et entraîner des **déséquilibres homéostatiques** qui conduisent à des pathologies. Ainsi, on constate au sein des sociétés modernes, une augmentation accrue de cas d'obésité et de diabète de type II. Plusieurs facteurs peuvent expliquer l'explosion de la prévalence de ces pathologies. Un déséquilibre énergétique « positif » résultant d'un excédent des apports (quantité d'aliments ingérés) associé à une diminution importante de l'activité physique est favorable à la prise de poids. De plus, nous avons hérité de mécanismes ancestraux de régulation qui tendent à sauvegarder les réserves d'énergie qui permettait, dans d'autres situations, de survivre en cas de famine (Berthoud, 2007). A cela, s'ajoute le stress dont les effets sur le système hormonal, par exemple, ne sont pas négligeables.

Devant ce problème de santé publique grandissant, il devient primordial de mieux comprendre le rôle des acteurs de l'homéostasie énergétique. Ceci afin de mieux appréhender les défauts qui se développent lors des pathologies métaboliques pour mieux les prévenir et les traiter.

Revue bibliographique

1. Régulation nerveuse de l'homéostasie énergétique

De nombreuses structures cérébrales entrent en jeu dans la régulation nerveuse du métabolisme. Parmi celles-ci, l'hypothalamus et le tronc cérébral (TC) sont les mieux étudiés.

A. Le Système Nerveux Central : centre d'intégration

1. L'hypothalamus

C'est au cours de la première moitié du XX^{ème} siècle que des expériences de lésions électrolytiques de l'hypothalamus ont mis en avant deux zones entraînant des activités métaboliques opposées (Hetherington and Ranson, 1940; Anand and Brobeck, 1951). La destruction de l'hypothalamus ventro-médian (VMH) est accompagnée d'une hyperphagie, ce qui lui a valu le nom de « centre de la satiété ». La lésion de l'hypothalamus latéral (LH) entraîne l'inanition et la perte de poids, caractéristiques qui l'ont conduit à être nommée « centre de la faim ».

C'est seulement après 1970 que de nombreux nouveaux **noyaux hypothalamiques** (regroupements de soma neuronaux sur une zone localisée) sont découverts. Ainsi, une quarantaine de noyaux ont été décrits (Berthoud, 2002). Plusieurs d'entre eux participent à la régulation de l'homéostasie énergétique. Dans la partie périventriculaire, on trouve des noyaux impliqués dans la détection des signaux circulants (en provenance du sang ou du liquide céphalo-rachidien, LCR), avec notamment les noyaux arqué (NA) et paraventriculaire (PVN). Dans la partie médiane, les noyaux ventromédian (VMH) et dorsomédian (DMN) reçoivent de nombreuses afférences sensorielles et forment de multiples connexions avec d'autres régions de l'hypothalamus. A ceux-là, s'ajoute l'hypothalamus latéral (LH) qui est constitué d'un ensemble plus diffus de neurones qui ne forme pas un véritable noyau. Les neurones du LH projettent vers de nombreuses aires intra- et extra-hypothalamiques, et constituent une interface entre l'hypothalamus et les régions limbiques et corticales, mais aussi avec le système somatique ([Figure 2](#)).

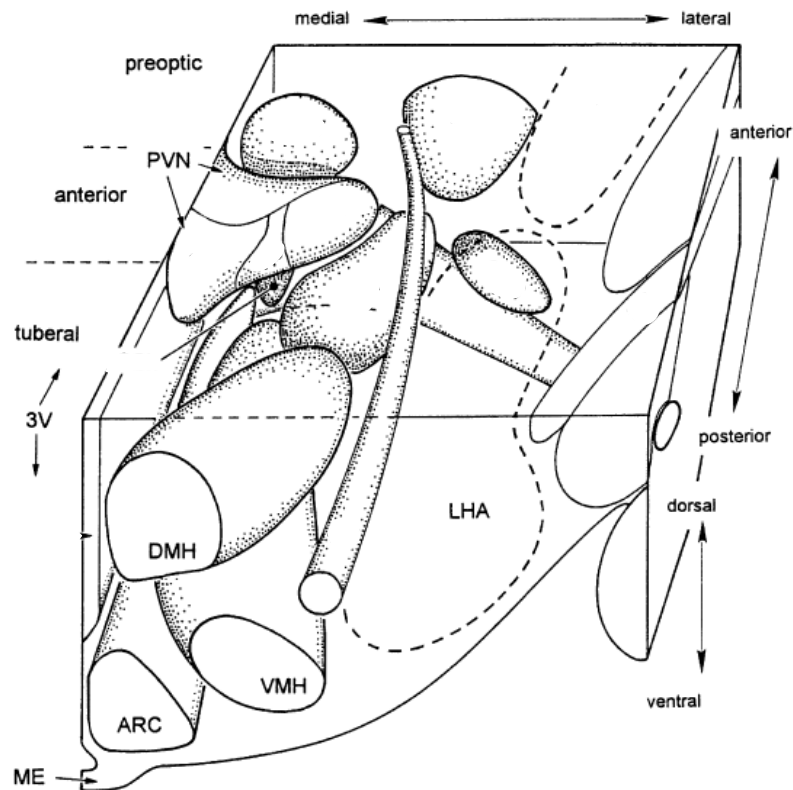


Figure 2 : Vue tridimensionnelle de l'hypothalamus de rat

Vue des principaux noyaux hypothalamiques dans l'hypothalamus droit de rat. En position ventrale, on distingue le noyau arqué (ARC sur le schéma) à proximité de l'éminence médiane (ME) et l'hypothalamus ventro-médian (VMH). En bordure du 3^{ème} ventricule (3V), se situe le noyau para-ventriculaire (PVN) dans la partie antérieure dorsale, et le noyau dorso-médian (DMH) plus postérieur. L'hypothalamus latéral (LHA sur le schéma) est délimitée par des pointillés sur le côté latéral de l'hypothalamus. Modifié d'après Berthoud, 2002.

Les neurones hypothalamiques peuvent être classés en fonction des neuropeptides qu'ils abritent (le plus fréquent) ou encore leur capacité à détecter directement ou non les signaux circulants. Dans le dernier cas, jusqu'à il y a peu de temps, les **neurones de premier ordre** étaient considérés comme présents uniquement dans le NA, car situés à proximité de vaisseaux sanguins fenestrés et du 3V. Cependant, diverses expériences ont montré que certains neurones du LH étaient aussi sensibles directement à des variations de signaux circulants comme le glucose (Karnani and Burdakov, 2011) : c'est pourquoi cette classification est remise en cause. Il était auparavant proposé que les neurones de premier ordre projettent sur des **neurones de second ordre**, ainsi informés secondairement du niveau des signaux circulants.

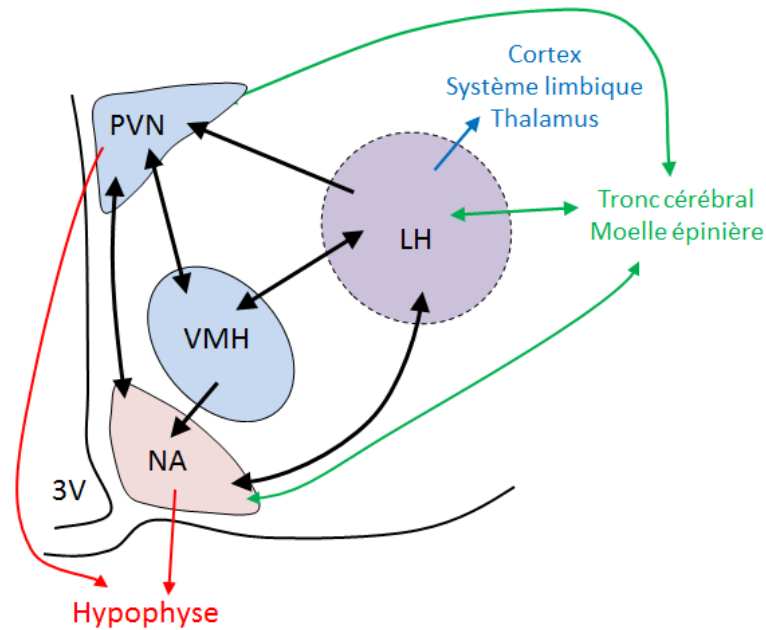


Figure 3 : Projections neuronales des différents noyaux hypothalamiques

Il existe de nombreuses projections qui relient les différents noyaux entre eux. Sur ce schéma, le noyau arqué (NA) et le noyau ventro-médian (VMH) forment l'hypothalamus médio-basal (MBH). Le noyau paraventriculaire (PVN) est situé dans la partie antéro-dorsale de l'hypothalamus. L'hypothalamus latéral (LH) est plus diffus et ne forme pas de véritable noyau. Les flèches noires représentent les principales projections neuronales entre ces noyaux. Les flèches vertes montrent les projections en direction du tronc cérébral. Seuls le NA et le PVN projettent en direction de l'hypophyse. Le LH envoie des projections vers de nombreuses aires cérébrales supérieures.

Les neurones hypothalamiques expriment un très grand nombre de **neuropeptides** (peptides libérés ayant un rôle de neuromédiateur). On peut classer ces peptides en deux grandes familles suivant leur action sur le métabolisme énergétique : les neuropeptides **orexigènes** favorisent la prise de poids en stimulant l'appétit et en diminuant les dépenses d'énergie ; à l'inverse des neuropeptides **anorexigènes** qui entraînent une perte de poids en inhibant la faim et en stimulant les dépenses d'énergie (le plus souvent, ces deux contrôles sont associés). Les neuropeptides les plus étudiés seront décrits dans les noyaux dans lesquels ils sont principalement synthétisés.

a) Le noyau arqué

Le **noyau arqué (NA)** est considéré comme un des premiers sites de détection hypothalamique des nutriments. Il se trouve dans la partie tubéreuse et médio-ventrale, en bordure du troisième ventricule et de l'éminence médiane là où elle est présente ([Figure 2 et 3](#)). A ce niveau, la barrière hémato-encéphalique (BHE) est perméable, de par la présence de vaisseaux sanguins fenêtrés (Ciofi et al., 2009; Mullier et al., 2010; Ciofi, 2011). Les

variations de concentration des signaux circulant dans le sang ou le LCR seraient donc directement détectées par les neurones du NA proportionnellement à leur taux circulant.

Ce noyau regroupe le plus grand nombre de neurones de premier ordre, notamment deux grandes populations neuronales très étudiées, aux effets antagonistes : les neurones orexigènes à **neuropeptide Y (NPY)** et les neurones anorexigènes à **pro-opio-mélano-cortine (POMC)** (Cone et al., 2001). Ces neurones sont sensibles à un ensemble de signaux métaboliques et hormonaux. Ils intègrent ces informations afin de mettre en place des réponses adaptées, en termes de PA et de régulation de l'homéostasie métabolique *via* le **Système Nerveux Autonome (SNA)** ou le **Système Neuroendocrinien (SNE)** (détaillés dans le paragraphe I.B.).

La pro-opio-mélano-cortine

La POMC est un peptide précurseur qui, lorsqu'il est coupé, produit plusieurs neuropeptides, dont **l' α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)**. L'action anorexigène de l' α -MSH est relayée par ses **récepteurs aux mélanocortines MC3-R et MC4-R** (Bultman et al., 1992; Miller et al., 1993). MC3-R and MC4-R sont localisés dans les noyaux hypothalamiques (NA, PVN, LH) impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Mountjoy et al., 1994; Lu et al., 2003; Mounien et al., 2005). Ces récepteurs sont particulièrement importants dans le contrôle du métabolisme énergétique. En effet, les souris mutées pour MC4-R et/ou MC3-R sont hyperphagiques, obèses et diabétiques (Huszar et al., 1997; Chen et al., 2000; Atalayer et al., 2010). Bien que les cas d'obésité monogénique chez l'homme soient rares, les mutations du gène POMC ou du récepteur MC4-R sont à l'origine de 5% des cas d'obésité (Vaisse et al., 1996; Krude et al., 1998; MacKenzie, 2006). Ces études ont permis de conclure que le système à α -MSH induit un tonus anorexigène et catabolique permanent *via* son récepteur MC4-R. Cette hypothèse est vérifiée par le fait qu'un agoniste de synthèse des récepteurs MC4-R, le MTII, est capable d'inhiber la PA chez des souris hyperphagiques (Fan et al., 1997). Bien que l'action anorexigène de la POMC soit relayée principalement par l' α -MSH, nous garderons le terme de « neurone POMC » pour décrire les neurones qui sont impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique *via* la libération d' α -MSH.

Dans le NA, les neurones POMC co-expriment (>95%) un autre neuropeptide anorexigène : le **Cocaine-Amphetamine-Regulated Transcript (CART)** (Vrang et al., 1999). Bien qu'il soit synthétisé dans un grand nombre de régions cérébrales, la population la plus importante de neurones CART se situe dans l'hypothalamus (Koylu et al., 1997, 1998). L'étude de Kristensen *et al.* a mis en évidence sa puissante action anorexigène par différentes méthodes chez le rat : l'injection de CART inhibe la PA induite par le NPY ; à l'inverse, l'injection Intra-Cérébro-Ventriculaire (ICV) d'anticorps dirigés contre ce peptide entraînent une augmentation de la PA (Kristensen et al., 1998). L'action anorexigène du

CART passe en partie par l'axe hypothalamo-hypophysaire, en stimulant la synthèse de CRH (*Corticotropin Releasing Hormone*) au niveau du PVN (Stanley et al., 2001; Smith et al., 2004). La synthèse de CART est notamment régulée par la leptine, l'oestradiol et le CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*). Le taux d'ARNm CART est corrélé positivement avec les niveaux de leptine circulante (Kristensen et al., 1998; Wortley et al., 2004). Oestradiol et CNTF ont tous deux des effets anorexigènes en augmentant la synthèse de CART (Ambati et al., 2007; Silva et al., 2010). Chez l'homme, des mutations de CART ont été retrouvées chez des sujets obèses (Del Giudice et al., 2001).

Les neurones anorexigènes POMC/CART projettent majoritairement vers le PVN et le LH, où ils modulent l'activité de certains de ces neurones. Par des méthodes d'immunohistochimie et de traçage rétrograde, il a été démontré que certains neurones POMC/CART du NA projettent également vers le complexe moteur dorsal du nerf vague (DMNV) du TC (Zheng et al., 2005) et sur les neurones préganglionnaires sympathiques de la moelle épinière (Elias et al., 1998a). Les récepteurs MC-3/4R ont été abondamment retrouvés dans ces zones (Mountjoy et al., 1994), ce qui est en accord avec les études physiologiques démontrant que les neurones POMC/CART agissent sur les réponses du SNA (dépenses d'énergie) en modulant les signaux perçus au niveau du PVN, du LH et du TC.

Le neuropeptide Y

Le NPY est principalement synthétisé dans le NA. Lorsqu'il est injecté dans le tissu hypothalamique ou dans le 3V, le NPY augmente la prise alimentaire et la prise de poids (Stanley and Leibowitz, 1984; Stanley et al., 1986), tout en inhibant la dépense énergétique et en facilitant le stockage d'énergie dans le tissu adipeux (TA) (Billington et al., 1991). Sa perfusion chronique conduit au développement d'une obésité (Raposinho et al., 2001). À l'inverse, les souris invalidées pour le NPY ne présentent plus la stimulation de la PA classiquement retrouvée suite à une hypoglycémie (Sindelar et al., 2004).

Le NPY agit *via* sa fixation sur des récepteurs Y dont cinq sous-types ont été clonés et caractérisés (Y1, Y2, Y4, Y5 et Y6)(Lin et al., 2004). Une étude récente suggère que les effets de NPY sur la PA seraient relayés à la fois par les récepteurs Y1 et Y5 (Nguyen et al., 2012).

Les neurones à NPY co-expriment l'**Agouti Related Peptide (AgRP)**, qui est aussi anorexigène. Comme le CART avec la POMC, l'AgRP est colocalisé à 90 % dans les neurones à NPY du NA et serait libéré en même temps que ce dernier (Hahn et al., 1998). Sa découverte découle directement de l'étude d'un modèle de souris obèse hyperphagiques (A^y) qui surexpriment la protéine Agouti dans tout l'organisme (Lu et al., 1994; Fan et al., 1997). L'AgRP, présent dans le cerveau, est un antagoniste naturel des récepteurs aux mélanocortines MC4-R : son action orexigène passe donc par une inhibition du tonus anorexigène induit par l' α -MSH (Lu et al., 1994; Ollmann et al., 1997; Cone, 2005). Ainsi,

l'injection centrale d'AgRP conduit à une hyperphagie prolongée et peut contrecarrer l'inhibition de la PA induite par la leptine (Ebihara et al., 1999). L'AgRP et le NPY forment un système orexigène très puissant, mais qui peut être plastique : lorsque la suppression de ces neurones est effectuée dès la naissance, les souris adultes présentent un phénotype normal, preuve de la mise en place d'une compensation (Erickson et al., 1996; Luquet et al., 2005). En revanche, leur délétion à l'âge adulte entraîne la mort par inanition (Luquet et al., 2005).

Les neurones NPY/AgRP produisent également le neurotransmetteur inhibiteur GABA (Tong et al., 2008). Lorsque la libération synaptique du GABA par les neurones NPY/AgRP est empêchée, les dépenses énergétiques des souris sont augmentées, elles deviennent minces et résistantes à l'obésité. Ceci suggère que la fonction du GABA libéré par ces neurones est également très importante et limite les dépenses d'énergie.

De manière générale, les neurones NPY/AgRP projettent en direction des mêmes structures que les neurones POMC/CART, à savoir principalement le PVN et le LH dans l'hypothalamus, mais aussi vers le TC (voir [Figure 3](#)). Les récepteurs au NPY de type Y1, Y2 et Y5 sont fortement exprimés dans le NA, le PVN et le VMH (Parker and Herzog, 1999).

Interrelations entre neurones NPY/AgRP et neurones POMC/CART

Les neurones NPY/AgRP et POMC/CART sont très liés car ils établissent des connexions fonctionnelles entre eux dans le NA (Cowley et al., 2001; Roseberry et al., 2004). Chacune de ces populations neuronales expriment certains récepteurs Y au NPY et les récepteurs MC3-/4R à l' α -MSH (Bagnol et al., 1999; Mounien et al., 2005) ([Figure 4](#)). On parle de « système des mélanocortines », car les deux populations jouent sur les récepteurs MC-3/4R (Cone, 2005).

Les neurones POMC/CART et NPY/AgRP projettent sur les mêmes neurones cibles du PVN et du LH (Elias et al., 1998b; Légrádi and Lechan, 1999; Fekete et al., 2000a). Ces populations innervent directement le TC, et plus particulièrement le NTS (Palkovits et al., 1987; Jobst et al., 2004).

Ces deux populations neuronales reçoivent des projections nerveuses excitatrices ou inhibitrices, *via* respectivement le glutamate et le GABA. De plus, il existe une modulation de ces deux systèmes antagonistes par des connexions réciproques : les neurones à NPY/AgRP inhibent le système à POMC, *via* l'AgRP (antagoniste des MC3-R) et le GABA (Cowley et al., 2001) ([Figure 4](#)). Ces jonctions synaptiques ne sont pas figées et sont soumises à des phénomènes de plasticité, qui peuvent être très rapides, de l'ordre de quelques heures (Horvath, 2006). Ainsi, les neurones POMC sont notamment activés par des afférences pré-synaptiques glutamatergiques en provenance du VMH, sans doute des neurones SF1. Un jeûne de 24h induit une diminution des afférences excitatrices sur les neurones à POMC

(Sternson et al., 2005). En 2004, l'équipe d'Horvath a montré que la leptine peut normaliser le nombre de projections synaptiques sur les neurones NPY et POMC de souris *ob/ob* déficientes en cette hormone, en seulement 6h (Pinto et al., 2004). Au sein de notre équipe, nous avons montré qu'après 3 jours de régime gras, l'activité des neurones POMC de souris est modifiée (augmentation du tonus excitateur)(Benani et al., 2012).

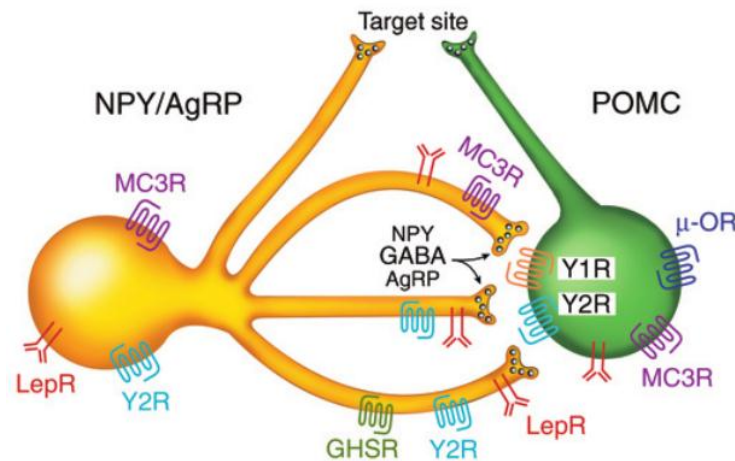


Figure 4 : Le système des mélanocortines dans le NA

Les neurones NPY/AgRP et POMC/CART forment un réseau coordonné grâce aux nombreuses projections de fibres NPY/AgRP sur les neurones POMC/CART. Ainsi, les neurones NPY/AgRP exercent un tonus inhibiteur *via* la libération de GABA, d'AgRP et de NPY. Certains récepteurs d'hormones ou de peptides connus pour réguler l'activité de ces neurones sont indiqués. LepR, récepteur de la leptine; μ -OR, récepteur opioïde μ ; Y2R, récepteur au NPY de type 2. Dans la plupart des cas, on ne sait pas si ces récepteurs sont pré ou post-synaptiques. D'après Cone, 2005.

Autres neuropeptides/neurotransmetteurs du NA

Le NA présente également des neurones qui co-expriment la kisspeptine, la neurokinine B et la dynorphine A (Goodman et al., 2007). Ces neurones expriment les récepteurs aux stéroïdes sexuels et sont impliqués dans la régulation de l'axe gonadotrope (Smith, 2008). La POMC est un précurseur qui est tronqué en plusieurs peptides, dont l'ACTH et la β -endorphine. La β -endorphine est un agoniste des récepteurs opoïdes μ , qui projette vers de nombreux noyaux, dont le PVN, le VMH et le LH. Ce peptide exerce une auto-inhibition des neurones POMC (Markowitz et al., 1992).

b) Le noyau ventro-médian

Le **noyau ventro-médian (VMH)** forme avec le NA l'hypothalamus médio-basal (MBH) dont la destruction entraîne une hyperphagie. Il existe de nombreuses projections vers le NA, le PVN, le LH, le DMN et le TC.

Le **steroidogenic factor 1 (SF1)** est exprimé spécifiquement au niveau du VMH. Plusieurs études démontrent la participation de SF1 dans la régulation du métabolisme. En effet, les souris KO pour SF1 sont obèses (Majdic et al., 2002), ce qui suggère son rôle anorexigène. Les neurones SF1 sont modulés par différentes hormones telles que la leptine ou l'insuline, dont les effets sont antagonistes suivant les conditions expérimentales. Suite à un régime gras, la leptine aurait un effet protecteur contre l'obésité, en stimulant les neurones SF1, alors qu'une sur-stimulation de la signalisation insulinaire inhibe les neurones SF1, ce qui conduit à une prise de poids (Dhillon et al., 2006; Bingham et al., 2008; Klöckener et al., 2011). Les neurones du SF1 sont glutamatergiques. La libération de glutamate par ces neurones est indispensable pour la mise en place des réponses homéostasiques lors de l'hypoglycémie (sécrétion de glucagon notamment) (Tong et al., 2007).

Certains neurones du VMH expriment aussi le **brain-derived neurotrophic factor (BDNF)**. Ce facteur neurotrophique est régulé de manière indirecte par l'état nutritionnel (Xu et al., 2003). Alors que son absence provoque l'obésité (Rios et al., 2001), lorsqu'il est injecté directement dans le VMH, le BDNF induit une chute de poids due à une baisse de la PA et une augmentation des dépenses énergétiques chez des rats normaux (Wang et al., 2010a). Par son action anorexigène, le BDNF injecté chroniquement dans le VMH ou le PVN réduit l'obésité induite par un régime gras (Wang et al., 2010b; Godar et al., 2011).

c) Le noyau paraventriculaire

Le **noyau paraventriculaire (PVN)** se situe dans la partie antérieure de l'hypothalamus. Des expériences de lésion du PVN s'accompagnent d'une obésité et d'une hyperphagie (Aravich and Sclafani, 1983; Shor-Posner et al., 1985), ce qui souligne l'action globalement anorexigène de ce noyau. Cette action passe notamment par la régulation des hormones pituitaires : les neurones parvocellulaires du PVN produisent la **CRH** (*Corticotropin Releasing Hormone*), la **TRH** (*Thyreotropin Releasing Hormone*) et les neurones magnocellulaires, l'**ocytocine**. Ces peptides sont connus pour leurs effets anorexigènes (Suzuki et al., 1982; Gosnell et al., 1983; Arletti et al., 1990). Ils ont également une action au niveau de l'hypophyse, en permettant la libération de neurohormones. Le rôle du système neuroendocrinien dans la régulation du métabolisme sera développé plus en détails dans le paragraphe I.B.2.

Le PVN forme un carrefour des projections nerveuses de nombreuses structures cérébrales en intégrant de nombreuses informations autonomes et endocrines. Par le biais des récepteurs Y1, Y5 et MC4-R (Mountjoy et al., 1994; Nguyen et al., 2012), le NPY et la POMC produits au niveau du NA module la production et la libération des neuropeptides anorexigènes libérés au niveau du PVN (Fekete et al., 2000a, 2000b, 2000c; Lu et al., 2003). De manière similaire à ce qui est retrouvé au niveau du VMH, le BDNF a une action

anorexigène sur le PVN. Son administration chronique entraîne une diminution de la PA et du poids, *via* la libération de CRH (Toriya et al., 2010).

Les fibres nerveuses du PVN projettent vers de nombreuses structures cérébrales et en premier lieu, vers les autres noyaux hypothalamiques, notamment le NA (Luiten et al., 1987; Berthoud, 2002; Jobst et al., 2004). Les neurones du PVN émettent aussi des projections vers le TC où des réponses adaptées seront alors envoyées par le SNA afin de moduler le métabolisme énergétique périphérique (Blevins et al., 2003).

d) L'hypothalamus latéral

A l'inverse des autres noyaux, l'**hypothalamus latéral (LH)** n'est pas précisément défini dans l'espace. Historiquement, le LH a été associé à un « centre de la faim », car sa destruction entraîne une hypophagie (Anand and Brobeck, 1951). Parmi les neuropeptides exprimés dans le LH, les orexines et la *melanin-concentrating hormone* (MCH) sont deux neuropeptides orexigènes également fortement impliqués, de façon inverse, dans l'état de veille/sommeil (Qu et al., 1996; Sakurai et al., 1998).

Les orexines (ou hypocrétines)

Les orexines sont exprimés uniquement dans le LH (De Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998). L'activation de ces neurones induit notamment une augmentation du tonus sympathique et de l'activité locomotrice, une recherche de récompense et une prise alimentaire (Tsujino and Sakurai, 2009). L'administration central d'orexines induit notamment une hyperphagie importante et retarde la satiété (Rodgers et al., 2002). A l'inverse, l'absence d'orexines chez la souris entraîne des symptômes de narcolepsie, d'hypophagie et d'hypoactivité, accompagnés d'une obésité tardive à partir de 12 semaines (Hara et al., 2001).

La melanin-concentrating hormone

Un grand nombre de neurones du LH expriment également le neuropeptide MCH. La MCH est considéré comme orexigène (Qu et al., 1996) mais ses effets physiologiques sur la PA sont complexes et semblent liés à ses possibles rôles sur l'anxiété et la dépression (Borowsky et al., 2002). Son expression est augmentée chez l'animal à jeun et la souris *ob/ob* obèse (Qu et al., 1996). La perte de son expression ou de celle de son récepteur induit une augmentation des dépenses énergétiques (car une hyperactivité) et une réduction du poids (Shimada et al., 1998; Alon and Friedman, 2006; Chung et al., 2011). La MCH est un peptide qui favorise le sommeil : son absence s'accompagne d'une augmentation de l'activité locomotrice des animaux, qui contribue à ses effets cataboliques marqués (Verret et al., 2003; Zhou et al., 2005; Chung et al., 2011).

Les neurones situés dans le LH projettent sur de nombreuses régions du cerveau impliquées dans la régulation de l'éveil, de la récompense et du métabolisme, à savoir les autres noyaux hypothalamiques, le cortex, le système limbique, le thalamus et la moelle épinière ; et reçoivent eux-mêmes des projections de la plupart de ces structures (Berthoud, 2002). En regroupant un ensemble d'informations sensorielles et de motivation, le LH peut réguler à la fois les aspects cognitifs et autonomes de l'homéostasie énergétique. Vis-à-vis du NA en particulier, on trouve des connexions réciproques avec les neurones à orexines et MCH (Broberger et al., 1998; Elias et al., 1998b). Ces derniers inhibent les neurones POMC/CART du NA (Ma et al., 2007) et activent les neurones à NPY/AgRP (Abbott et al., 2003; Burdakov et al., 2003).

Sur la [figure 5](#) sont représentés les principaux circuits neuronaux hypothalamiques impliqués dans la régulation du métabolisme.

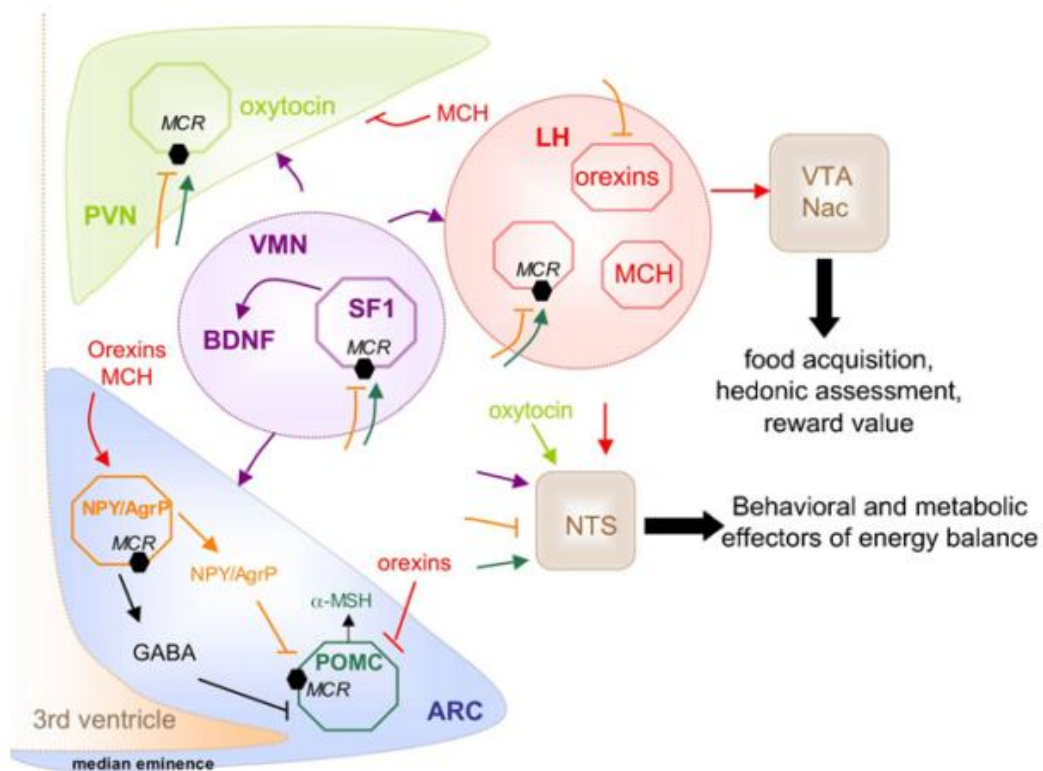


Figure 5 : Schéma récapitulatif des circuits neuronaux impliqués lors de la détection hypothalamique des nutriments

Le système mélanocortine est le circuit le mieux caractérisé lors de la détection hypothalamique des nutriments. Les neurones POMC/CART et les neurones NPY/AgRP du NA (ARC sur le schéma) projettent vers de nombreux noyaux, dont le PVN, le VMH (noté VMN) et le LH. En retour, le NA reçoit des projections de ces mêmes noyaux. Les neurones à orexines et à MCH du LH interagissent avec le système des mélanocortines et intègrent des afférences sensorielles associées au plaisir et à la motivation, relayées ensuite par l'aire tegmentale ventrale (VTA) et le noyau accumbens (Nac) pour déterminer la consommation de nourriture. Le NTS reçoit des projections du NA, PVN, VMH et LH et intègre ces informations avec les signaux en provenance de la périphérie pour contrôler à la fois les effecteurs métaboliques mais aussi le comportement pour un maintien de l'homéostasie énergétique. D'après Blouet & Schwartz, 2010.

2. Le tronc cérébral

La régulation de l'homéostasie énergétique est complexe et fait intervenir plusieurs structures cérébrales, en fonction de la nature des signaux, qu'ils soient consciemment perçus ou non. Dans ce manuscrit, nous allons nous limiter à la description rapide du tronc cérébral (TC) qui, comme l'hypothalamus, forme une « porte d'entrée » des informations, mais aussi le point de départ pour certaines fibres nerveuses du SNA.

De nombreuses informations sensorielles viscérales (distension gastrique au cours du repas, par exemple) ou métaboliques (détection du glucose dans la veine porte) sont acheminées par les fibres nerveuses du système nerveux autonome (SNA) et arrivent au niveau du TC. De nombreuses efférences hypothalamiques projettent également vers le TC qui les intègre avant de moduler l'activité des organes périphériques *via* le SNA (Luckman and Lawrence, 2003). Il est composé de plusieurs noyaux, localisés en dessous du plancher du 4^{ème} ventricule, qui forme le complexe vagal dorsal (Figure 6), à savoir l'*area postrema* (AP), le **noyau du tractus solitaire (NTS)** et le **noyau dorsal moteur du nerf vague (DMNV)**.

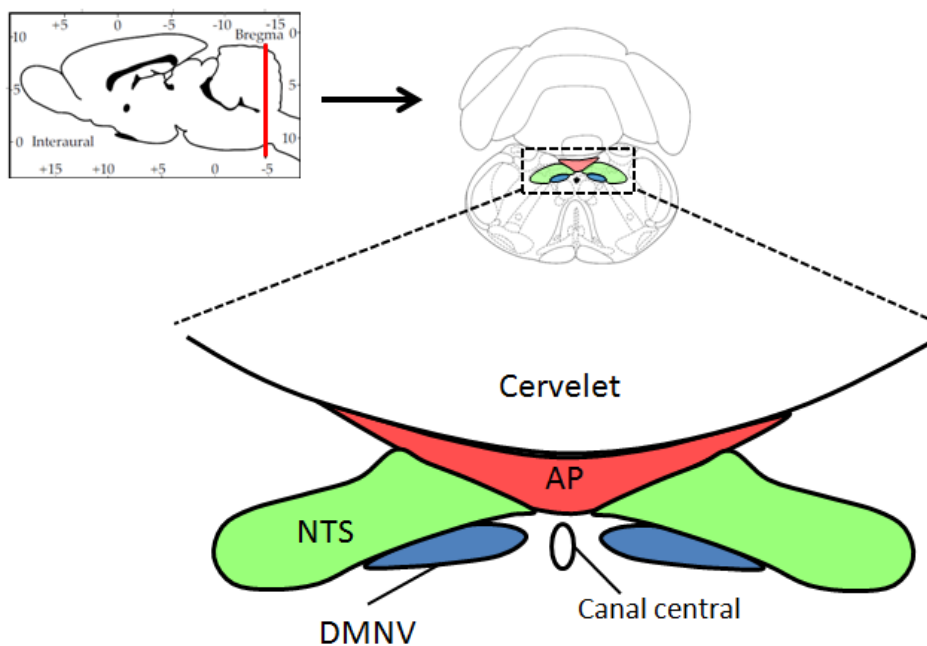


Figure 6 : Organisation du complexe vagal dorsal

Schéma d'une coupe frontale du complexe vagal dorsal, situé dans le TC, avant le début de la moelle épinière. Il est constitué de l'*area postrema* (AP), du **noyau du tractus solitaire (NTS)** qui s'étend de chaque côté du canal central. Le **noyau dorsal moteur du nerf vague (DMNV)** est situé en position ventrale du NTS.

L'**AP** est un organe circumventriculaire, qui comme le NA, se trouve à proximité d'un ventricule (Figure 6) et de nombreux vaisseaux sanguins dénués de véritable BHE, ce qui lui permet de détecter de nombreux facteurs circulants. Les neurones de l'AP présentent de

nombreux récepteurs à ces facteurs et sont la cible de fibres afférentes du SNA (Contreras et al., 1982). Ces neurones projettent vers l'hypothalamus et le NTS (Shapiro and Miselis, 1985).

Le **NTS** est une véritable station relais pour les afférences viscérales et gustatives. Il a été montré que la destruction du NTS entraînait une augmentation de la consommation de nourriture palatable (Hyde and Miselis, 1983), démontrant son importance dans l'analyse des informations qui contrôlent la PA. L'activation des afférences du SNA par des signaux de satiété (distension gastrique, libération de cholecystokinine...) module l'activité des neurones du NTS (Berthoud, 2008; Grill and Hayes, 2009). Avec le NA, c'est une des régions cérébrales où les neurones POMC sont présents. Le NTS présente une grande concentration de MC4-R (Mountjoy et al., 1994; Berthoud et al., 2006), l'activation de ces récepteurs conduit à une réduction de la PA (Grill et al., 1998; Williams et al., 2000). De plus, la leptine et le NPY peuvent moduler l'activité des neurones du NTS (Grill et al., 2002; Schwartz and Moran, 2002).

Accolé au NTS ([Figure 6](#)), le **DMNV** constitue une composante majeure du SNA parasympathique (développé dans le paragraphe I.B.1.). Il contient la majorité des corps cellulaires des neurones pré-ganglionnaires vagues. Ceux-ci sont la cible de projections directes des afférences sensorielles vagues et de centres supérieurs tels que le PVN, ou indirectes *via* le NTS (Luckman and Lawrence, 2003).

Le TC est considéré comme un des sièges majeurs de la régulation à court-terme de la PA (Schwartz, 2000; Berthoud, 2008).

B. Régulation du métabolisme par le Système Nerveux Central

Nous venons de voir que l'hypothalamus est le principal centre intégrateur des signaux circulants permettant la détection des nutriments. Après analyse de ces différentes informations, l'hypothalamus met en place des réponses adaptées qui, pour atteindre les tissus périphériques, empruntent deux voies principales. Les fibres nerveuses efférentes hypothalamiques sont notamment projetées vers l'**hypophyse**, une glande neuroendocrine reliée à l'hypothalamus par la tige pituitaire ; et vers le TC et la moelle épinière (colonne inter-médio-latérale), qui sont les points de départ des fibres efférentes du **Système Nerveux Autonome (SNA)**.

Dans ce paragraphe, nous allons décrire brièvement ces deux grandes composantes, que forment l'axe hypothalamo-végétatif et l'axe hypothalamo-hypophysaire, en nous intéressant particulièrement à la régulation nerveuse de la sécrétion d'insuline et de la production hépatique de glucose, deux composantes particulièrement contrôlées par la détection hypothalamique du glucose.

1. Le système nerveux autonome

Le système nerveux peut être classé suivant diverses catégories. On oppose souvent le SNC (cerveau et moelle épinière) au système nerveux périphérique, qui comprend notamment le système nerveux entérique. On peut également distinguer les **systèmes nerveux somatique** et **autonome**. Comme son nom l'indique, le SNA regroupe l'ensemble des nerfs permettant la régulation nerveuse de l'organisme sans contrôle volontaire. Dans le cadre du contrôle du métabolisme, le SNA est une voie efférente majeure puisqu'il innerve une grande majorité des organes périphériques, dont le tractus gastro-intestinal et la plupart des tissus/organes impliqués dans le métabolisme énergétique.

a) Organisation générale

Le système nerveux autonome (SNA) contrôle les fonctions végétatives de l'organisme. Il est constitué de deux grandes composantes qui sont les **systèmes nerveux sympathique** et **parasympathique**. Leur activité sur un organe donné a souvent des effets opposés. Ainsi, pour ce qui concerne le contrôle du métabolisme, le système parasympathique est impliqué dans la mise en place de réactions anaboliques, en favorisant le stockage d'énergie. Il sera activé suite à un repas, dans des conditions de repos (Teff, 2007)(Figure 7). A l'inverse, le système sympathique prépare l'organisme à des situations « d'urgence » (nécessitant par exemple une activité locomotrice accrue), comme lors d'un affrontement ou de la fuite (« *fight or flight* » en anglais), en mobilisant les réserves

d'énergie (catabolisme). Dans le cadre de la régulation du statut énergétique, il sera activé dans les situations de déficit énergétique (Scheurink and Nolan, 1996; Teff, 2007) (Figure 7).

Les modifications du tonus autonome sont rendues possibles par les nombreuses connexions (souvent réciproques) entre l'hypothalamus et le TC. Ainsi, le LH est interconnecté avec le TC qui contient la majorité des neurones pré-ganglionnaires parasympathiques. Le NA, outre ses nombreuses projections au sein des noyaux hypothalamiques et du TC, émet des efférences directes vers la colonne inter-médio-latérale de la moelle épinière, d'où partent les fibres sympathiques (Luiten et al., 1987; Elias et al., 1998b; Buijs et al., 2001). De la même manière, le PVN émet des projections vers le DMNV, où sont situés les neurones pré-ganglionnaires parasympathiques, mais aussi vers la colonne inter-médio-latérale (Shapiro and Miselis, 1985; Jobst et al., 2004). Ces connexions permettent à l'hypothalamus d'influencer l'activité du SNA qui contrôle, entre autres, les sécrétions pancréatiques, le stockage des AGL dans le TA, la thermogénèse, la capture de glucose ou la production hépatique de glucose par exemple.

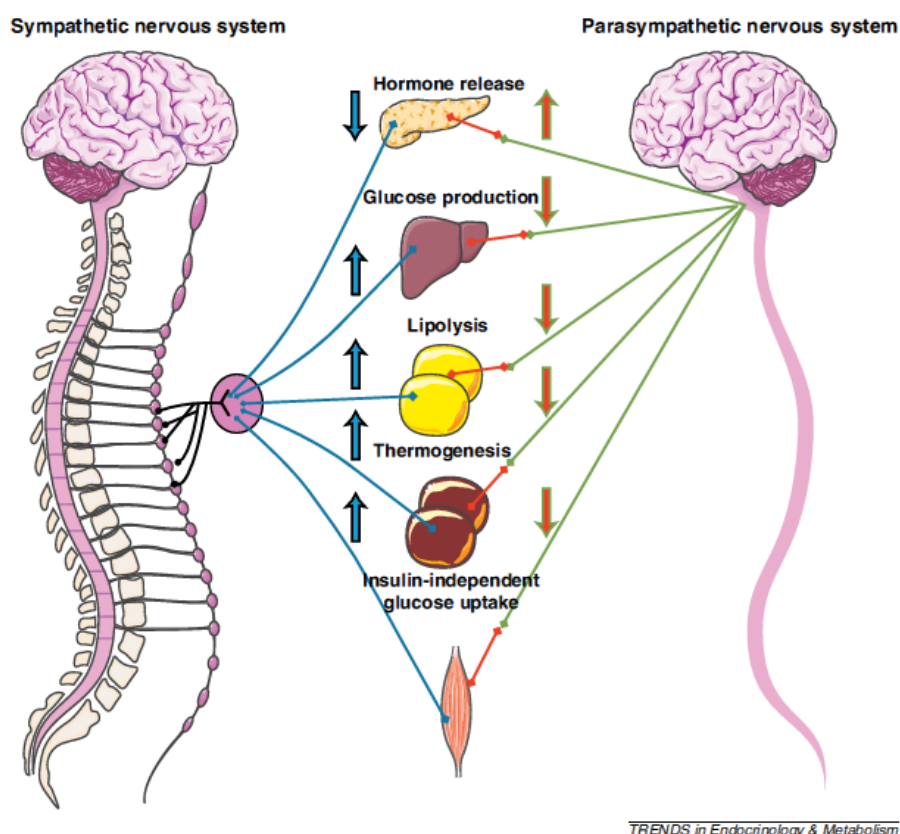


Figure 7 : Régulation autonome des organes clés impliqués dans le métabolisme

Le système sympathique présente des neurones pré-ganglionnaires (traits noirs) qui ont pour origine la colonne inter-médio-latérale. Ils font relais avec les neurones post-ganglionnaires (traits bleus) au niveau de nombreux ganglions. Ce système favorise les réactions cataboliques : il diminue notamment la sécrétion d'insuline, stimule la production hépatique de glucose, la lipolyse et la thermogénèse au niveau du TA. Bien que les muscles soient souvent associés à l'innervation somatique (mouvements volontaires), le système sympathique joue un rôle

important dans la capture musculaire de glucose, indépendante de l'insuline. Le système parasympathique présente une organisation en nerfs crâniens (traits verts) qui innervent, dans la majorité des cas, les mêmes organes *via* des neurones post-ganglionnaires (traits rouges). A l'opposé du sympathique, le système parasympathique favorise les réactions anaboliques. D'après Marino et al., 2011

Il est important de noter que l'équilibre entre tonus sympathique et parasympathique est capital pour le maintien de l'homéostasie énergétique. Ainsi, cet équilibre serait modifié dans les pathologies métaboliques. Chez des animaux obèses ou soumis à un régime gras, on assiste à une augmentation du tonus parasympathique couplée à une diminution du tonus sympathique, notamment au niveau pancréatique (Takahashi et al., 1995; Magnan et al., 1999), ce qui conduit à une hyper-sécrétion d'insuline (Atef et al., 1995).

a) *La régulation nerveuse de la sécrétion d'insuline*

Le pancréas endocrine est constitué de plusieurs types cellulaires. On trouve notamment les cellules α et β , qui produisent respectivement du glucagon et de l'insuline. Ces deux hormones sont extrêmement importantes dans le contrôle du métabolisme glucidique. Dans ce manuscrit, nous nous limiterons à la description de la régulation nerveuse de la sécrétion de l'*insuline*, seule hormone hypoglycémisante de l'organisme.

L'action du SNA sur la sécrétion d'insuline a été démontrée suite à des expériences dans lesquelles des rats sont nourris pendant 2h uniquement. Après quelques jours, ces animaux en restriction alimentaire présentent une élévation de leur insulinémie avant même la présentation de la nourriture (Woods et al., 1977). De la même manière, chez l'homme, une stimulation orale avec de la nourriture (sans variation de la glycémie) entraîne une augmentation de la sécrétion d'insuline (Teff et al., 1993). On parle de « phase céphalique » de la sécrétion d'insuline, c'est-à-dire la détection nerveuse du glucose dans la cavité orale (Teff, 2011). Cette stimulation est relayée par le nerf vague, qui innerve les cellules β , ce qui améliore la tolérance au glucose par la suite en préparant les îlots à l'hyperglycémie (Zawalich et al., 1989; Teff and Engelman, 1996). A l'opposé, la libération d'insuline est inhibée par la noradrénaline libérée par les rameaux du nerf sympathique splanchnique (Ahrén, 2000)(Figure 8).

Par diverses expériences de marquage rétrograde et de lésions, il a pu être démontré que le PVN et le MBH (*via* le DMNV) sont particulièrement importants dans le contrôle nerveux de la sécrétion d'insuline, structures où les neurones sensibles au glucose sont présents (Berthoud et al., 1990; Jansen et al., 1997; Buijs et al., 2001; Paes et al., 2006).

b) La régulation nerveuse de la production hépatique de glucose

L'activation du nerf vague inhibe les enzymes de la néoglucogénèse (PEPCK, *Phospho-énol-pyruvate Carboxy Kinase*) et activent celles permettant la glycogénogénèse (glycogène synthase) ce qui diminue progressivement la glycémie (revu par (Corssmit et al., 2001; Yi et al., 2012)). Ces effets sont abolis par une vagotomie (Matsuhisa et al., 2000; German et al., 2009) ainsi que l'injection d'atropine, un antagoniste cholinergique muscarinique (Boyle et al., 1988). A l'inverse, l'activation du système sympathique induit une production hépatique de glucose très rapide, *via* une innervation directe des hépatocytes et la stimulation de la sécrétion de glucagon et d'adrénaline. La glycogène phosphorylase est activée, ce qui conduit à une dégradation des stocks de glycogène (revu par (Corssmit et al., 2001; Yi et al., 2012))(Figure 8).

Globalement, le LH et le MBH sont respectivement à l'origine des fibres parasympathiques et sympathiques qui innervent le foie. Le PVN et le TC sont des relais (Stanley et al., 2010). Certains neurones hypothalamiques sont à l'origine de l'activation du nerf vague pour augmenter la glycogénogénèse (Pocai et al., 2005a, 2005b).

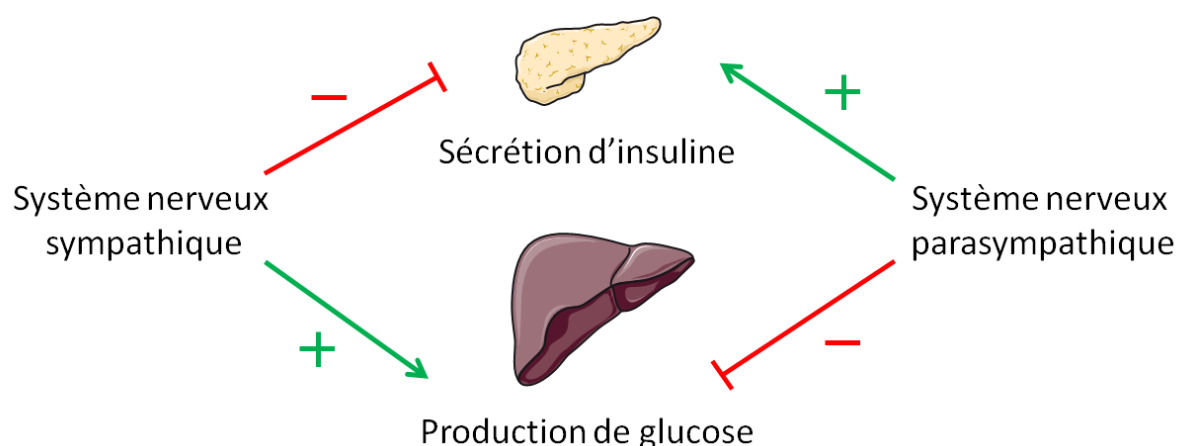


Figure 8 : Innervation autonome du pancréas et du foie

2. Le système neuro-endocrinien

Nous venons de voir que la régulation du métabolisme par le SNC est relayée par le SNA, qui innerve une grande partie des organes. Il existe une autre voie d'action, qui passe par la production de neuro-hormones qui sont libérées dans la circulation sanguine : c'est le **système neuro-endocrinien (SNE)**. Il fait intervenir deux structures importantes : l'hypophyse, en position ventrale de l'hypothalamus (Figure 9), et la médullo-surrénale, apposée sur la capsule rénale. Le SNA et le SNE présentent des interconnexions importantes,

car des populations hypothalamiques communes vont interagir pour moduler l'activité du SNA et/ou la libération d'hormones *via* le SNE.

Le PVN, qui reçoit des projections du NA et du LH, produit des neuropeptides agissant sur l'hypophyse. Ceux-ci modulent notamment la libération de TRH et CRH, deux neuropeptides impliqués dans le contrôle du métabolisme énergétique.

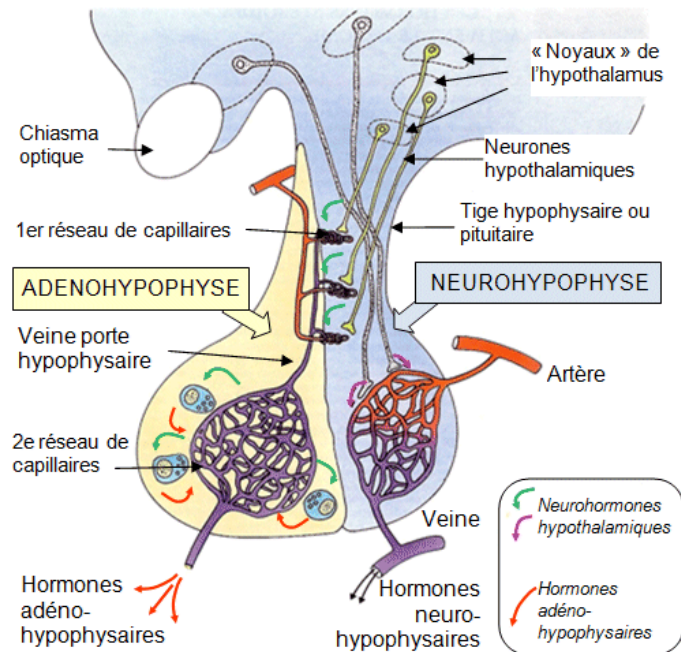


Figure 9 : Le système hypothalamo-hypophysaire

L'hypophyse présente la particularité d'être composée d'une structure nerveuse, la neurohypophyse (postérieure) et d'une structure endocrine, l'adénohypophyse (antérieure). Au niveau de l'éminence médiane, entre hypothalamus et hypophyse, il existe une riche vascularisation qui forme un système porte dans lequel les neuro-hormones hypothalamiques peuvent être libérées, pour atteindre l'hypophyse. D'autre part, certains neurones de l'hypothalamus projettent directement sur la neurohypophyse. L'ensemble forme l'**axe hypothalamo-hypophysaire**, qui contrôle un grand nombre de fonctions primaires telles que la reproduction, la croissance ou encore le stress.

L'axe hypothalamo-hypophysio-thyroïdien

La TRH stimule la production de TSH (*Thyroid Stimulating Hormone*) par les cellules thyrotropes de l'adénohypophyse, qui conduit à la libération des hormones thyroïdiennes T3 et T4 (Figure 10). Ces hormones sont connues depuis longtemps comme d'importants régulateurs du métabolisme basal et interviennent dans la thermorégulation (Silvestri et al., 2005). Indépendamment du maintien de l'homéothermie, on distingue deux types de thermogénèses liées au repas : une obligatoire, conséquence de l'ensemble des réactions métaboliques exothermiques, et une « adaptative » qui est modulée en fonction de

l'environnement ou de l'alimentation. Les hormones thyroïdiennes participent à la régulation de ces deux types de thermogénèse. L'hormone T3 induit notamment l'expression des protéines découplantes UCP (*Uncoupling Protein*) dans le TA brun, riche en mitochondries, ce qui permet notamment la dissipation de l'énergie ingérée excédentaire sous forme de chaleur (Fukuda et al., 2007). Ce contrôle est assurée de façon synergique avec celui du système nerveux sympathique (Bachman et al., 2002). Cette thermogénèse adaptative est augmentée (après un repas, on parle aussi de thermogénèse post-prandiale non obligatoire) pour permettre de limiter la prise de poids et varie en fonction des individus, suivant le fond génétique (Shibata and Bukowiecki, 1987; Cannon and Nedergard, 2004).

Divers noyaux hypothalamiques participent aux modifications du contrôle de la thermogénèse, *via* le SNA et le SNE. Lorsque le VMH est détruit, l'augmentation de la thermogénèse dans le TA brun (relayée par le SNA sympathique) n'est plus observée en réponse à une injection de glucose dans ce noyau (Sakaguchi and Bray, 1987, 1990). En revanche, elle est toujours présente lorsque l'injection de glucose est réalisée dans le 3V (Le Feuvre et al., 1991), preuve de l'implication de plusieurs noyaux hypothalamiques dans la détection du glucose et l'induction du contrôle de la thermogénèse dans le TA brun. Il est bien établi que le glucose, indépendamment de l'action de l'insuline, induit une thermogénèse *via* le SN sympathique (Levin and Sullivan, 1987; Nacht et al., 1987).

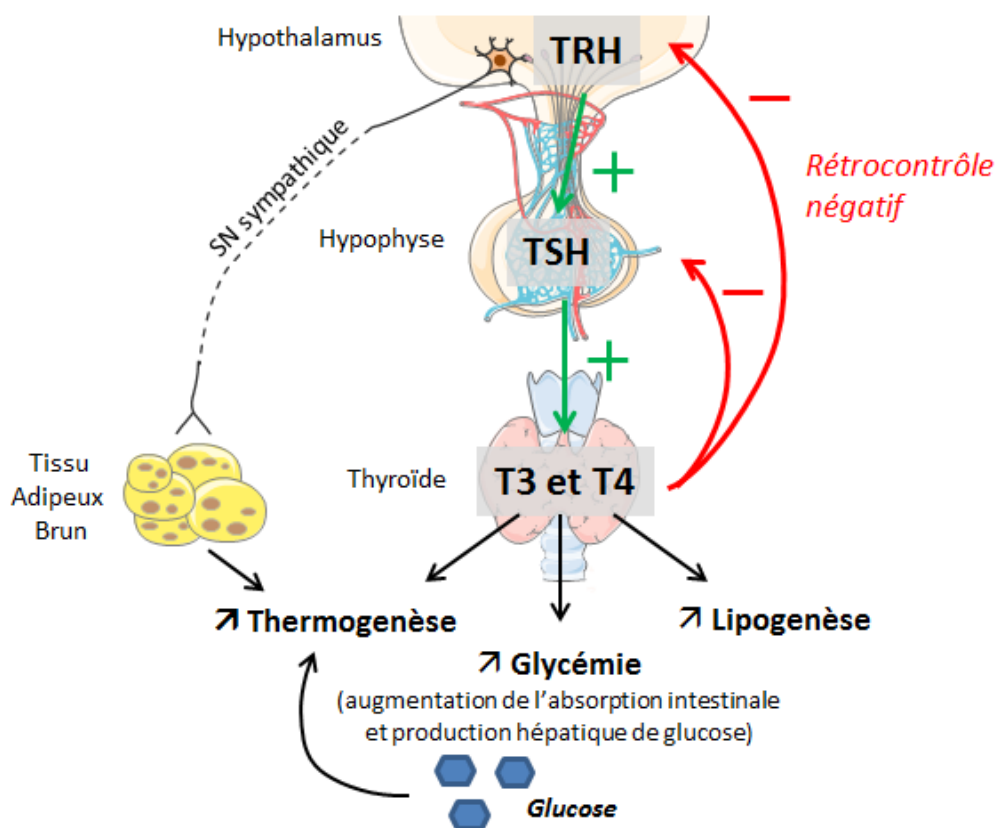


Figure 10 : La thermogénèse induite par le SNA et les hormones thyroïdiennes

A l'opposé, lors du jeûne, afin de limiter les dépenses d'énergie, la sécrétion de TSH, de TRH et des hormones thyroïdiennes est inhibée, et celles circulantes sont rapidement éliminées par le foie. Ces actions sont notamment régulées par le système des mélanocortines hypothalamiques (Vella et al., 2011), qui participent donc à la régulation du métabolisme énergétique en modulant les dépenses d'énergie par thermogenèse.

L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) est impliqué pour répondre à des réponses de stress, comme lors de la recherche de nourriture. Le PVN libère le CRH dans le système porte de l'éminence médiane et stimule la synthèse d'ACTH (*AdrenoCortico-Tropic Hormone*) par les cellules corticotropes, à partir de POMC, au niveau de l'adéno-hypophyse. L'élévation d'ACTH conduit alors à la production de glucocorticoïdes (GCs) par la cortico-surréale, la partie la plus externe des glandes surrénales. Chez l'Homme, le cortisol est la forme active des GCs, chez le rat, c'est la corticostérone. Ces GCs exercent un rétrocontrôle négatif sur la synthèse de CRH, ce qui limite par la suite sa propre production, afin d'éviter d'atteindre des niveaux de GCs toxiques (De Kloet et al., 2005). Les actions conjointes du SNA et du système neuroendocrinien sur la production de GCs et d'adrénaline sont représentées dans la [figure 11](#).

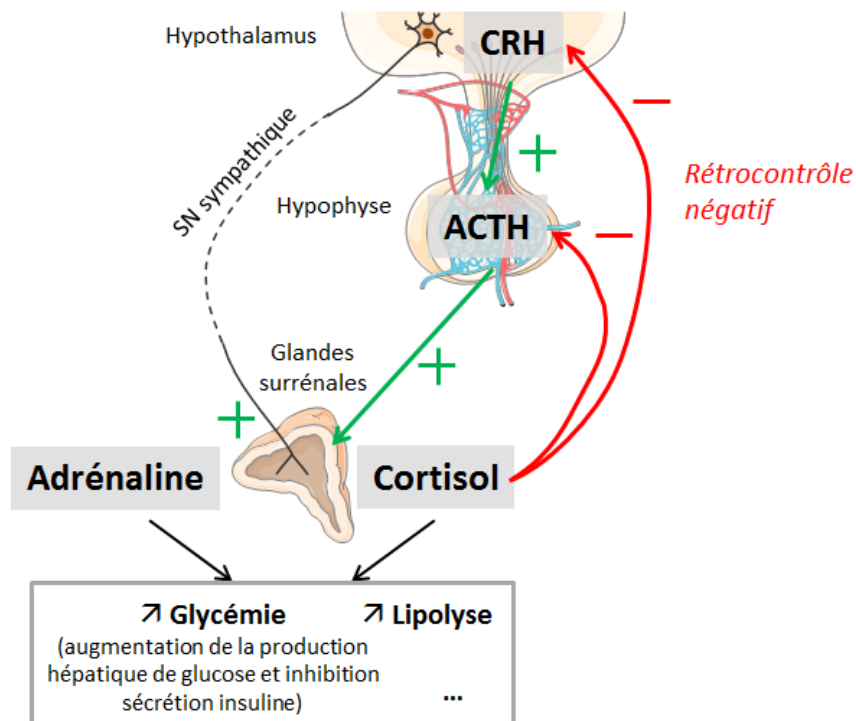


Figure 11 : L'axe hypothalamo-surrénalien

Dans des situations de stress, comme cela peut être le cas lors de la recherche de nourriture, la stimulation de l'axe hypothalamo-surrénalien passe par deux voies : une voie directe par le SN sympathique qui conduit à la production d'adrénaline par la médullo-surrénale (équivalent d'un

ganglion sympathique) ; et une voie indirecte, par la libération de cortisol, *via* le SNE. L'ensemble de ces réactions conduit globalement à une mobilisation des réserves énergétiques (glycogène et triglycérides) pour faire face à la situation de stress. La sur-stimulation de cet axe, avec un excès de GCs, conduit au développement d'une résistance à l'insuline et la mise en place de pathologies métaboliques (Nieuwenhuizen and Rutters, 2008; Maniam and Morris, 2012).

De manière paradoxale, alors que la CRH diminue la PA (Gosnell et al., 1983; Richardson et al., 2002), les GCs l'augmentent comme en témoigne l'hypophagie induite par l'adrénalectomie et reversée par une supplémentation en cortisol (revue par (La Fleur, 2006)). Ceci s'explique notamment par le fait que la CRH inhibe la PA induite par le NPY (Heinrichs et al., 1993), alors que les GCs la stimulent *via* une augmentation de la synthèse de NPY (Sato et al., 2005). De plus, il semble que les GCs orientent vers la consommation d'aliments plus riches énergétiquement (Tempel and Leibowitz, 1989; Zellner et al., 2006). Ainsi, les GCs favorisent la prise de poids : les personnes atteintes d'hypercortisolémie développent souvent une obésité, alors que l'adrénalectomie induit une chute de poids et protège de l'obésité (Solomon and Mayer, 1973; Freedman et al., 1986). De nombreuses études suggèrent ainsi que l'hyperactivité de certaines composantes de l'axe HHS participe au développement de l'obésité (Guillaume-Gentil et al., 1990; Nieuwenhuizen and Rutters, 2008).

Au niveau cellulaire, il a été montré qu'en absence de GCs, les modifications d'expression de NPY et POMC suite à la reprise alimentaire ne sont plus présentes (Uchoa et al., 2012). De plus, le BDNF (libéré par des neurones du VMH) participe, de pair avec les GCs, à la régulation de l'axe HHS, *via* la production de CRH par le PVN (Jeanneteau et al., 2012).

C. Signaux permettant le maintien de l'homéostasie énergétique

Afin de mettre en évidence les signaux hypothalamiques perçus et impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique, que ce soit la régulation de la PA ou du métabolisme, différentes approches méthodologiques ont été utilisées. Ainsi, des injections de métabolites et/ou d'hormones dans le parenchyme ou le 3V ont été réalisées. Ces injections sont souvent accompagnées d'agents pharmacologiques et/ou de manipulations génétiques afin de moduler les acteurs de la détection des signaux. Pour les signaux nerveux, ne seront développées que les afférences nerveuses en relation avec la détection périphérique du glucose, dans le paragraphe II.

1. Les hormones

Il existe un grand nombre d'hormones circulantes susceptibles de contrôler les apports et/ou les dépenses d'énergie. Je m'attacherai ici à la description de l'insuline et de la leptine, dont les concentrations circulantes sont corrélées au poids corporel et à la masse adipeuse, ainsi qu'à celle de la ghréline, unique hormone connue stimulant la PA. De nombreuses données montrent le rôle de ces hormones dans la régulation hypothalamique de la PA, du poids corporel, mais aussi de l'activité du SNA. Leur récepteur est fortement concentré au niveau de l'hypothalamus, en particulier dans la NA (Marks et al., 1990; Tartaglia et al., 1995; Willesen et al., 1999). Ces hormones sont considérées comme des signaux majeurs de la régulation centrale du métabolisme énergétique (Morton and Schwartz, 2011). En pages 36 et 37 est décrit brièvement, sous forme de tableau, le rôle de ces principales hormones. Je ne détaillerai pas leurs voies de signalisation, qui ont fait l'objet d'un grand nombre de revues (Cowley et al., 2003; Hassouna et al., 2010; Harrold et al., 2012).

Plus récemment, une nouvelle hormone sécrétée par le TA, l'apeline, a été montrée comme impliquée dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Au niveau central, l'apeline contrôle le poids corporel, la PA, ainsi que l'homéostasie glucidique par une signalisation NO-dépendante (Castan-Laurell et al., 2011), en jouant notamment sur le système des mélanocortines (Reaux-Le Goazigo et al., 2011).

Hormones (Sites de production – Stimulation de la production)	Cellules/Tissus/ Organes dont l'activité est modifié	Effets métaboliques majeurs	Dérégulations métaboliques
<p style="text-align: center;">Insuline</p> <p>-produite par la cellule β pancréatique</p> <p>-sécrétion stimulée par l'hyperglycémie principalement</p>	Hypoglycémiant, <i>via</i>		
	Muscles et TA	→ Induit le transport du glucose <i>via</i> GLUT4 (González-Sánchez and Serrano-Ríos, 2007)	Résistance à l'insuline (internalisation du récepteur, altération des voies de signalisation)
	Foie	→ Supprime la néoglucogenèse et stimule la glycogénogenèse (via le SNA) (Obici et al., 2002b)	
	Hypothalamus : effet global	Anorexigène (McGowan et al., 1990, 1992)	Résistance à l'insuline (Marino et al., 2011)
	Neurones NPY/AgRP	Diminue l'expression et la libération de NPY (Schwartz et al., 1992; Könnner et al., 2007)	
	Neurones POMC/CART	Augmente l'expression et la libération de POMC (Benoit et al., 2002)	
SNC	Potentialise les effets du glucose et de la CCK (Riedy et al., 1995; Alquier et al., 2003)		
<p style="text-align: center;">Leptine</p> <p>-produite par les adipocytes du TA (Zhang et al., 1994)</p> <p>-production stimulée avec l'augmentation de la masse grasse</p>	SNC : effet global dont Hypothalamus et NTS	Anorexigène (Campfield et al., 1995; Tartaglia et al., 1995; Seeley et al., 1996; Halaas et al., 1997; Elmquist et al., 1998; Grill et al., 2002)	Résistance à la leptine lors de l'obésité (Morton and Schwartz, 2011; Ghamari-Langroudi, 2012)
	Neurones NPY/AgRP	Diminue l'expression et la libération de NPY/AgRP (Schwartz et al., 1996a; Morrison et al., 2005)	
	Neurones POMC/CART	Augmente l'expression et la libération des peptides anorexigènes (Cheung et al., 1997; Cowley et al., 2001; Hill et al., 2008)	
	Neurones TRH	Augmente l'expression de TRH (Ghamari-Langroudi et al., 2010; Perello et al., 2010)	
	Neurones CRH	Augmente l'expression de CRH (Schwartz et al., 1996b)	

<p>Leptine</p> <p>-produite par les adipocytes du TA (Zhang et al., 1994)</p> <p>-production stimulée avec l'augmentation de la masse grasse</p>	SNC	Potentiale les effets centraux de la CCK (Emond et al., 1999)	Perfusion chronique diminue la sensibilité hypothalamique à l'insuline (Koch et al., 2010; Burgos-Ramos et al., 2011)
	TA brun	Augmente la thermogénèse par l'expression de UCP1, <i>via</i> le SNA (Scarpace et al., 1997)	
	Organisme entier	→ Augmente l'activité motrice et la consommation d'oxygène (Scarpace et al., 1997) → Améliore la sensibilité au glucose (Morton et al., 2005; Roman et al., 2010)	
<p>Ghréline</p> <p>- Cellules oxyntiques de l'estomac et duodénum (Kojima et al., 1999; Ariyasu et al., 2001)</p> <p>- Production augmentée avant le repas (Cummings et al., 2001)</p>	Hypothalamus	Orexigène (Willesen et al., 1999; Tschöp et al., 2000; Wren et al., 2000)	Diminution des taux de ghréline chez les personnes obèses (Tschöp et al., 2001)
	Neurones NPY/AgRP	Augmente la libération de NPY (Cowley et al., 2003)	
	Estomac	Augmente la motilité gastrique et les sécrétions acides de l'estomac (Tschöp et al., 2000)	
	TA brun	Diminution de l'expression de UCP1 et UCP3 (Tsubone et al., 2005)	
	TA blanc	Stimulation de la lipogénèse (Tsubone et al., 2005)	

2. Les nutriments

Mises à part leurs fonctions métaboliques, enzymatiques ou structurales, les nutriments ont également une fonction « informative » pour le cerveau, étant donné que leur concentration est un reflet immédiat du statut énergétique de l'organisme, avant même qu'ils n'aient déclenché des modifications de concentrations hormonales. Historiquement, une des premières expériences visant à démontrer une détection directe des nutriments par le SNC consistait à injecter par voie ICV des métabolites dans le 3V (Davis et al., 1981). Depuis, les preuves de l'importance de la détection de ces nutriments dans le maintien de l'homéostasie énergétique se sont multipliées.

Dans les paragraphes suivants seront décrits brièvement les principaux rôles des acides gras et des acides aminés dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Pour ce qui est des glucides, et plus particulièrement du glucose qui nous intéresse dans l'équipe, elle sera développée plus en détails dans le paragraphe II.

a) Les acides gras

Les lipides peuvent être directement détectés par l'hypothalamus. Ainsi, une augmentation de la concentration en acides gras libres (AGL) (en injectant directement des AGL ou en inhibant l'enzyme qui permet leur dégradation) dans le 3V induit une inhibition de la PA (Loftus et al., 2000; Obici et al., 2002a), une diminution de la production hépatique de glucose (Obici et al., 2002a) et module la sécrétion et l'action de l'insuline en réponse à une charge périphérique en glucose (Clément et al., 2002; Cruciani-Guglielmacci et al., 2004). Les effets de ces acides gras sur les tissus périphériques (foie, pancréas) sont dus à une modification de l'activité du SNA, plus particulièrement une diminution du tonus sympathique, *via* l'hypothalamus (Clément et al., 2002; Cruciani-Guglielmacci et al., 2004, 2005).

Différentes équipes s'attachent à découvrir les acteurs cellulaires responsables des effets cérébraux des lipides, en fonction de leur nature. Dans l'hypothalamus, certains neurones présentent une modification d'activité électrique en réponse aux AGL (Oomura et al., 1975; Wang et al., 2006). Il a été démontré l'existence de neurones sensibles aux AGL grâce à l'utilisation du marqueur d'activation cellulaire c-Fos, d'enregistrements électriques *in vivo* après une injection intracarotidienne d'acide oléique et par électrophysiologie (Chang et al., 2004; Cruciani-Guglielmacci et al., 2004; Wang et al., 2006). Globalement, les AGL activent certains neurones du LH et en inhibent d'autres dans le NA, le VMH et le PVN (Cruciani-Guglielmacci et al., 2004). Que ce soit *ex vivo* (tranches d'hypothalamus) ou *in vivo* (enregistrements multicellulaires), la réponse des neurones du NA à l'acide oléique dépend de la concentration en glucose/la glycémie (Wang et al., 2006). *Ex vivo* par exemple, lorsque la concentration en glucose est de 2,5mM, on trouve des neurones excités et d'autres inhibés par l'acide oléique. En revanche, lorsque la concentration en glucose est descendue à 0,1mM, il ne reste que des réponses inhibitrices à l'acide oléique (Wang et al., 2006).

L'hypophagie induite par une augmentation hypothalamique des AGL est corrélée à une diminution de l'expression de NPY (Loftus et al., 2000; Morgan et al., 2004). En revanche, dans ces études, aucune variation d'expression de la POMC n'a été détectée (Obici et al., 2002a). Une étude plus récente montre cependant que l'acide oléique inhibe l'activité des neurones POMC (Jo et al., 2009).

Les mécanismes moléculaires proposés dans la détection des AGL passent par la métabolisation de ces derniers, détaillée dans la [figure 12](#).

Les enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides, comme l'acétylCoA carboxylase (ACC) et la *fatty acid synthase* (FAS), ainsi que les transporteurs d'acyl-CoA CPT1 et 2 (transport mitochondrial) sont exprimés dans le NA et le VMH (Sorensen et al., 2002), des noyaux hypothalamiques qui sont donc impliqués dans la régulation de la PA, *via* la détection des AGL. Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette détection ne sont pas encore totalement élucidés. Il existe deux hypothèses qui s'opposent ([Figure 12](#)) :

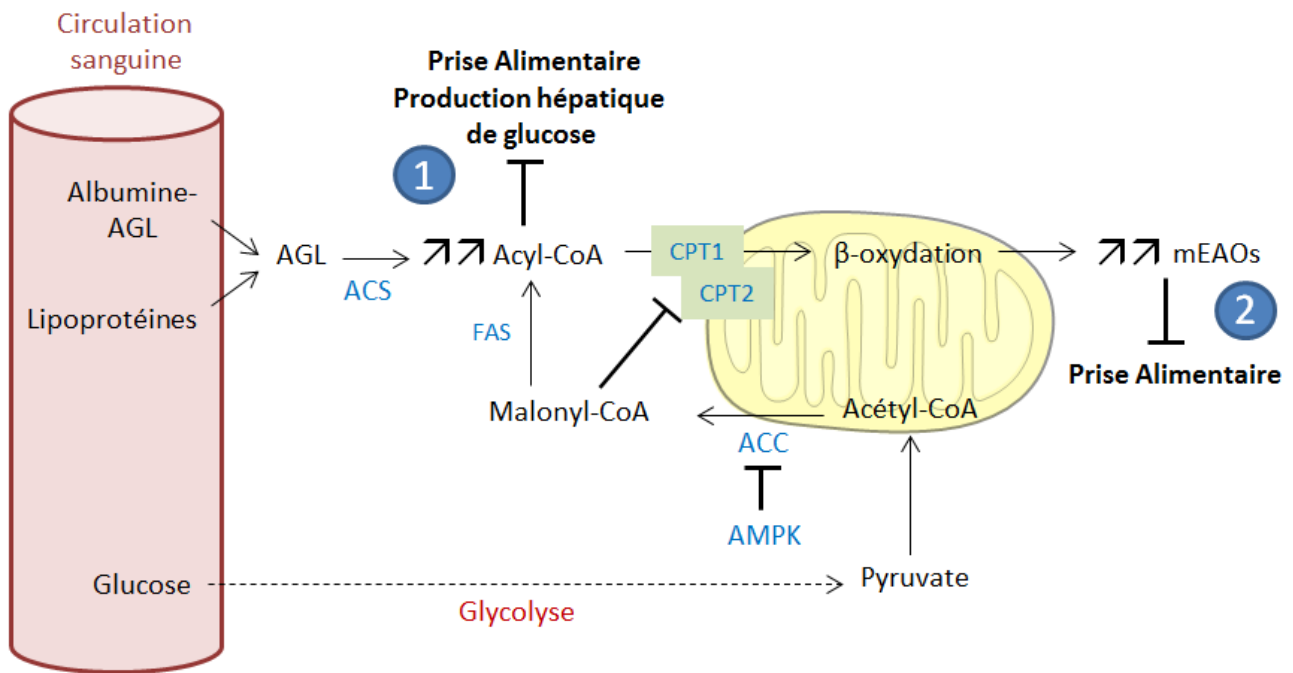


Figure 12 : Représentation schématique du métabolisme cellulaire des lipides ainsi que leur implication dans la régulation nerveuse du métabolisme énergétique.

Une fois à l'intérieur de cellules, les AGL sont rapidement estérifiés en acyl-CoA par l'*Acyl-CoA Synthase* (ACS). Le devenir des acyl-CoA et leur signalisation font l'objet de deux hypothèses.

① Les acyl-CoA ont deux origines possibles : soit, *via* l'action de l'ACS, à partir des AGL ; soit néformés par l'action de la FAS (*Fatty Acid Synthase*) à partir de malonyl-CoA. Le malonyl-CoA est lui-même dérivé de l'acétyl-CoA, produit de la glycolyse, par l'*Acétyl-CoA Carboxylase* (ACC). L'entrée des acyl-CoA dans la mitochondrie est contrôlée par la disponibilité en malonyl-CoA. En effet, le malonyl-CoA inhibe CPT1 (*Carnitine-palmitoyltransferase 1*), un des transporteurs mitochondriaux des acyl-CoA (avec le CPT2). Un taux important de malonyl-CoA contribue donc à faire **augmenter la concentration cytoplasmique des acyl-CoA**. Cette accumulation engendrerait une activation des canaux K_{ATP} dépendants, induisant une dépolarisation du neurone (Lam et al., 2005c).

La Kinase activée par l'AMP (AMPK) jouerait également un rôle important dans la régulation de la détection des lipides. Elle participe au contrôle de la formation de malonyl-CoA, en inhibant de façon allostérique l'ACC (López et al., 2008).

② Les acyl-CoA sont transportés dans la mitochondrie par l'intermédiaire de deux transporteurs, CPT1 et CPT2, localisés respectivement sur la membrane mitochondriale externe et interne. Le β -oxydation des acyl-CoA conduit à la formation d'ATP et d'espèces actives de l'oxygène (mEAOs). L'ATP produit ferme les canaux K_{ATP} . Quant aux mEAOs, leur(s) cible(s) ne sont pas encore identifiées.

1) Selon la première hypothèse, c'est l'accumulation des AGL et des Acyl-CoA dans le cytoplasme qui constituerait le signal anorexigène ou catabolique. Différentes études pharmacologiques, utilisant des inhibiteurs de la FAS ou de CPT1, montrent une accumulation d'acyl-CoA accompagnée d'une inhibition de la PA et de la néoglucogenèse hépatique (Loftus et al., 2000; Obici et al., 2002a, 2003; Kim et al., 2004).

- 2) C'est la métabolisation des acyl-CoA dans la mitochondrie (β -oxydation et respiration) (Cruciani-Guglielmacci et al., 2004) qui permet notamment une augmentation de la production d'espèces actives de l'oxygène (mEAOs), responsable des signaux de satiété (Benani et al., 2007). En effet, lorsque la production des mEAOs est bloquée, l'inhibition induite par les AGL n'est plus présente. La signalisation *via* les mEAOs est également impliquée lors de la détection du glucose, elle sera développée dans le paragraphe II.

Plusieurs produits de la métabolisation des AGL peuvent agir comme molécule-signal, proportionnellement à leur concentration, pour modifier le potentiel de membrane et la fréquence des potentiels d'action des neurones. En effet, ils modulent la conductance de canaux ioniques, notamment les K_{ATP} (Obici et al., 2002b) ce qui permet ou empêche la libération de neurotransmetteurs (Lam et al., 2005b; Pocai et al., 2005a; Wang et al., 2006; Jo et al., 2009).

De plus, les AGL peuvent être des modulateurs directs de la transcription, car il existe des séquences régulatrices sensibles aux AGL, comme les PPAR (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*) (Chakravarthy et al., 2007; Diano et al., 2011).

Il existe des interrelations entre la détection des lipides et celle du glucose, qui passent par des voies de signalisation communes (*via* le malonyl-CoA et l'action sur les K_{ATP} notamment).

b) Les acides aminés

Depuis plus de 50 ans, il est connu que la consommation d'un régime hyperprotéiné est satiétogène (Mellinkoff et al., 1956; Porrini et al., 1997). Certains acides aminés semblent plus particulièrement impliqués : ainsi, une injection de leucine dans le 3V inhibe très fortement la PA (Cota et al., 2006; Morrison et al., 2007). A l'inverse, la consommation d'un régime carencé en protéines ou en un acide aminé particulier conduit au développement de préférences alimentaires vis-à-vis de protéines ou de l'acide aminé manquant, que ce soit chez l'Homme ou le rat (Gietzen, 1993; Gibson et al., 1995).

La détection centrale des acides aminés passe par plusieurs voies directes ou indirectes. Pour les voies indirectes, le passage des acides aminés au niveau duodénal induit la sécrétion de CCK qui déclenche l'effet anorexigène des protéines au niveau central. Il a aussi été démontré la présence de récepteurs hépato-portaux sensibles aux acides aminés, qui lorsqu'ils sont stimulés, activent des afférences nerveuses en direction du TC (Nijima and Meguid, 1995; Duraffourd et al., 2012).

Plusieurs arguments montrent également une détection centrale directe des acides aminés. L'injection de leucine dans le MBH induit une activation des neurones POMC du NA, des neurones à ocytocine du PVN, et des neurones du NTS afin de diminuer la PA (Blouet et

al., 2009). A l'inverse, les acides aminés inhibent les neurones à NPY/AgRP (Morrison et al., 2007). Récemment, il a été démontré que les neurones à orexines du LH sont également capables de détecter des variations de concentrations en acides aminés (Karnani et al., 2011).

Parmi les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ces effets, on trouve l'activation de la signalisation mTOR (Cota et al., 2006; Morrison et al., 2007). Le ratio AMP/ATP semble être crucial pour l'activation de la mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*). Lorsqu'il augmente, signe d'un manque énergétique, l'activité de la kinase mTOR augmente, entraînant des phénomènes de transcription (Dennis et al., 2001; Cota et al., 2006; Wullschlegel et al., 2006). Plusieurs études mettent en avant le rôle de la leucine comme un signal physiologique de la disponibilité en acides aminés. GCN2 et S6K1 font partie des kinases qui participent aux réponses mises en jeu lors de la privation en leucine, et induisent des phénomènes de transcription (Maurin et al., 2005; Blouet et al., 2009; Xia et al., 2012).

II. Le glucose dans le contrôle de l'homéostasie énergétique

Nous venons de voir que des signaux lipidiques ou protéiques permettent au SNC d'appréhender le statut énergétique de l'organisme et de mettre en place des réponses physiologiques adaptées. Au sein de notre équipe, nos recherches visent à mieux comprendre la détection hypothalamique d'un glucide en particulier : le glucose. Le glucose représente une source énergétique majeure pour tous les organes et en particulier pour le cerveau, pour lequel il est le substrat énergétique essentiel en conditions physiologiques. Afin d'assurer l'intégrité de l'organisme, la glycémie est donc finement contrôlée : elle est maintenue autour d'une valeur physiologique de référence, qui est de 5 mM en condition basale chez l'Homme.

Le SNC joue un rôle majeur dans la régulation de la glycémie, en premier lieu pour son propre fonctionnement comme organe mais également pour l'ensemble de l'organisme. Afin d'assurer cette régulation aussi finement que possible, il est capable de détecter les variations de glycémie. Il existe néanmoins d'autres organes capables de détecter ces variations, dont l'un occupe un rôle majeur : le pancréas endocrine, en particulier les cellules β . Ces différents « détecteurs » périphériques seront détaillés avant de décrire plus précisément la détection hypothalamique du glucose.

A. Détection extra-hypothalamique du glucose

1. Le pancréas endocrine

Le pancréas endocrine est organisé en îlots de Langerhans, composés de plusieurs types cellulaires : les cellules α , β , σ , δ et ϵ , qui synthétisent respectivement le glucagon, l'insuline, la somatostatine, le polypeptide pancréatique (aussi appelé PP) et la ghréline (Granata et al., 2010). Dans ce paragraphe, seule la détection du glucose par la cellule β sera décrite. Les connaissances sur les mécanismes de détection du glucose dans la cellule β ont mis en évidence de nombreuses analogies avec ceux des autres sites de détection identifiés (Schuit et al., 2001; Pénicaud et al., 2006; Diano and Horvath, 2012).

La détection du glucose par la cellule β est extrêmement connue (comparativement à celle de l'hypothalamus) et documentée depuis longtemps. Cette cellule exprime majoritairement l'isoforme **GLUT2** des transporteurs au glucose chez les rongeurs (GLUT), dont l'affinité pour le glucose est faible. Cette propriété permet, lors d'une hyperglycémie, de transporter le glucose dans la cellule de façon proportionnelle à l'augmentation de glycémie. Associée à GLUT2, la **glucokinase** (ou hexokinase IV) a, elle aussi, une faible affinité pour le glucose et elle n'est pas inhibée par son produit, elle transforme donc rapidement le glucose en glucose-6-phosphate, de manière proportionnelle à la disponibilité en glucose. Ainsi phosphorylé, le glucose suit la voie de la glycolyse puis le cycle de Krebs dans la

mitochondrie. La signalisation la plus décrite implique alors la synthèse d'ATP, qui induit l'élévation du ratio d'ATP/ADP cytosolique, entraînant la fermeture des **canaux potassiques K_{ATP}** . Ceci provoque une dépolarisation de la cellule β , conduisant à l'ouverture de canaux calciques voltages dépendants. L'entrée de calcium dans la cellule déclenche la libération des granules d'insuline (Figure 13).

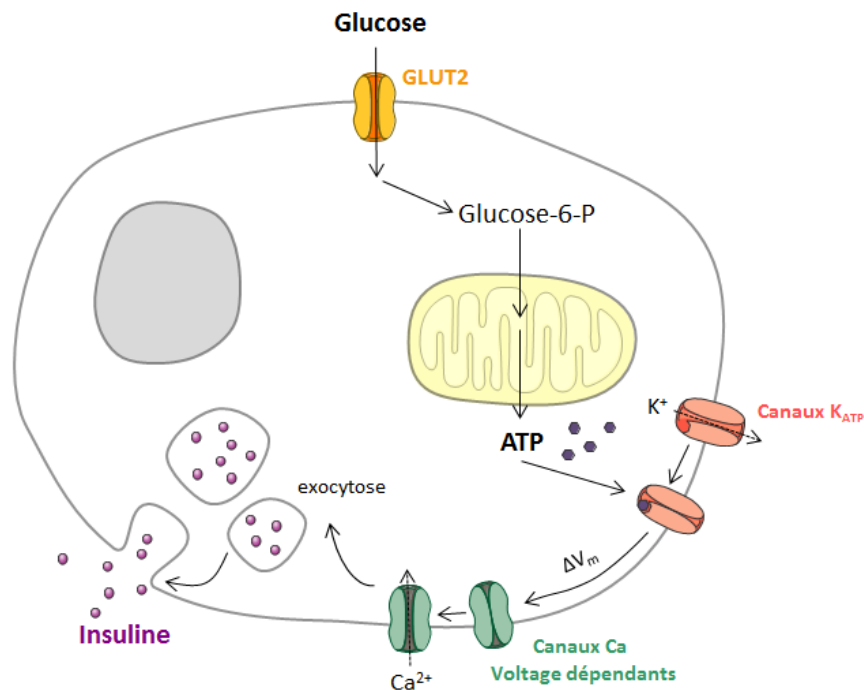


Figure 13 : Schéma représentant la sécrétion d'insuline par la cellule β pancréatique en réponse à une augmentation de la glycémie.

2. Le système nerveux entérique

Au niveau du tube digestif, le glucose induit un grand nombre de réponse, à la fois au niveau intestinal et pancréatique. Lors d'un repas, le passage du bolus alimentaire dans la cavité orale stimule des nerfs sensitifs. Ceci entraîne une petite sécrétion pancréatique d'insuline, qui « amorce » le pancréas pour l'arrivée des nutriments (Teff, 2011). Après digestion enzymatique, le glucose est directement détecté dans la lumière de l'intestin. Sa présence est rapidement signalée au SNC, à la fois par un relais nerveux, *via* les neurones du plexus myentérique et le nerf vague, et indirectement par la libération d'hormones appelées incrélines, dont le GLP1 (Migrenne et al., 2006).

Le glucose est détecté par les cellules entérochromaffines du duodénum, *via* le co-transporteur de glucose couplé au sodium **SGLT3**. Celles-ci libèrent alors de la **sérotonine** (5-HT) qui dans un second temps module l'activité des neurones du système nerveux entérique, par son récepteur 5-HT₃R. Ceci conduit à une activation des afférences vagales jusqu'au DMNV et au NA (Vincent et al., 2011).

Au niveau de l'intestin (iléon et colon proximal), les cellules entéroendocrines L secrètent du **GLP1** en réponse à la présence de nutriments dans le tube digestif. La signalisation induite par le glucose dans ces cellules est proche de celle retrouvée dans la cellule β pancréatique, c'est-à-dire une métabolisation du glucose et la fermeture de **canaux K_{ATP}** (Reimann et al., 2008). De plus, il semblerait que les SGLTs soient également impliqués dans l'excitation des cellules L par le glucose (Reimann et al., 2008).

Liu *et al.* ont montré que certaines cellules entériques excitées par le glucose présentaient également le récepteur à la leptine, renforçant leur rôle dans le contrôle de l'homéostasie énergétique (Liu et al., 1999).

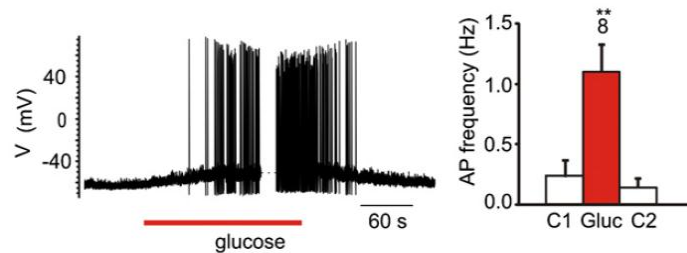


Figure 14 : Les cellules L de l'intestin sont sensibles au glucose.

Représentation d'un enregistrement en patch clamp (cellule entière) d'une cellule stimulée avec 10mM de glucose, appliqué comme indiqué. A droite, moyenne de la fréquence des potentiels d'action avant (C1), pendant (Gluc) et après (C2) application du glucose, mesures effectuées sur 8 cellules. D'après Reimann et al., 2008

3. La veine hépato-portale

Le système hépato-portal reçoit le premier les nutriments issus du tube digestif, juste après leur digestion (Figure 15). La veine hépato-portale est donc un site primaire de la détection des variations de concentrations en glucose (Delaere et al., 2010). La détection de l'hyperglycémie au niveau de la veine hépato-portale est relayée par des fibres afférentes de la branche hépatique du nerf vague, modulant les neurones du TC et du LH (Nijijima, 1982; Shimizu et al., 1983; Adachi et al., 1984). Des enregistrements ont ainsi montré que l'activité électrique de ces fibres nerveuses est inversement proportionnelle à la concentration de glucose dans la lumière de la veine porte. La nature exacte des « détecteurs de glucose » de la veine porte n'est pas encore clairement établie. En revanche, des expériences utilisant des souris inactivées pour différents gènes ou des inhibiteurs pharmacologiques ont montré que la détection du glucose à ce niveau nécessite la présence du transporteur **GLUT2** et du **récepteur au GLP1** (Burcelin et al., 2000a, 2001).

Lors d'une hyperglycémie hépato-portale, ces « détecteurs de glucose » permettent la modulation de différents paramètres du métabolisme énergétique : l'inhibition de la PA (Nijijima, 1982; Tordoff and Friedman, 1986), une sécrétion rapide d'insuline (Fukaya et al., 2007), l'utilisation du glucose par les muscles et le TA brun, et son stockage au niveau

hépatique (Burcelin et al., 2000b). Les différentes réponses ainsi déclenchées permettent le retour à une glycémie basale. Ces détecteurs hépato-portaux sont également importants lors de l'hypoglycémie, où ils participent la mise en place des réponses de contre-régulation *via* la stimulation de l'axe sympatho-surrénal (Hevener et al., 2001; Saberi et al., 2008).

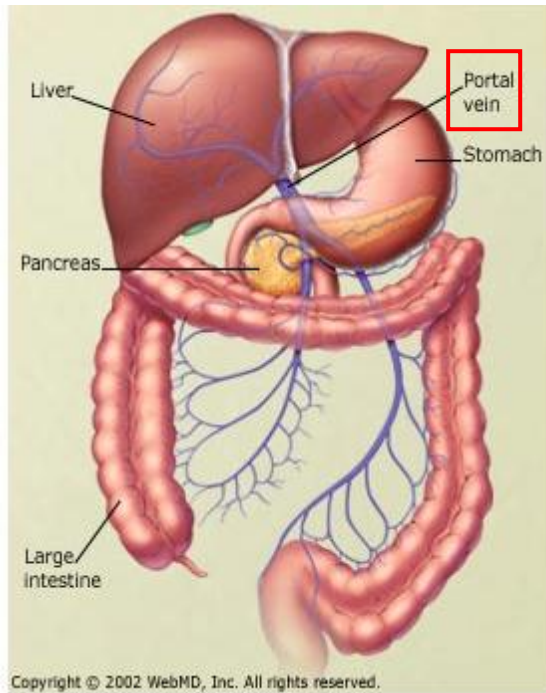


Figure 15 : Le système hépato-portal

La veine porte est formée de l'ensemble des capillaires en provenance de l'intestin et remonte au niveau du foie. A ce niveau, le sang est riche des nutriments absorbés suite à la digestion. Les cellules sensibles au glucose de la veine hépato-portale sont localisées dans un site stratégique pour la détection rapide des variations de concentration en glucose, suite à un repas, par exemple.

La néoglucogénèse intestinale participe également au maintien de la satiété entre deux repas (Delaere et al., 2010). Pendant la période postprandiale, les peptides issus de la protéolyse alimentaire bloquent les récepteurs μ -opioïdes du SN entérique de la veine hépato-portale. Les nerfs du SNA relient cette information vers le SNC, qui favorise la néoglucogénèse intestinale (Mithieux, 2009; Duraffourd et al., 2012). Cette néoglucogénèse conduit à la libération dans la veine porte de glucose, dont la détection est relayée par les afférences nerveuses vagales, comme en témoigne l'absence de diminution de la PA chez des souris KO pour la glucose-6-phosphatase (enzyme de la néoglucogénèse) au niveau intestinal ou suite à une dénervation (Mithieux et al., 2005; Penhoat et al., 2011).

4. Les corps carotidiens

Juste après la séparation des carotides communes en carotides interne et externe, il existe une structure vasculo-nerveuse capable de détecter différents paramètres plasmatiques, appelée corps ou glomus carotidien. Les cellules qui le constituent sont capables de détecter des variations de la concentration plasmatique de glucose et d'oxygène (López-Barneo, 2003). Ces cellules sont en relation avec les fibres nerveuses afférentes du nerf vague qui remontent vers le TC. *Via* une modulation du SNA par la libération de dopamine et/ou de catécholamines, elles pourraient participer aux mécanismes de contre-

régulation mis en jeu pour lutter contre l'hypoglycémie et l'hypoxie (Koyama et al., 2000; López-Barneo, 2003).

La détection de l'hypoglycémie déclenche l'activation de cellules nerveuses du glomus qui met en jeu un courant potassique. Ceci entraîne une cascade de signalisation qui permet l'exocytose des vésicules de neurotransmetteurs (López-Barneo, 2003; García-Fernández et al., 2007). Un certain nombre d'acteurs moléculaires reste encore à déterminer dans cette cascade de transduction activée par le glucose.

5. Les régions centrales extra-hypothalamiques

Le tronc cérébral

Le premier scientifique à mettre en évidence le contrôle de la glycémie par le TC est Claude Bernard en 1849. Il a ainsi montré que l'activation électrique du plancher du tronc cérébral conduisait à une production hépatique de glucose par le biais de la modulation de l'activité du SNA. Les neurones du TC sont en effet capables d'intégrer directement des signaux provenant des afférences nerveuses des tissus périphériques, mais aussi de la circulation sanguine : à cet endroit, la BHE est très lâche (Gross et al., 1990) et permet le passage de facteurs métaboliques et endocriniens à proximité de certains neurones du TC.

Certaines zones de l'AP, du NTS et du DMNV présentent des neurones sensibles au glucose (Yettefti et al., 1997; Dallaporta et al., 1999). Ces neurones sont soit excités ou inhibés par une augmentation de la concentration extracellulaire en glucose. Certains acteurs moléculaires de la cellule β pancréatique ont été retrouvés dans le TC (GLUT2, glucokinase, canaux K_{ATP}), mais leur participation dans la détection du glucose à ce niveau n'est pas totalement démontrée (Ritter et al., 2011). En effet, ces protéines sont également retrouvées dans des neurones non gluco-sensibles. Les neurones gluco-sensibles du TC sont aussi impliqués dans la mise en place des réponses de contre-régulation lors de l'hypoglycémie, en stimulant la sécrétion de catécholamines par les surrénales, *via* le SN sympathique. Les neurones noradrénergiques du NTS sont indispensables à l'élaboration de ces réponses, mais il n'est pas encore démontré qu'ils soient GS (Ritter et al., 2011).

L'organe subfornical

Tout récemment, il a été démontré qu'un autre organe circumventriculaire, l'organe subfornical (SFO), situé dorsalement en bordure du 3V, zone où la BHE est absente, présente des cellules sensibles au glucose (Medeiros et al., 2012)(Figure 16). Certaines sont excitées par une augmentation de la concentration extracellulaire en glucose, alors que d'autres sont inhibées (Medeiros et al., 2012). Les neurones du SFO projettent vers d'autres régions cérébrales comme l'hypothalamus (Lind et al., 1982), et pourraient donc moduler certains neurones hypothalamiques.

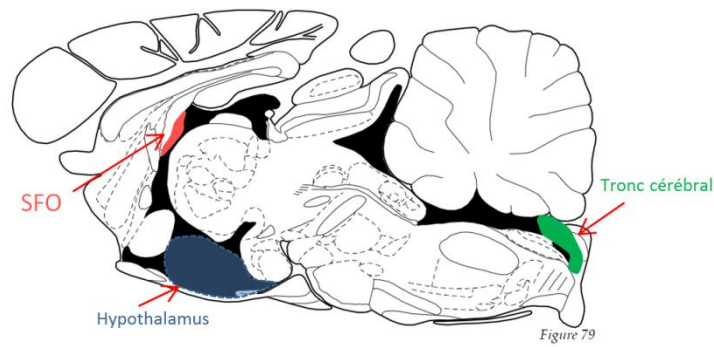


Figure 16 : Localisation du tronc cérébral et de l'organe subfornical (SFO) sur une coupe sagittale de cerveau de rat (L=-0,1mm)

Il existe donc en périphérie, comme dans le SNC, de nombreux tissus/organes capables de détecter des variations de la glycémie et de participer à la régulation du métabolisme énergétique. Dans la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons à la détection du glucose par l'hypothalamus en particulier.

B. Détection hypothalamique du glucose

L'hypothalamus occupe un rôle primordial dans la détection du glucose. En effet, il a été montré que la détection hypothalamique du glucose était altérée chez des animaux obèses, insulino-résistants et/ou présentant un diabète de type II (Blouet and Schwartz, 2010; Marino et al., 2011), et qu'à l'inverse, la modification de cette détection entraînait une obésité ou des défauts de l'homéostasie glucidique (He et al., 2006; Colombani et al., 2009; Carneiro et al., 2012).

Depuis longtemps, l'hypothalamus a été identifié comme le site de détection à la fois de l'hypo- et de l'hyperglycémie, déclenchant des réponses adaptatrices majeures. Avant le début du repas, une très légère hypoglycémie avait été remarquée à la fois chez l'animal (Louis-Sylvestre and Le Magnen, 1980) et l'Homme (Melanson et al., 1999; Campfield and Smith, 2003). Il a alors été suggéré que cette diminution de glucose circulant était un signal pour l'initiation du repas. La détection centrale d'une glucoprivation a été mise en évidence par l'injection dans le 3V d'un analogue non métabolisable du glucose, le 2-désoxy-glucose (2-DG), qui mime une glucopénie (Miselis and Epstein, 1975). Cette détection entraîne la mise en place des réponses dites de « contre-régulation », parmi lesquelles on trouve une stimulation de la production hépatique de glucose, la sécrétion pancréatique de glucagon et l'augmentation de la PA (Marty et al., 2007). Les voies de signalisation impliquées ne seront pas détaillées dans ce manuscrit.

Dans ce chapitre, nous nous attacherons à la description plus précise de la **détection hypothalamique de l'hyperglycémie**, qui a été au centre de mon travail. L'ensemble des études menées sur cette détection montre une modulation de l'expression et de la libération des neuropeptides orexigènes et anorexigènes, qui limitent la PA, accompagnées d'une stimulation du stockage hépatique de glucose sous forme de glycogène, de la sécrétion d'insuline, et des dépenses énergétiques (stimulation de la thermogenèse *via* le SNA) afin de restaurer une glycémie physiologique et plus largement, participer à l'équilibre énergétique de l'organisme.

1. Le glucose dans le cerveau

Avant d'étudier les mécanismes cérébraux de détection des variations de glycémie, je décrirai brièvement les mécanismes d'entrée du glucose dans le SNC ainsi que sa concentration moyenne dans ce tissu.

Le cerveau est isolé de la circulation sanguine par la BHE dans la plupart des régions cérébrales, excepté au niveau de régions subventriculaires. Les cellules endothéliales formant les vaisseaux et capillaires cérébraux sont liées entre elles par des jonctions serrées assurant une perméabilité sélective. Ces vaisseaux sont également recouverts des pieds astrocytaires. De plus, le glucose est une molécule hydrosoluble qui n'entre pas librement

dans la cellule. Son passage au travers la membrane plasmique ne peut s'effectuer qu'à partir de transporteurs de glucose (GLUTs), qui assurent une diffusion facilitée suivant le gradient de concentration. Ce phénomène est stéréospécifique et saturable, avec des variations suivant les isoformes. Leur expression cellulaire et/ou tissulaire ainsi que leurs caractéristiques cinétiques sont répertoriées dans le tableau ci-dessous.

Transporteur de glucose	Distribution cérébrale	Km pour le glucose
GLUT1	Cellule endothéliale (55kDa) Astrocyte (45kDa) Tanycyte Ependymocyte Oligodendrocyte	1-5 mM
GLUT2	Astrocytes/Neurones (expression discrète)	15-20 mM
GLUT3	Neurones	1-3 mM
GLUT4	Cellules du Cortex, Cervelet et Hypothalamus (faible)	2-5 mM
GLUT5	Microglie, Cellule endothéliale de la BHE (transport du fructose)	6 mM
GLUT6	Cerveau (ARNm seulement)	?
GLUT8	Neurones : hippocampe, cortex olfactif, amygdale, hypothalamus, NTS, cervelet	2 mM
GLUT10	Cerveau	≈ 0,3 mM
GLUT11	Cerveau	?

GLUT1 est exprimée dans la quasi-totalité des cellules de l'organisme. Dans le cerveau, l'expression de GLUT1 par les cellules endothéliales et gliales assure l'entrée du glucose dans le parenchyme cérébral (Vannucci et al., 1997). Avec un Km autour de 1-3 mM, GLUT3 est saturé à la plupart des taux de glucose cérébraux permettant un approvisionnement relativement constant en glucose aux neurones en conditions physiologiques. GLUT4, normalement présent dans les tissus insulino-sensibles (où il est adressé à la membrane plasmique en présence d'insuline) est exprimé au niveau du cortex, de l'hippocampe, du cervelet et moins abondamment au niveau de l'hypothalamus (Leloup et al., 1996; El Messari et al., 2002).

GLUT2 se distingue des autres isoformes par sa faible affinité pour le glucose. Cela lui permet de transporter le glucose proportionnellement à sa concentration circulante et de ne pas être saturé lorsque la glycémie augmente. Au niveau central, notre groupe a pu mettre en évidence la présence de ce transporteur dans différentes structures impliquées dans la régulation nerveuse du métabolisme et de la PA, parmi lesquelles différents noyaux hypothalamiques tels que le VMH et le NA (Leloup et al., 1994). Notons que dans ces

structures, GLUT2 est exprimé dans les neurones mais majoritairement dans les astrocytes (Arluison et al., 2004a, 2004b). Son implication dans les mécanismes centraux de la détection du glucose sera développée ultérieurement.

La concentration en glucose dans le parenchyme nerveux est, en général, plus faible que la glycémie. Au niveau hypothalamique, elle se situe entre 0,7 et 2,5 mM (Silver and Erecińska, 1994; de Vries et al., 2003). Lors d'une hyperglycémie sévère, cette concentration peut s'élever à environ 5 mM, mais ne dépasse jamais 10mM. Au niveau du NA, la BHE a été décrite comme plus lâche et ce noyau se situe juste au-dessus de l'éminence médiane, richement vascularisée. Ceci laisse à penser que la concentration en glucose dans ces régions seraient beaucoup plus proche de la glycémie. Cette question reste sujette à controverse dans la littérature (Dunn-Meynell et al., 2009).

La localisation et la dose de l'injection de glucose dans/vers le SNC, censée mimer l'hyperglycémie, est donc importante pour rester dans des conditions physiologiques. L'injection de glucose dans le 3V engendre une diminution de la PA, de même que celle dans le NA (Davis et al., 1981; Kurata et al., 1986; Cha et al., 2008; Carneiro et al., 2012). Lorsque cette injection est réalisée par la carotide vers le cerveau, on note une forte expression du marqueur d'activation cellulaire c-Fos dans le NA et le PVN (Guillod-Maximin et al., 2004), ainsi qu'une augmentation de l'activité électrique multicellulaire au niveau du NA (Leloup et al., 2006). Cette activation électrique conduit à une activation vagale qui déclenche une sécrétion d'insuline (Leloup et al., 2006). De manière intéressante, l'activation c-Fos est retrouvée également dans les astrocytes (Guillod-Maximin et al., 2004)([Figure 17](#)). Par ailleurs, l'inhibition du métabolisme des glucides uniquement dans l'astrocyte supprime l'activation neuronale du NA mesurée *via* c-Fos et la sécrétion d'insuline observée en périphérie (Guillod-Maximin et al., 2004).

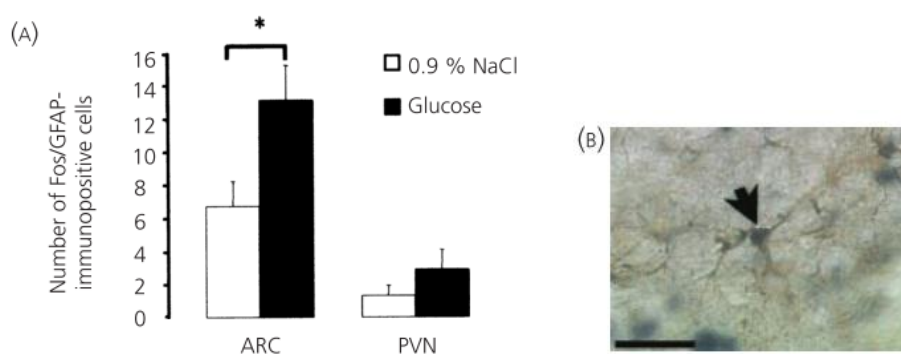


Figure 17 : Effet du glucose hypothalamique sur les astrocytes

A] Suite à une injection intracarotidienne de glucose, le nombre d'astrocytes c-Fos+ est augmenté dans le NA (ARC) mais non dans le PVN. **B]** Illustration d'un astrocyte activé dans le NA (marquage c-Fos+) après l'injection de glucose. Barre d'échelle = 30µm. D'après Guillod-Maximin et al., 2004.

La capacité de l'hypothalamus à détecter une hyperglycémie est à relier avec l'existence de populations neuronales spécifiques dont l'activité électrique varie en fonction des concentrations de glucose. Ces populations ont été mises en évidence par des études d'électrophysiologie sur coupes fraîches.

2. Les populations neuronales gluco-sensibles

Les neurones gluco-sensibles présentent la particularité d'utiliser le glucose à la fois comme un substrat énergétique mais aussi comme un « signal ». Ainsi, leur activité électrique est spécifiquement reliée à des variations de concentrations en glucose, que ce soit une augmentation ou une diminution de cette concentration.

a) Sensibilité au glucose et/ou lactate

Depuis la découverte de l'existence de neurones sensibles au glucose (« gluco-sensibles » ou GS) dans l'hypothalamus (Anand et al., 1964; Oomura et al., 1969), leur caractérisation s'est développée simultanément aux techniques, notamment grâce au patch clamp qui consiste en l'enregistrement direct de l'activité électrique d'une seule cellule. Les neurones GS peuvent être classés selon leur réponse à une variation de la concentration extracellulaire de glucose. Suivant les études, les « sauts » de glucose sont très variables. Dans l'équipe, nous nous sommes basés sur le classement suivant, avec des mesures effectuées dans le NA de souris : 1) les neurones gluco-excités (GE) et 2) gluco-inhibés (GI), dans la gamme de concentration de glucose de 0 à 5 mM et 3) les neurones gluco-excités HGE et 4) gluco-inhibés HGI, dans une gamme haute de concentration de glucose, de 5 à 20 mM (Fioramonti et al., 2004) (Figure 18). Ces neurones sont respectivement excités ou inhibés par une augmentation de la concentration de glucose. Lors d'une diminution de la concentration en glucose, leur réponse est inversée. Par exemple, un neurone GI sera inhibé par un saut 0 à 5 mM alors que le neurone GE sera excité par le même saut (Figure 18).

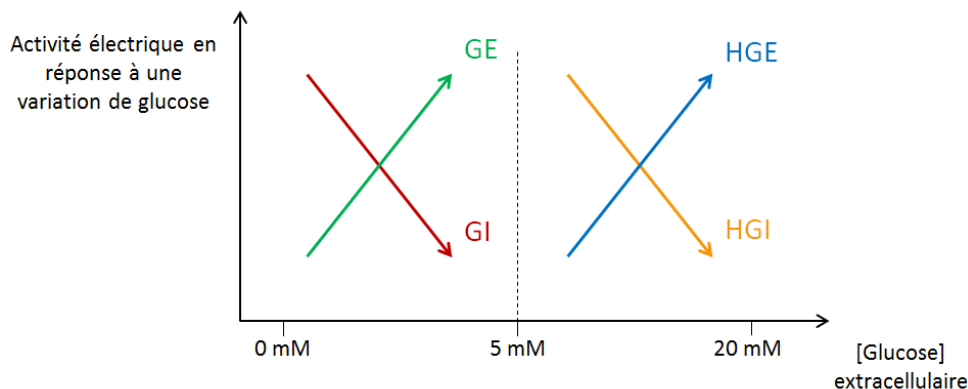


Figure 18 : Représentation schématique de l'activation électrique des quatre sous types neuronaux du NA en réponse à une variation de glucose

Les neurones sensibles au glucose ont été localisés dans les noyaux VMH, NA, DMN, PVN, le noyau supra-chiasmatique et le LH. Si on regarde leurs proportions, les neurones GE du VMH représentent 15 à 30 % de la population neuronale totale (Song et al., 2001). Dans le DMN et le LH, ce sont des neurones GI qui sont majoritairement présents (30-40 % de la population totale). Dans le NA, 20 à 25% des neurones étudiés sont GE, 19% HGE et 7% HGI. Par ailleurs, il existe une régionalisation de ces types neuronaux, avec une majorité de GE dans le NA latéral et une majorité de GI dans le NA médian (Fioramonti et al., 2004; Wang et al., 2004).

De manière intéressante, certains neurones GS du NA et du LH sont également sensibles au lactate (Yang et al., 1999, 2004; Song and Routh, 2005; Venner et al., 2011). Dans ces études, le lactate a un effet inhibiteur sur la réponse des neurones GI : lors d'une augmentation de la concentration en glucose, la présence de lactate limite l'hyperpolarisation des neurones GI normalement présente avec le glucose seul. Le lactate est donc également détecté comme une ressource énergétique par les neurones GS. *In vivo*, la perfusion de lactate dans le VMH est suffisante pour empêcher la mise en place des réponses de la contre-régulation lors d'une hypoglycémie (Borg et al., 2003). Pendant un clamp hypoglycémique, la libération de glucagon et d'adrénaline est fortement diminuée, résultat également obtenu suite à la perfusion de glucose (Borg et al., 2003).

Actuellement, il n'a hélas pas encore été découvert de marqueurs moléculaires communs à ces différentes populations de neurones sensibles au glucose, ce qui rend leur étude difficile et parcellaire.

b) Phénotypes neuronaux des neurones gluco-sensibles

L'utilisation de souris modifiées génétiquement pour exprimer la GFP (*Green Fluorescent Protein*) dans des neurones particuliers a grandement contribué à la caractérisation du phénotype d'une partie des neurones GS.

Dans le NA, les réponses de type GI (neurone excité par une diminution de glucose de 5 à 0 mM, cas d'hypoglycémie) sont systématiquement enregistrées sur des neurones NPY (Muroya et al., 1999; Fioramonti et al., 2007; Mountjoy et al., 2007). Cela est cohérent avec le fait que l'hypoglycémie stimule la PA et l'expression de NPY. En revanche, seulement un tiers des neurones NPY étudiés sont sensibles au glucose. Les études sont controversées quant à la sensibilité au glucose des neurones POMC. Certaines rapportent l'absence d'activation électrique en réponse au glucose dans les neurones POMC (Fioramonti et al., 2007), alors que d'autres décrivent une augmentation de l'activité électrique d'environ 50% des neurones POMC après un saut de glucose de 3 à 5mM. Cette réponse met en jeu le canal K_{ATP} et une libération dose-dépendants d' α -MSH en fonction de la concentration de glucose (Ibrahim, 2003; Claret et al., 2007; Parton et al., 2007). Ces études ont été effectuées sur

différentes lignées de souris GFP, ce qui pourraient être à l'origine des différences de réponses observées.

Les neurones du VMH sensibles au glucose n'ont pas de phénotype neuropeptidique identifié, mais les populations neuronales de ce noyau semblent impliqués dans les réponses à l'hypoglycémie (Song et al., 2001; Fioramonti et al., 2010). Quelques pistes portent à croire que les neurones SF1 du VMH, qui sont glutamatergiques, pourraient être GI et participeraient à la mise en place des réponses de contre-régulation (Tong et al., 2007).

Au niveau du LH, les neurones à orexines présentent quelques particularités quant à leur réponse au glucose. Les neurones à orexines ont des réponses de type GI. Bien qu'ils semblent globalement plus impliqués dans des réponses à l'hypoglycémie (Moriguchi et al., 1999; Cai et al., 2001), il a récemment été démontré qu'ils présentaient une réponse adaptative aux variations de concentrations de glucose, en ajustant leur potentiel membranaire de repos aux niveaux de glucose (Williams et al., 2008). De plus, l'activation des neurones à orexines serait indépendante de la métabolisation du glucose (González et al., 2009; Karnani and Burdakov, 2011). Les neurones MCH, quant à eux, sont majoritairement GE (Burdakov et al., 2005; Kong et al., 2010). D'un point de vue finaliste, il n'est pas surprenant que les neurones à MCH et à orexines soient inversement stimulés par le glucose, car ils modulent l'état d'éveil (favorable à la recherche de nourriture) de manière antagoniste : en effet, l'activation des neurones à MCH favorise le sommeil, alors que celle des neurones à orexines favorise l'activité motrice (Karnani and Burdakov, 2011).

3. La transmission du signal

Parallèlement à la détermination du phénotype des neurones GS, de nombreuses équipes s'attachent à déterminer quelles sont les voies de signalisation qui sont impliquées lors de la détection du glucose. Ainsi, un certain nombre d'analogies avec la cellule β du pancréas a pu être mis en évidence, en particulier pour les neurones GE (Yang et al., 1999; Schuit et al., 2001). Le mécanisme de la détection du glucose au niveau hypothalamique ferait ainsi intervenir le couple GLUT2/Glucokinase et le canal K_{ATP} . Des données récentes montrent également le rôle de l'AMPK et des espèces actives de l'oxygène d'origine mitochondriales (mEAOs) (Leloup et al., 2006; Claret et al., 2007; Colombani et al., 2009). L'ensemble de ces signalisations passe par une métabolisation du glucose et implique la production de signaux par la mitochondrie. L'équipe de Denis Burdakov a mis en évidence, dans le LH, une détection du glucose *indépendante* de la métabolisation de celui-ci (González et al., 2008; González et al., 2009).

a) Analogies avec la cellule β pancréatique

La cellule β pancréatique est la cellule « modèle » quant à la détection du glucose. Beaucoup d'études ont cherché à déterminer si les acteurs clés de la signalisation β pancréatique lors d'une hyperglycémie étaient également présents au niveau hypothalamique. Ainsi, une analogie entre neurones GE et cellules β pancréatiques a pu être établie en termes de mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse au glucose (Yang et al., 1999). Rappelons que cette détection au niveau de la cellule β fait intervenir successivement le couple GLUT2/glucokinase et le canal K_{ATP} (cf. p. 42-43).

GLUT2

Notre équipe a montré pour la première fois que GLUT2 est présent dans des régions cérébrales renfermant des neurones sensibles au glucose, en particulier le NA (Leloup et al., 1994; Arluison et al., 2004a, 2004b). Ce transporteur est nécessaire à la détection d'une hyperglycémie cérébrale par le NA pour l'activation de l'axe hypothalamo-pancréatique, qui conduit à une sécrétion d'insuline (Leloup et al., 1998). L'injection d'antisens GLUT2 dans le NA supprime la sécrétion d'insuline induite par une hyperglycémie uniquement cérébrale (voie intracarotidienne, sans modification de la glycémie périphérique) (Figure 19). De la même manière, la perte de l'expression de GLUT2 empêche l'expression normale des neuropeptides NPY et POMC suite à un jeûne ou à une réalimentation (Bady et al., 2006). De manière intéressante, GLUT2 n'est pas retrouvé qu'au niveau des neurones mais aussi dans différents types cellulaires : préférentiellement dans les astrocytes, mais aussi dans les épendymocytes et les tanocytes (Leloup et al., 1994; Ngarmukos et al., 2001; Arluison et al., 2004a, 2004b).

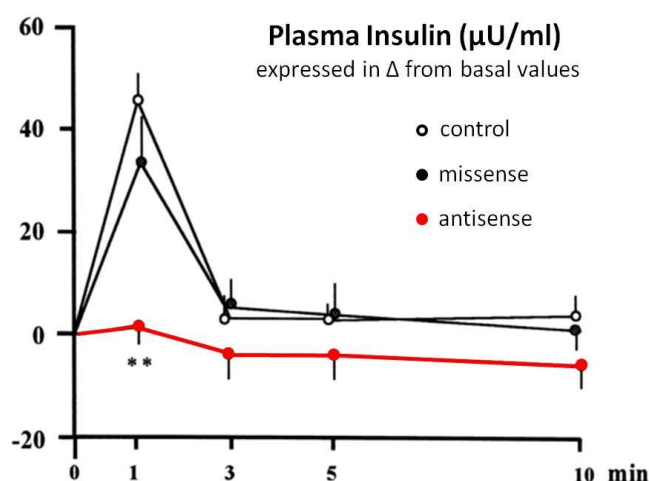


Figure 19: Sécrétion d'insuline, *in vivo*, en réponse à un bolus carotidien de glucose, vers le cerveau

Les rats ayant reçus des antisens contre GLUT2 dans le NA ne présentent plus l'augmentation de sécrétion d'insuline (n=4) normalement retrouvée chez les rats contrôles ou ayant reçu une séquence missens (control, n=6 ; missense, n=4). D'après Leloup et al., 1998

Le rôle de GLUT2 astrocytaire a également été mis en avant dans la détection de l'hypoglycémie. La réexpression de GLUT2 uniquement au niveau glial (cellules GFAP positives), chez des souris invalidées pour ce transporteur permet en effet de restaurer l'activation du TC et la sécrétion de glucagon en réponse à une hypoglycémie (Marty et al.,

2005). L'ensemble de ces résultats montre d'une part que GLUT2 est, comme dans la cellule β , impliqué dans la détection du glucose et d'autre part, suggèrent l'importante participation des astrocytes dans la détection cérébrale du glucose.

La glucokinase

L'expression de la glucokinase (GK), qui participe à l'étape-clé de la glycolyse par la phosphorylation du glucose, a été mise en évidence au niveau de l'hypothalamus et plus particulièrement au niveau du VMH et du NA (Jetton et al., 1994; Lynch et al., 2000; Dunn-Meynell et al., 2002). Comme pour GLUT2, la GK est retrouvée dans différents types cellulaires : les neurones, les astrocytes, les épendymocytes et les tanocytes. Elle est exprimée dans 64% des neurones GE *in vitro* et dans 43% des GI du VMH. Elle est présente dans 75% des neurones NPY du NA (Lynch et al., 2000).

Le canal K_{ATP}

Les analogies faites avec les mécanismes opérant dans la cellule β ont permis d'identifier également l'implication du canal K_{ATP} -dépendant dans le mécanisme de détection du glucose au niveau hypothalamique. L'activité de ce canal est modulée par la fixation de ligands tels que l'ATP (pour le fermer) ou l'ADP (quand il est ouvert), le $PI_{4,5}P_2$ (Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate), les sulfonylurées et des lipides tels que l'oléoyl-CoA par exemple (Nichols, 2006).

L'implication de ce canal dans la réponse des neurones GE a été démontrée (Dunn-Meynell et al., 1998; Lee et al., 1999; Miki et al., 2001; Ibrahim, 2003; Kong et al., 2010). La leptine et l'insuline sont également capables d'inhiber des neurones du NA *via* l'ouverture de ce canal (Spanswick et al., 1997, 2000; van den Top et al., 2004). Cette ouverture est induite par sa phosphorylation par la PI3K, enzyme commune aux voies de transduction de ces deux hormones (Benoit et al., 2004; Marino et al., 2011).

On note également l'émergence dans le NA d'un autre mécanisme de transduction qui serait indépendant du canal K_{ATP} . Les neurones HGE du noyau arqué voient leur activité augmenter lorsque la concentration en glucose passe de 5 à 20 mM *via* un mécanisme indépendant du canal K_{ATP} . En effet, les canaux K_{ATP} sont déjà clos à des concentrations de 5 mM. Un autre mécanisme, non identifié, opérerait dans ces intervalles de concentration et mettrait en jeu une conductance cationique non sélective (Fioramonti et al., 2004, 2007).

Nous venons de voir que la signalisation induite par le glucose impliquait la production d'ATP par la mitochondrie. Nous allons voir que la mitochondrie est un véritable « détecteur » métabolique, de par l'émission des signaux en relation directe avec le statut énergétique.

b) Les mEAOs

Une autre voie de signalisation, mettant également en jeu la mitochondrie, a été décrite (Horvath et al., 2009; Leloup et al., 2011). Lors de la métabolisation du glucose, les équivalents réduits formés (NADH_2 et FADH_2) sont oxydés dans la chaîne respiratoire. L'afflux d'électrons génère des espèces radicalaires particulières : les espèces actives de l'oxygène d'origine mitochondriale (mEAOs), représentés par l'anion superoxyde O_2^- et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Figure 20).

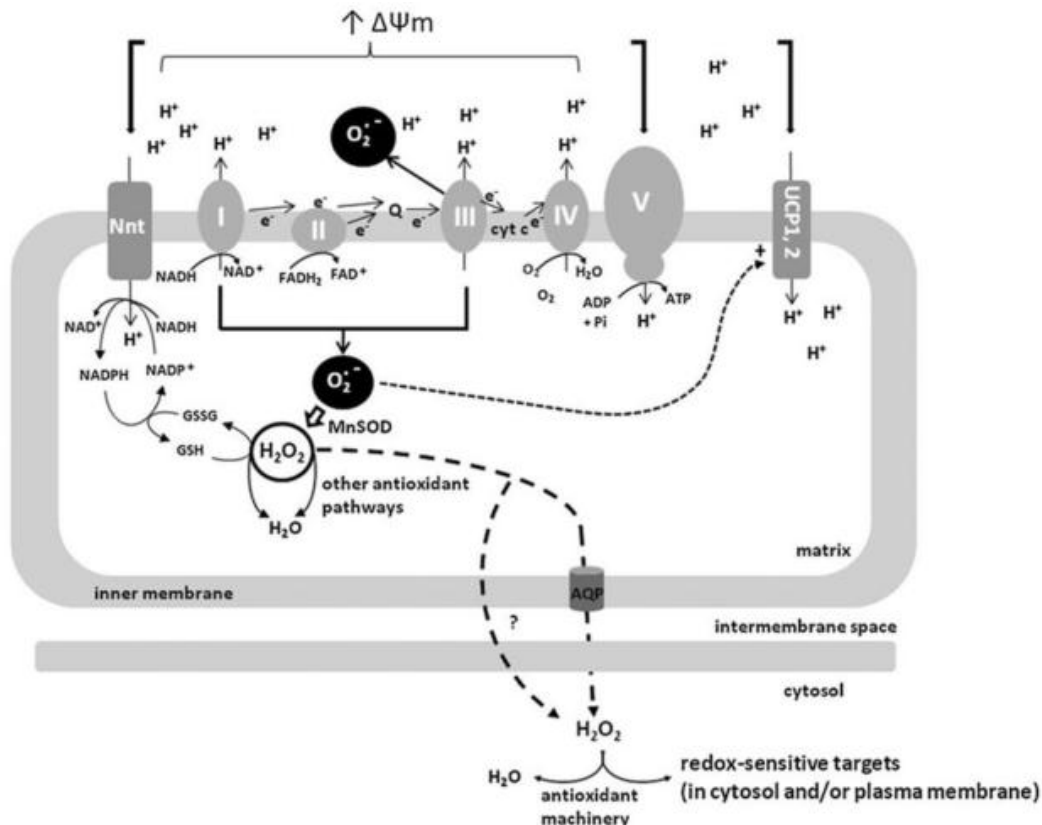


Figure 20 : Schéma illustrant les événements mitochondriaux conduisant à la production de mEAOs

Des équivalents réduits sont produits (NADH et FADH_2) suite à la métabolisation des nutriments. Ils sont oxydés par les complexes de la chaîne respiratoire (complexe I à IV), ce qui permet la production d'un gradient d'électrons entre l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. La dissipation de ce gradient par le complexe V permet la synthèse d'ATP à partir d'ADP. Les protéines découplantes (UCPs) dissipent également ce gradient et diminuent la synthèse d'ATP. Lorsque la quantité d'équivalents augmente, le transfert d'électrons s'accélère, et certains peuvent alors se lier à une molécule d'oxygène, ce qui conduit à la production de l'anion superoxyde (O_2^-). Celui-ci est transformé en H_2O_2 , qui constitue la molécule « signal » des mEAOs. D'après Leloup et al., 2011

Les mEAOs sont produits de manière physiologique suite à la métabolisation du glucose et des acyl-CoA. Ils seraient donc un signal « d'abondance » énergétique. Notre équipe a montré que cette production de mEAOs est indispensable pour la détection du glucose (Leloup et al., 2006) et que le glucose déclenche la fission des mitochondries, essentielle à la signalisation mEAOs (Carneiro et al., 2012). Actuellement, le(s) effecteur(s)

cellulaire(s) reliant l'augmentation d'activité électrique enregistrée dans le NA à cette signalisation mEAOs en réponse au glucose n'est pas identifié.

c) *L'AMPK*

L'AMPK (*AMP activated protein kinase*) est décrite comme une jauge intracellulaire du statut énergétique de l'organisme (Belgardt et al., 2009; Stark et al., 2012). C'est une enzyme ubiquitaire constituée de trois sous-unités dont l'activité dépend de l'état énergétique de la cellule. Ainsi, son activité est augmentée en condition de déficit énergétique (jeûne, hypoglycémie) (McCrimmon et al., 2004). Pour limiter les dépenses d'énergie, l'AMPK inhibe les voies métaboliques cataboliques, telles que la β -oxydation (*via* l'inhibition de CPT1) et active les voies productrices d'énergie (Hardie and Carling, 1997). A l'inverse, l'activation de l'AMPK diminue après une PA (Minokoshi et al., 2004).

L'activité de l'AMPK est modulée par l'insuline, la leptine et le glucose, ce qui conduit à la modification de l'expression et la libération des neuropeptides NPY/AgRP et POMC, conduisant à la production hépatique de glucose, à la régulation de la PA et *in fine* du poids corporel (Minokoshi et al., 2004; Claret et al., 2007; Mountjoy et al., 2007; Cha et al., 2008; Yang et al., 2010; Kohno et al., 2011).

Comme mentionné plus tôt, l'AMPK module le métabolisme des acyl-CoA en inhibant l'ACC, ce qui empêche la production de malonyl-CoA, et induit une augmentation de la PA. C'est donc une signalisation au carrefour de la détection du glucose *et* des AGL (Kim et al., 2004; He et al., 2006; Poci et al., 2006)(voir [Figure 12](#), p. 39).

d) *Détection indépendante du métabolisme*

Nous venons de voir différents acteurs de la détection hypothalamique du glucose. Toutes ces signalisations nécessitent la métabolisation du glucose par la mitochondrie, qui a un rôle de « détecteur » métabolique.

Ces dernières années, l'équipe de Burdakov a mis en évidence que les neurones à orexines du LH présentent des caractéristiques particulières. D'une part, comme indiqué plus tôt, 70% des neurones à orexines présentent une réponse GI avec une hyperpolarisation transitoire suite à une augmentation de la concentration extracellulaire en glucose (Williams et al., 2008). D'autre part, leur réponse est indépendante de la métabolisation du glucose (Karnani and Burdakov, 2011). En effet, la perfusion de glucose directement dans la cellule n'induit pas de réponse inhibitrice, alors que la même cellule répond lorsque le glucose est appliqué à l'extérieur de la cellule (González et al., 2008). De plus, l'activité de ces neurones persiste en présence d'inhibiteurs de la glucokinase (González et al., 2008). Curieusement, le 2-DG (non métabolisable) induit une augmentation

des réponses par rapport au glucose seul (González et al., 2008), alors que la présence de métabolites alternatifs (pyruvate ou lactate) inhibe la réponse à une augmentation de concentration en glucose de 1 à 5 mM (Venner et al., 2011). Leur hypothèse est que les neurones à orexines se conduisent comme des détecteurs de glucose « conditionnels » qui répondent préférentiellement au glucose lorsque le statut énergétique est diminué (Venner et al., 2011).

D'autres équipes ont également rapporté l'existence, *in vitro*, de neurones GE qui répondent à des analogues non métabolisables du glucose (O'Malley et al., 2006). Cette réponse passerait par les transporteurs SGLTs, qui induisent une dépolarisation de la cellule suite à l'entrée de Na⁺ qui accompagne le transport de glucose.

Enfin, il faut savoir que le transporteur GLUT2 peut également agir comme récepteur, en engageant une signalisation intracellulaire indépendante du métabolisme du glucose (Stolarczyk et al., 2010). Les souris dont GLUT2 est tronqué en C-terminal (plus d'activité de récepteur, mais l'activité de transporteur est intacte) présentent une augmentation de leur PA, accompagnée d'une augmentation des ARNm des orexines et une diminution de TRH, ce qui va dans le même sens que les effets observés lors de la suralimentation (Stolarczyk et al., 2010). Les voies de signalisation induites par la stimulation du « transcepteur » GLUT2 sont encore inconnues.

4. Les cellules gliales et la détection du glucose

Les cellules gliales, astrocytes et tanocytes, sont présentes à l'interface entre vaisseaux sanguins et neurones ou au niveau des ventricules. Leur rôle dans la transmission de « l'information glucose » aux neurones adjacents est donc non négligeable (Peruzzo et al., 2000; Ciofi et al., 2009; Mullier et al., 2010). Astrocytes et tanocytes sont issus du même lignage et partagent des caractéristiques communes. Dans ce paragraphe, nous ne décrirons que les tanocytes, les astrocytes faisant l'objet du paragraphe suivant.

De plus en plus d'études montrent l'implication des tanocytes dans la détection centrale du glucose. En effet, la destruction des tanocytes bordant le 3V est suffisante pour modifier la glycémie et la PA chez des rats (Sanders et al., 2004). Notons que les tanocytes en bordure du MBH expriment abondamment GLUT2 et la GK, des acteurs essentiels de la détection du glucose (García et al., 2003; Arluison et al., 2004a; Millán et al., 2010; Balmaceda-Aguilera et al., 2012).

Il faut savoir qu'il existe quatre sous-types de tanocytes, en fonction de leur localisation et de leurs propriétés (Figure 21)(Mullier et al., 2010). Les tanocytes β 1 et β 2 présentent une morphologie caractéristique, avec la présence de longs prolongements dans le MBH, ce qui sous-tend une interaction avec les neurones GS de cette région. De plus, de par la désorganisation des jonctions serrées à ce niveau, les tanocytes sont plus

« perméables » au passage de molécules en provenance du LCR, que les autres cellules bordant le 3V (Mullier et al., 2010).

Jusqu'à présent, plusieurs études ont rapportées une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire des tanycytes en réponse au glucose, *in vitro* ou *ex vivo*. Les tanycytes sont activés *via* une signalisation purinergique, suite à la production d'ATP par la métabolisation du glucose (Dale, 2011; Frayling et al., 2011). Les tanycytes expriment également GLUT1 (Peruzzo et al., 2000) et des transporteurs aux monocarboxylates (MCTs) qui exportent du lactate (Cortés-Campos et al., 2011). Nous verrons dans le prochain paragraphe qu'il a été montré que le lactate, outre sa fonction énergétique, est un acteur intermédiaire probablement très important dans la détection neuronale du glucose.

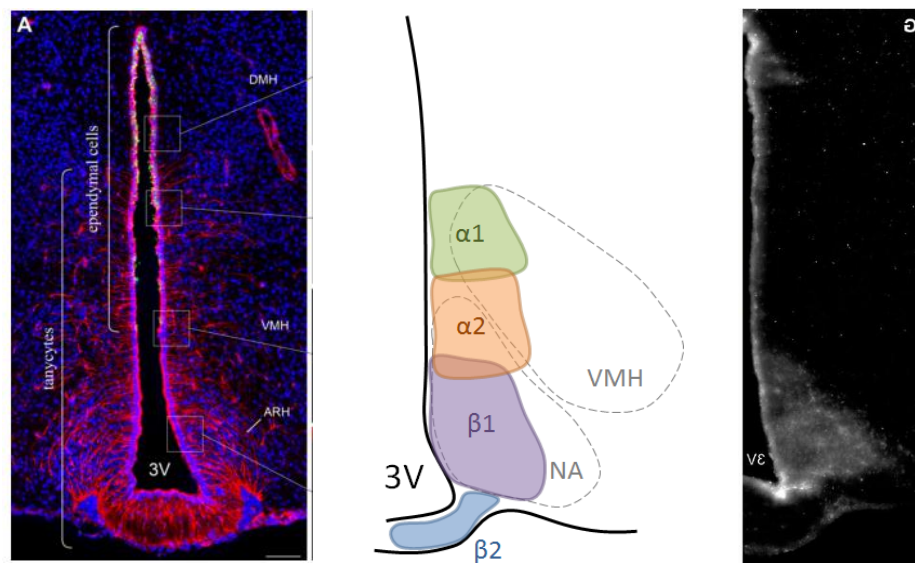


Figure 21 : Les tanycytes en bordure du 3V

A gauche, coupe histologique d'hypothalamus de souris (en bleu, les noyaux ; en rouge, la vimentine, marqueur des tanycytes). Les tanycytes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont localisés dans la partie dorsale du 3V, avec des prolongements restreints et ne permettent pas le passage de molécules du LCR au parenchyme hypothalamique. A l'inverse, l'absence de jonctions serrées (à droite, du bleu Evans injecté dans le 3V diffuse dans le MBH) et la présence de prolongements dans le MBH des tanycytes $\beta 1$ laissent à penser qu'ils participent à la détection de variations de concentrations de métabolites dans le LCR. D'après Mullier et al., 2010.

Le rôle émergent des tanycytes en tant qu'acteurs de la détection du glucose soulève des questions sur l'interprétation des études réalisant des injections dans le 3V. En effet, les résultats obtenus s'orientent préférentiellement vers la participation des neurones uniquement en négligeant les tanycytes, qui sont pourtant les premières cellules en contact avec les métabolites/agents pharmacologiques depuis cette voie. L'étude du rôle spécifique des tanycytes *in vivo* reste cependant délicate, car ils présentent beaucoup de caractéristiques communes aux astrocytes.

III. Les astrocytes, partenaires de la détection du glucose

Les astrocytes ont longtemps été sous-estimés dans leurs fonctions, considérés comme des cellules de soutien des neurones sans fonction particulière. Pourtant, depuis quelques décennies, un nombre croissant d'étude démontrent l'implication des astrocytes dans le maintien de la physiologie nerveuse, mais aussi probablement dans l'origine de certaines pathologies (Allaman et al., 2011). Parmi les nombreuses fonctions qui leur ont été attribuées, on peut citer : l'homéostasie hydrique, ionique (pH) et du glutamate dans le SNC, la réparation tissulaire, la modulation de l'activité synaptique *via* la libération de « gliotransmetteurs » ainsi que le remodelage des synapses et la participation aux défenses anti-oxydantes. Dans un souci de priorité, ces aspects ne seront pas développés dans ce manuscrit.

De par leur équipement protéique et leur localisation, les astrocytes sont « en première ligne » pour capter les métabolites énergétiques nécessaires au fonctionnement neuronal. La spécificité du mécanisme de détection du glucose entre les compartiments sanguin/astrocytaire/neuronal comparativement à l'utilisation à des fins énergétiques du glucose n'est pas connue. Néanmoins, plusieurs études laissent à penser que les astrocytes sont des intermédiaires indispensables pour que cette détection se réalise correctement par les neurones GS.

A. Les astrocytes : à l'interface entre sang circulant et neurones

Dès 1893, Golgi et ses collaborateurs suggèrent que la glie pourrait être un intermédiaire pour l'apport énergétique vers les neurones. Elle occupe en effet une position stratégique entre la circulation sanguine (source d'O₂ et de substrats énergétiques ainsi que pour l'élimination des déchets) et le parenchyme nerveux. En 1895, Lenhossek introduit le terme "astrocyte", car ces cellules présentent de nombreux prolongements, les faisant ressembler à une étoile. En leur donnant un nom à part entière, il voulait souligner que les astrocytes sont aussi importants que les neurones.

Les astrocytes représentent plus de la moitié de la population cellulaire cérébrale (en moyenne). Ils forment des cellules arborescentes qui présentent de nombreux prolongements. Certains sont fins et entourent les boutons synaptiques, formant ainsi la synapse tripartite, composée d'un neurone pré-synaptique, d'un postsynaptique et d'un astrocyte. D'autres prolongements spécialisés, plus larges, recouvrent les vaisseaux sanguins et constituent les **pieds astrocytaires**. En raison de leur grande hétérogénéité, il n'existe, hélas pour le moment, pas de marqueurs communs à tous les types d'astrocytes connus. Ils présentent effectivement des caractéristiques morphologiques et des propriétés très diverses.

Au niveau morphologique, les astrocytes de primates sont plus complexes et plus divers que ceux des rongeurs (Oberheim et al., 2009) : les astrocytes humains sont en général plus large en diamètre et présentent plus de prolongements. Ces différences entre Homme et rongeurs sont peut-être à l'origine des réponses cérébrales plus complexes chez l'Homme. Les mieux décrits sont, dans la substance grise, les **astrocytes protoplasmiques** qui présentent de nombreux prolongements très fins et occupent un volume assez important. Organisés en micro-domaines (Bushong et al., 2002), chaque astrocyte protoplasmique limite les chevauchements de prolongements avec les astrocytes voisins (Figure 22). Dans la substance blanche, les **astrocytes fibreux** ont des prolongements plus larges et moins nombreux.

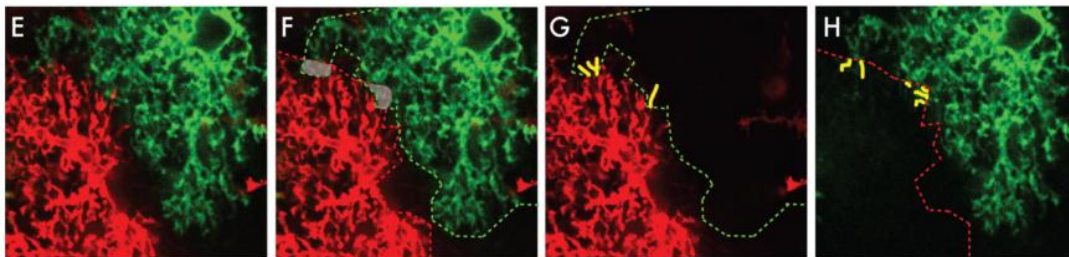


Figure 22 : Les astrocytes protoplasmiques sont organisés en micro-domaines

Coloration de deux astrocytes corticaux de rat (en rouge et en vert). Chaque domaine occupé par un astrocyte est délimité avec des tirets. Très peu de prolongements vont se superposer sur le domaine de l'astrocyte voisin (marqués en jaune). D'après Oberheim et al., 2009.

Les astrocytes font partie de la barrière-hémato-encéphalique (BHE). Celle-ci a été décrite suite à la découverte de sa capacité à exclure des sondes injectées dans la circulation générale. De cette manière, la BHE limite le passage de certaines substances neuro-actives, pour assurer un environnement optimal pour la transmission synaptique (Pardridge, 1999). Seuls quelques composés lipophiles et des substrats pour lesquels il existe des transporteurs peuvent franchir cette barrière. En partant de la lumière du vaisseau, la BHE est composée de cellules endothéliales, qui forment entre elles des jonctions serrées, puis la lame basale (ou *basal lamina*) et enfin les pieds astrocytaires qui enserrant l'ensemble des capillaires encéphaliques (Simard et al., 2003; Abbott et al., 2006). Comme mentionné plus tôt, la BHE peut être plus perméable à certains endroits, notamment au niveau du NA, en raison de la désorganisation des jonctions serrées des cellules endothéliales (Ciofi, 2011).

Pour permettre le passage du glucose dans le parenchyme nerveux, astrocytes et cellules endothéliales de la BHE expriment GLUT1. Il existe une différence de glycosylation entre les transporteurs retrouvés dans ces deux types cellulaires (45kDa dans les astrocytes et 55kDa dans les cellules endothéliales), mais leurs caractéristiques cinétiques restent identiques (Simpson et al., 2007). GLUT1 est exprimée sur les membranes lumineales et ablumineales des cellules endothéliales, permettant ainsi le passage du glucose dans le

parenchyme cérébral ([Figure 23](#)). Il est possible de suivre son passage dans les cellules grâce au 6-NBDG, un glucose fluorescent non métabolisable (Barros et al., 2009).

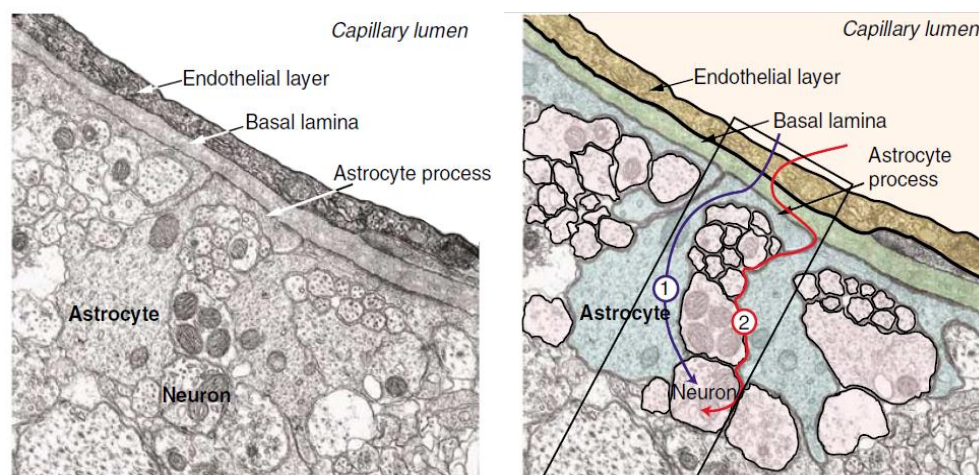


Figure 23 : Le passage du glucose au niveau de la BHE

Image de microscopie électronique montrant les trajets possibles pour l'apport de substrats de la circulation sanguine au cerveau. A gauche, on distingue la couche de cellules endothéliales, séparée des pieds astrocytaires par la lame basale. Les neurones sont également entourés par les prolongements astrocytaires. A droite, est représentée un schéma des chemins possibles pour la diffusion du glucose du sang jusqu'aux neurones. Après avoir traversé la lame basale, le glucose peut atteindre les pieds astrocytaires (Chemin 1). Le glucose peut être métabolisé en lactate et/ou être libéré directement dans le milieu interstitiel. Le glucose peut aussi diffuser dans le milieu interstitiel (Chemin 2), où il est accessible aux deux types cellulaires. D'après Simpson et al., 2007.

B. Le couplage métabolique astrocyte-neurone

Le cerveau représente 2% de la masse totale du corps mais recouvre 20 à 25% des besoins énergétiques. Bien que la demande énergétique soit forte, le cerveau ne contient que très peu de réserves. Il est donc hautement dépendant de l'approvisionnement énergétique fourni à partir du sang.

Dans les années 80, alors que le fonctionnement cérébral était imaginé comme strictement aérobie, des expériences d'imagerie fonctionnelle cérébrale ont montré que l'augmentation de la consommation en glucose était disproportionnée par rapport à la consommation d'oxygène (Fox and Raichle, 1986; Fox et al., 1988). Ces résultats conduisirent la communauté scientifique à admettre que les besoins énergétiques cérébraux étaient, au moins en partie, assurés par un métabolisme glycolytique anaérobie. D'intenses recherches ont alors été effectuées afin de mettre en évidence les acteurs et mécanismes cellulaires qui permettraient de réconcilier la coexistence de ces deux types de métabolisme lors de l'activation neuronale.

1. Spécialisation métabolique

Alors que les neurones sont considérés comme les plus gros consommateurs d'énergie du cerveau, de manière surprenante, le glucose est utilisé préférentiellement par les astrocytes (Bouzier-Sore et al., 2006; Chuquet et al., 2010). Plusieurs études ont finalement mis en évidence une spécialisation métabolique entre neurones et astrocytes. Les astrocytes expriment effectivement en quantité très importante des enzymes glycolytiques par rapport aux neurones. Les astrocytes expriment abondamment la 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (Pfkfb3), qui produit du fructose-2,6-biphosphate, un activateur de l'enzyme glycolytique phospho-fructose-kinase 1 (PFK) (Herrero-Mendez et al., 2009). En revanche, la pyruvate deshydrogénase (PDH), enzyme permettant la synthèse d'acétyl CoA pour l'entrée dans le cycle de Krebs, est très peu active (Laughton et al., 2007). De plus, il manque aux astrocytes le transporteur mitochondrial aspartate/glutamate, qui permet le transport du NADH dans la mitochondrie pour sa régénération (Ramos et al., 2003; Berkich et al., 2007). Afin de maintenir un niveau de glycolyse élevé, le NADH est régénéré par la conversion de pyruvate en lactate par la LDH5 (Figure 24).

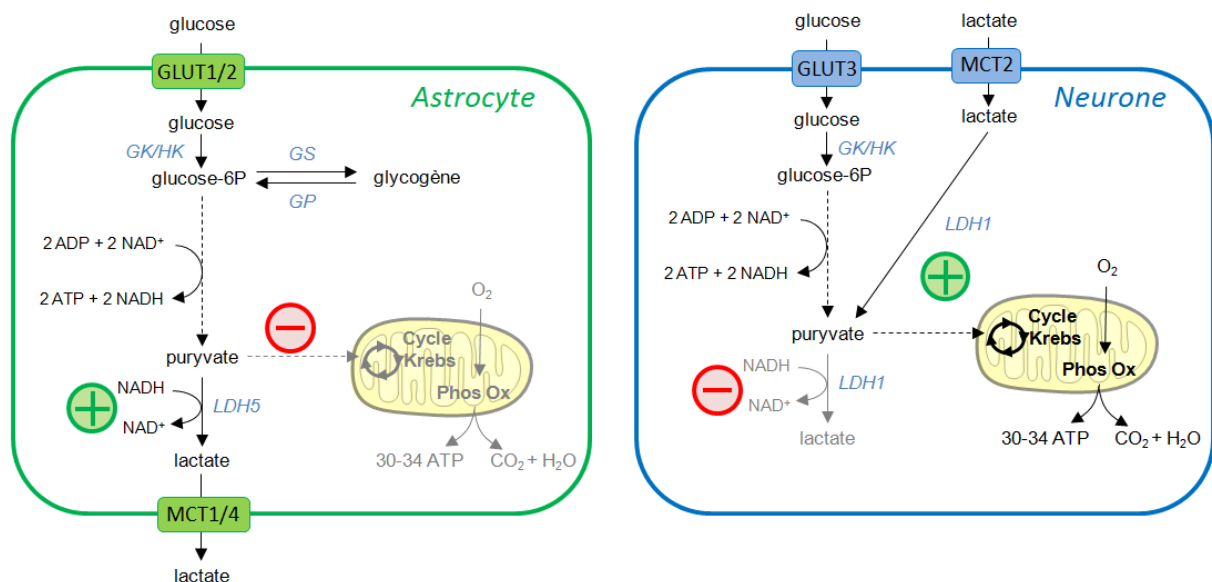


Figure 24 : La métabolisation du glucose

① Dans l'astrocyte : le glucose entre dans la cellule par GLUT1 (ou 2, expression plus restreinte) et il est phosphorylé par une hexokinase (HK) pour produire du glucose-6-phosphate. Le glucose-6P peut être métabolisé par la voie de la glycolyse en donnant 2 molécules de pyruvate, de l'ATP et du NADH. Le pyruvate peut entrer dans la mitochondrie où il est métabolisé par le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative (Phos Ox), pour produire de l'ATP. Le pyruvate peut sinon être réduit en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH5). Le lactate est alors libéré dans le milieu extracellulaire par des MCTs. D'un autre côté, le glucose-6P peut être stocké sous forme d'unité glycosyl en glycogène.

② Dans le neurone : le glucose rentre dans la cellule par GLUT3, puis est métabolisé préférentiellement en pyruvate qui rentre dans la mitochondrie pour permettre la production d'ATP. Les neurones captent également de grande quantité de lactate, *via* MCT2, qui est transformé en pyruvate par la LDH1.

L'équipement enzymatique de ces cellules leur confère un métabolisme plutôt glycolytique pour les astrocytes, et oxydatif pour les neurones.

Par ailleurs, les neurones présentent un métabolisme très oxydatif. L'activité glycolytique est même délétère pour la survie neuronale (Herrero-Mendez et al., 2009). Les neurones ont d'ailleurs une préférence pour l'utilisation du lactate, même en présence de glucose (Itoh et al., 2003; Bouzier-Sore et al., 2006; Ivanov et al., 2011).

L'expression différentielle de ces acteurs de la métabolisation du glucose met en avant la « coopération métabolique » qui existe entre astrocytes et neurones ([Figure 24](#)).

2. L'ANLS

L'ensemble de ces données sont à mettre en relation avec la théorie de la navette du lactate entre astrocytes et neurones (*Astrocyte Neuron Lactate Shuttle*, **ANLS**), élaborée en 1994 par Pellerin et Magistretti (Pellerin and Magistretti, 1994). Suite à de nombreux résultats obtenus *in vitro*, *ex vivo*, *in silico* et *in vivo*, cette hypothèse a été majoritairement acceptée par la communauté scientifique. L'ANLS repose sur l'idée que c'est le glutamate, libéré suite à une activation neuronale, qui déclenche l'apport d'énergie supplémentaire aux neurones par les astrocytes. En effet, l'activité glutamatergique neuronale est très consommatrice d'énergie : on estime qu'elle représente 80% des dépenses énergétiques de la substance grise (Shulman et al., 2004).

Initialement, le glutamate est capté par les astrocytes *via* ses transporteurs de haute affinité GLT et GLAST (respectivement EAAT2 et EAAT1 chez l'Homme), transport qui s'accompagne de l'entrée de Na⁺ dans la cellule. Afin de limiter cet afflux, la pompe Na⁺/K⁺ ATPase est activée, ce qui consomme de l'ATP. En raison de leur métabolisme essentiellement glycolytique, la synthèse de nouvelles molécules d'ATP est issue de la glycolyse. Ceci stimule la capture de glucose par les astrocytes pour alimenter la glycolyse. Le lactate alors produit par la glycolyse est libéré vers les neurones ([Figure 25](#)).

Ce couplage est favorisé par l'expression de différentes isoformes de MCTs et de LDH (avec des propriétés cinétiques distinctes) par les deux populations cellulaires. Les astrocytes présentent les transporteurs MCT1 et 4 (Rafiki et al., 2003; Pierre and Pellerin, 2005), dont la constante d'affinité pour le lactate est respectivement de 3,5 et 34mM. Ils expriment aussi une isoforme particulière de la LDH, la LDH-A (ou LDH5), retrouvés dans les tissus glycolytiques (Bittar et al., 1996; Laughton et al., 2007). Les neurones, quant à eux, expriment MCT2 (Km = 0,7mM) et l'isoforme LDH-B (ou LDH1), avec une plus haute affinité pour le pyruvate (Bittar et al., 1996; Bergersen et al., 2001; O'Brien et al., 2007; Chiry et al., 2008). Ces profils d'expression favorisent donc la production et la libération de lactate par les astrocytes alors que les neurones sont de bien meilleurs candidats pour la capture et la consommation de ce lactate comme substrat énergétique ([Figure 25](#)). Ceci est en accord avec les études montrant la consommation préférentielle de glucose au niveau astrocytaire et de lactate au niveau neuronal.

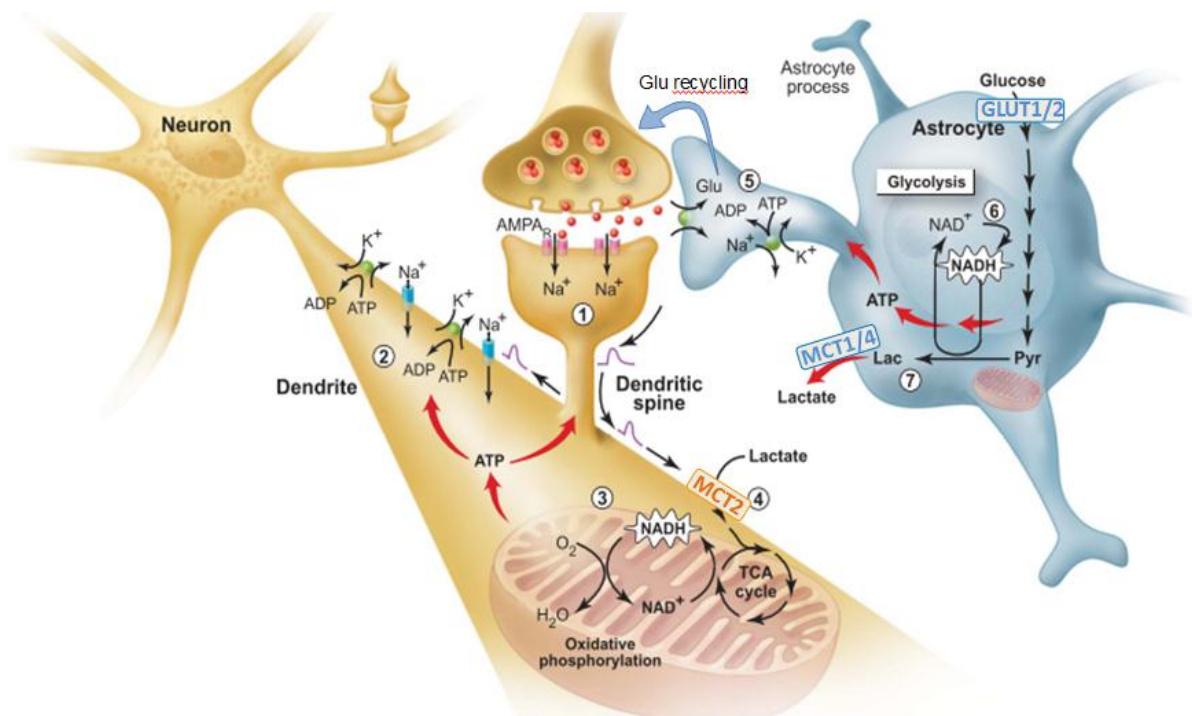


Figure 25 : Le couplage métabolique entre astrocytes et neurones, lors de l'activation neuronale

① La stimulation de neurones glutamatergiques active des récepteurs postsynaptiques AMPA et induit un potentiel postsynaptique excitateur (PPSE) dans l'épine dendritique du neurone. ② La dépolarisation se propage de l'épine dendritique à la dendrite, où elle déclenche l'ouverture de canaux sodiques voltage-dépendants et l'activation de la pompe Na^+/K^+ ATPase, ce qui induit une augmentation de la demande énergétique (ATP). ③ En réponse, la phosphorylation oxydative est rapidement activée. ④ Le cycle de Krebs (TCA cycle) est approvisionné en lactate, capté par MCT2 du milieu extracellulaire. ⑤ En parallèle, le glutamate est capté par les astrocytes et active la pompe gliale Na^+/K^+ ATPase, pour limiter l'excitotoxicité. Le glutamate est converti en glutamine grâce à la glutamine synthase, exprimée spécifiquement par les astrocytes. La glutamine est ensuite exportée vers les neurones pour permettre la resynthèse de glutamate. ⑥ L'augmentation des besoins énergétiques induit une activation de la glycolyse dans le cytoplasme astrocytaire. ⑦ Pour permettre le maintien d'un flux glycolytique élevé, le NAD^+ doit être reconverti par la conversion du pyruvate en lactate par la LDH. Le lactate est libéré dans l'espace intercellulaire, non seulement pour compléter le pool extracellulaire, mais aussi pour assurer la phase tardive de l'activation neuronale. *In vivo*, le glucose provient de la circulation sanguine, capté par les pieds astrocytaires ou libéré directement dans le milieu interstitiel. Modifié d'après Pellerin and Magistretti, 2004.

AMPA, récepteur de l'acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique ; GLU, glutamate; LAC, lactate; PYR, pyruvate; TCA, acide tricarboxylique.

Le glutamate a divers effets à la fois sur les neurones et les astrocytes. Dans les astrocytes, il augmente le transport de glucose, *in vitro*, par une signalisation qui nécessite une augmentation de la concentration intracellulaire de Na^+ et de Ca^{2+} (Loaiza et al., 2003; Porrás et al., 2008). En parallèle, le glutamate inhibe le transport du glucose dans les neurones (Porrás et al., 2004). De plus, suite à la capture de glutamate, les astrocytes libèrent de l'acide ascorbique qui va diminuer l'activité de GLUT3 neuronal, sans avoir aucun effet sur GLUT1 (Castro et al., 2007). L'acide ascorbique va également augmenter

l'activité des MCTs, et en particulier MCT2 neuronal (Castro et al., 2008). Ce neuromédiateur redirige donc le glucose des neurones aux astrocytes, et accroît la capture de lactate par les neurones.

Dans le cadre de la fourniture énergétique, il est important de noter que les astrocytes sont également capables de stocker du glycogène, dont le *turn-over* est très rapide (Figure 24). Dans les années 80, il a été démontré qu'un nombre réduit de neuropeptides induisaient la glycogénolyse : la noradrénaline, le peptide intestinal vaso-actif (VIP) et l'adénosine par exemple (Magistretti et al., 1981). La libération de lactate issu de la dégradation du glycogène se met en place lorsque l'activation neuronale perdure, ou dans des conditions de carence en glucose (Pellerin et al., 2007). Ainsi, pendant une privation en glucose, le lactate issu du glycogène module la fonction axonale et la survie dans la substance blanche et le nerf optique de souris (Wender et al., 2000; Tekkök et al., 2005; Walls et al., 2008). En absence de glucose, l'activité neuronale est maintenue jusqu'à ce que les niveaux glycogéniques chutent. De plus, le maintien de l'activité est perdu lorsque des inhibiteurs ou des molécules compétitrices des MCTs sont ajoutés dans le milieu ou lorsque la glycogénolyse est inhibée, ce qui démontre que le lactate issu du glycogène astrocytaire permet l'activité neuronale en l'absence de glucose (Wender et al., 2000; Tekkök et al., 2005; Walls et al., 2008).

Bien que la plupart des résultats en faveur de l'ANLS ait été obtenue *in vitro*, *ex vivo* (sur des tranches de cerveaux par exemple) ou *in silico* (modélisation mathématique), certaines études récentes, réalisées *in vivo*, soutiennent aussi le rôle capital de la fourniture en lactate par les astrocytes dans le maintien de l'activité neuronale. Grâce à l'utilisation du 6-NBDG *in vivo*, Chuquet et collaborateurs démontrent que lors d'une stimulation des vibrisses, la capture de glucose est augmentée uniquement dans les astrocytes du cortex somatosensoriel (Chuquet et al., 2010). C'est en 2011 que la première démonstration physiologique de l'ANLS *in vivo* est apportée (Newman et al., 2011; Suzuki et al., 2011). Dans le cadre de la formation de la mémoire à long terme, lorsque l'ANLS est bloquée par l'utilisation d'inhibiteurs de la glycogénolyse astrocytaire ou de MCT2, les rats ne sont plus en mesure d'apprendre une tâche de repérage dans l'espace (Newman et al., 2011; Suzuki et al., 2011).

Pour ce qui est de la détection hypothalamique du glucose, l'équipe de Rossetti a ainsi élégamment démontré en 2005, *in vivo*, que l'étape astrocytaire de métabolisation du glucose en lactate est particulièrement importante dans la détection hypothalamique du glucose (Lam et al., 2005a). Ainsi, une injection de lactate au niveau hypothalamique a les mêmes effets qu'une injection de glucose sur l'inhibition de la production hépatique de glucose. L'inhibition hypothalamique de la LDH par l'oxamate (OXA) bloque les effets du glucose injecté dans l'hypothalamus sur le métabolisme hépatique, alors que la stimulation

de la PDH par le dichloroacétate (DCA) reproduit les effets du glucose et du lactate (Lam et al., 2005a). Ceci montre que la conversion du lactate dans l'astrocyte est une étape indispensable à la détection hypothalamique du glucose.

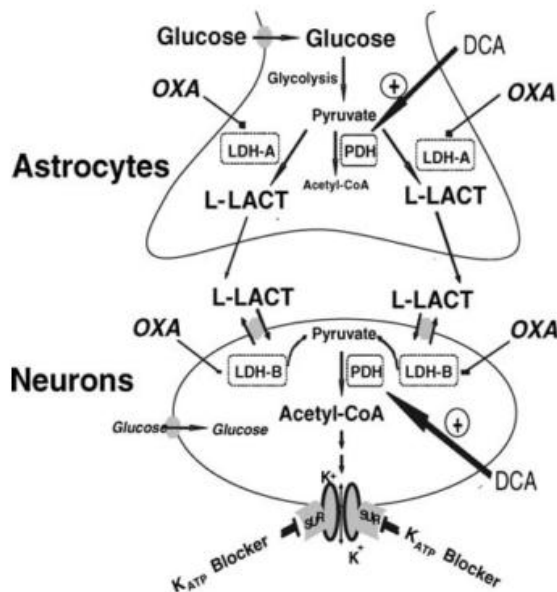


Figure 26 : Représentation schématique de la modulation du couplage métabolique entre astrocytes et neurones

Le glucose entre dans les astrocytes où il est métabolisé en pyruvate par la glycolyse. Le pyruvate est préférentiellement converti en lactate (L-LACT) par la LDH (LDH-A ou 5 dans les astrocytes) et peut être capté par les neurones pour produire du pyruvate grâce à la LDH-B ou 1. Puis le pyruvate est converti en acétyl-CoA par la PDH. L'oxamate (OXA) est un inhibiteur compétitif de la LDH. Le dichloroacétate (DCA) est un activateur de la PDH. D'après Lam et al., 2005a.

Il a également été montré que le lactate circulant est directement détecté au niveau hypothalamique et régule la synthèse de neuropeptides orexigènes et anorexigènes ainsi que la PA et la production hépatique de glucose (Lam et al., 2008; Cha and Lane, 2009; Kokorovic et al., 2009).

3. Le couplage neuro-vasculaire

Il existe un couplage spatio-temporel entre l'activité neuronale et l'augmentation du flux sanguin cérébral. Les astrocytes ont longtemps été soupçonnés de participer à la régulation du flux sanguin cérébral et de permettre l'apport d'énergie, du fait de la présence de leurs pieds astrocytaires entourant les vaisseaux sanguins.

L'activité neuronale déclenche une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} dans les astrocytes, *via* la recapture de glutamate par les mGluR (Figure 22). L'augmentation de Ca^{2+} induit l'activation de la phospholipase A2 (PLA2) qui produit de l'acide arachidonique (AA) à partir des lipides plasmatiques. L'AA peut être converti en prostaglandines (PGE2) ou en acides epoxyeicosatétranoïques (EETs), qui produit une vasodilatation des artérioles (Zonta et al., 2003; Metea and Newman, 2006; Takano et al., 2006) (Figure 27). En parallèle, l'AA peut aussi diffuser vers les cellules musculaires lisses de la paroi des artérioles et induire une vasoconstriction (Mulligan and MacVicar, 2004). Ces réactions paraissent antagonistes mais sont en fait dictées par le niveau d'oxygène. Lorsque

celui-ci est bas suite à l'activation neuronale, les astrocytes libèrent également du lactate et de l'adénosine, qui freinent respectivement la recapture des PGE₂ et l'action de l'AA sur les cellules musculaires lisses, ce qui favorise finalement la vasodilatation (Gordon et al., 2008) (Figure 27). Les astrocytes sont connus pour limiter l'excitotoxicité en capturant neurotransmetteurs et potassium de la fente synaptique. Il a également été montré que l'augmentation de [K⁺] extracellulaire à proximité des artérioles favorise leur vasodilatation (Knot et al., 1996).

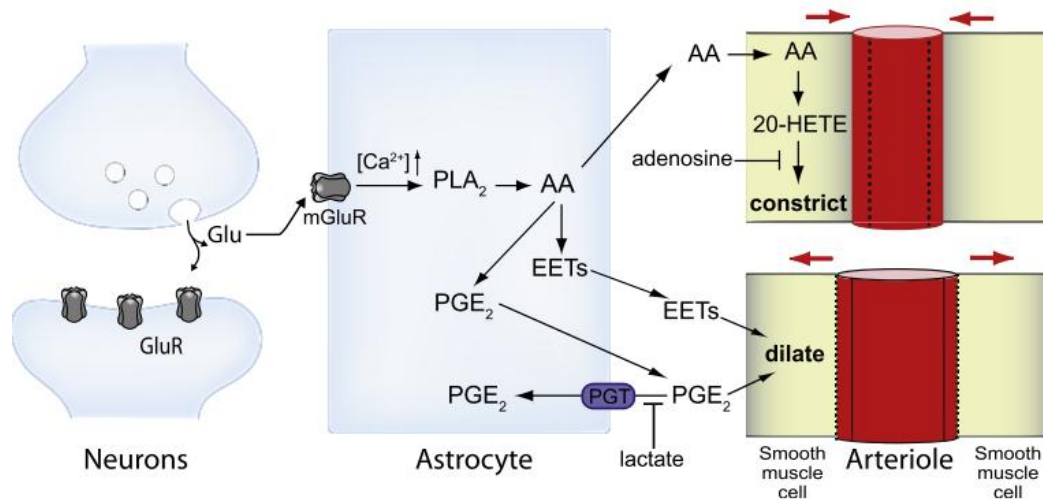


Figure 27 : Représentation schématique des voies principales par lesquelles les astrocytes régulent le flux sanguin cérébral

Suite à une activation, certains neurones produisent de l'oxyde nitrique (NO) par la nNOS. Le NO diffuse librement à travers les membranes et atteint les pieds astrocytaires qui recouvrent les vaisseaux sanguins. Le NO peut moduler la production astrocytaire de peptides vasoactifs, ou agir directement sur les cellules musculaires lisses, en activant la synthèse de cGMP par la guanylate cyclase. Le NO a alors un effet vasodilatateur.

Dans le modèle de l'ANLS, les interactions entre neurones et astrocytes sont souvent réduites à l'échelle de la synapse tripartite, où l'astrocyte est représenté seul. Or, les astrocytes ne sont pas tous à proximité d'un capillaire sanguin pour capter du glucose. Ces cellules sont organisées en de véritables réseaux coordonnés, interconnectées par des jonctions communicantes (*gap junctions* en anglais, GJ). Comment circule le glucose au sein de ces réseaux ? Comment ces réseaux sont-ils régulés ?

C. Les réseaux astrocytaires

Avec le développement des organismes pluricellulaires, de multiples voies de communication se sont mis en place pour permettre à des cellules distantes d'interagir. La communication intercellulaire permet à deux cellules proches de se connecter et de se coordonner entre elles au sein d'un tissu donné. Avec le développement de la microscopie électronique dans les années 50, les premières études sur la communication intercellulaire ont été réalisées. Grâce à ces techniques d'imagerie, on a découvert que les astrocytes semblaient reliés entre eux et formaient un syncytium. Cette notion ne reflète pas la complexité de l'organisation des astrocytes, où beaucoup de régulations sont effectivement en place. En effet, des expériences récentes montrent qu'ils forment des réseaux, dans lesquels la diffusion de molécules est finement régulée, grâce aux jonctions communicantes formées de connexines.

1. Les jonctions communicantes : généralités

a) Nomenclature et topologie des connexines

L'appellation de « jonctions communicantes » ou *gap-junctions* en anglais (GJ) trouve son origine dans le travail de Revel et Karnovsky 1967 (Revel and Karnovsky, 1967). Les GJ sont formées de l'apposition de deux membranes plasmiques, séparées par une mince fente de 2 à 3 nm de large, avec présence de structures pentalaminaires caractéristiques des GJ (Figure 28). Par des études en microscopie électronique et de cryofracture, le cœur opaque observé s'est révélé être un pore : des centaines à plusieurs milliers de canaux intercellulaires forme ainsi des plaques « jonctionnelles » où la concentration de GJ peut aller jusqu'à 10^4 canaux/ μm^2 de membrane (Lauf et al., 2002).

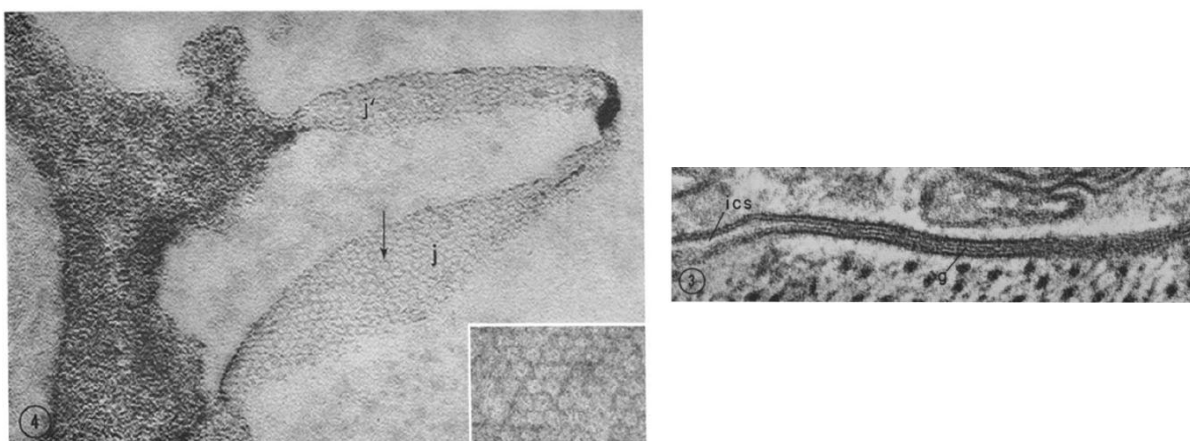


Figure 28 : Image en microscopie électronique de jonction communicante
D'après Revel and Karnovsky, 1967

Chaque cellule contribue à la formation d'une GJ par la juxtaposition d'un connexon ou hemi-canal, avec son homologue de la cellule voisine (Figure 29). La GJ est maintenue grâce à des interactions hydrophobes (Musil and Goodenough, 1991). Le connexon présente un pore aqueux de 1,5 à 2 nm de diamètre. Chaque connexon est formé de 6 sous-unités protéiques transmembranaires qu'on appelle connexines (Cx). Jusqu'à présent, 20 gènes codant pour des Cxs ont été décrits chez la souris (21 chez l'Homme), situés pour la plupart sur des chromosomes différents (Söhl and Willecke, 2004).

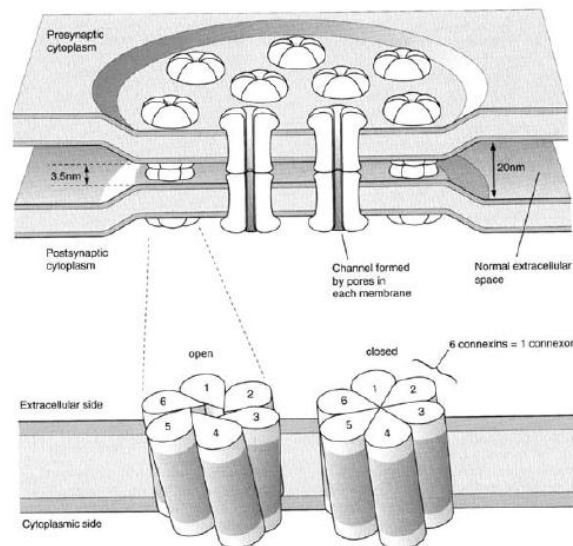


Figure 29 : Représentation schématique d'une jonction communicante

Chaque cellule présente des connexons qui se font face pour former la GJ. Un connexon est formé de six sous-unités protéiques, les connexines. Les six connexines peuvent changer de configuration pour ouvrir ou fermer le connexon. La fermeture du canal est obtenue lorsque les sous-unités de Cx pivotent les unes contre les autres, dans le sens des aiguilles d'une montre. D'après Söhl et al., 2004.

Les Cxs présentent la même topologie : elles sont formées de 4 domaines transmembranaires (TM), reliés par 2 boucles extracellulaires et une boucle intracellulaire. Les extrémités C- et N-terminales sont donc cytoplasmiques. Les domaines TM et les boucles extracellulaires sont très conservées entre les Cxs. En effet, ils permettent respectivement la formation du pore et l'appariement entre deux connexons. La formation de la GJ repose sur l'interaction non covalente entre 3 résidus cystéine, situés sur chaque boucle extracellulaire, qui forment des ponts-disulfures (Sosinsky and Nicholson, 2005)(Figure 30). Le domaine C-ter et la boucle cytoplasmique sont les parties les plus variables, ils forment des sites d'interaction avec des protéines cytoplasmiques qui modulent les propriétés d'ouverture et de fermeture du canal (Sosinsky and Nicholson, 2005). Les connexons peuvent être formés de connexines de même nature (homomérique) ou non (hétéromérique), et peuvent faire face à des connexons identiques ou non, formant respectivement des GJ homotypique ou hétérotypiques (Sosinsky and Nicholson, 2005) (Figure 30).

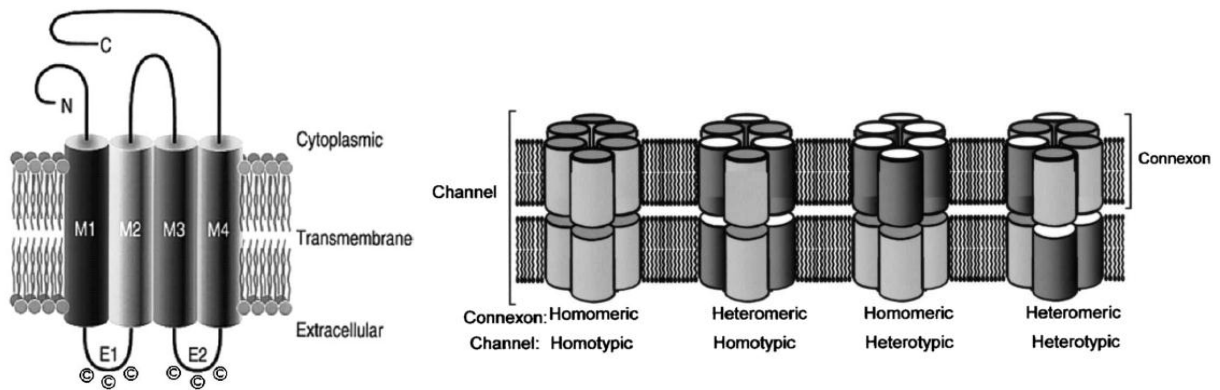


Figure 30 : Représentation schématique d'une connexine et configuration du connexon
D'après Söhl et al., 2004 et Evans and Martin, 2002

Il existe plusieurs nomenclatures pour décrire les Cxs. La plus connue est celle établie par Beyer en 1987, qui repose sur le poids moléculaire des Cxs. Ainsi, la connexine ayant un poids moléculaire de 43kDa est baptisée Cx43.

b) Synthèse et dégradation

Les Cxs sont synthétisées et dégradées en continu, ce qui est peu commun pour des protéines membranaires. Leur demi-vie est donc très courte : pour la Cx43, elle est comprise entre 1,5 et 4h *in vitro* et *in vivo* (Solan and Lampe, 2009). Ce mécanisme permet des adaptations rapides des tissus aux conditions environnementales. Les Cxs sont synthétisées par la voie classique, *via* des vésicules de sécrétion. Les connexons assemblés dans le cytoplasme restent fermés jusqu'à leur arrivée à la membrane où ils sont transportés le long de microtubules. Une fois insérés dans la membrane plasmique, les connexons sont libres. Quand deux cellules rentrent en contact, en quelques minutes, il y a formation de GJ ([Figure 31](#)).

Les GJ nouvellement formées sont sur les extrémités des plaques jonctionnelles, alors qu'au centre, les GJ sont destinés à être internalisés et dégradés (Gaietta et al., 2002). La disparition des GJ ne correspond pas à la dissociation des connexons, mais à l'internalisation des GJ en une structure qu'on appelle jonction annulaire (Jordan et al., 2001) ([Figure 31](#)).

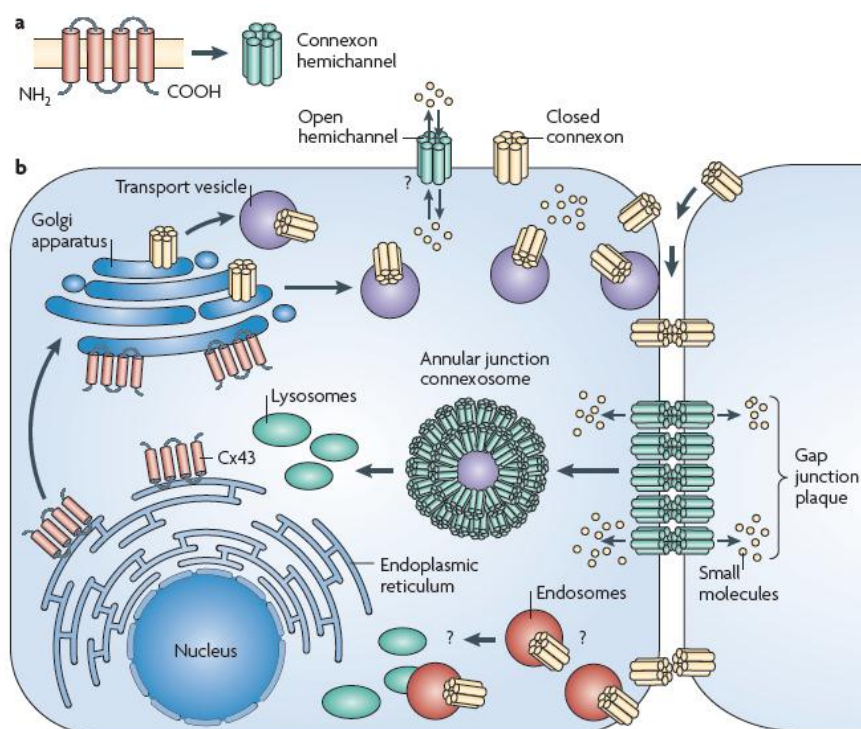


Figure 31 : Cycle de vie de la connexine 43

A] La Cx43 est une protéine membranaire intégrale qui s'oligomérisse en hexamère pour former un connexon. **B]** La Cx43 est insérée dans le réticulum endoplasmique où elle correctement repliée (sinon elle sort du RE pour être dégradée). Dans l'appareil de Golgi, elle est oligomérisée. Après avoir été transportés par les microtubules jusqu'à la membrane plasmique, les connexons peuvent s'apparier avec d'autres connexons présents sur des cellules voisines pour former des GJ, et s'agglomérer pour former une plaque jonctionnelle. Les connexons peuvent également rester non appariés et former des hémicanaux, qui échangent des petites molécules avec le milieu extracellulaire. Après quelques heures, les GJ sont internalisées en jonctions annulaires avant d'être dégradées dans des lysosomes. D'après Naus and Laird, 2010

c) Autres canaux

Pendant longtemps, les connexons dispersés dans des zones non-jonctionnelles étaient considérés comme fermés pour éviter la mort cellulaire par dispersion du gradient ionique. Mais il a été mis en évidence qu'ils pouvaient être ouverts dans quelques cellules et être modulés par divers facteurs (Sáez et al., 2010).

Il existe d'autres protéines présentant des caractéristiques très proches de celles des Cxs : les **pannexines**, qui sont retrouvées chez les Vertébrés et les Invertébrés. Malgré une topologie voisine de celle des Cxs, elles ne forment que des héli-canaux (Scemes et al., 2009). Elles sont très exprimées dans le SNC en développement. Chez les invertébrés, on trouve aussi des **innexines**, l'équivalent des pannexines (Scemes et al., 2009).

L'ouverture des héli-canaux (HCx) laissait supposer de graves conséquences pour l'intégrité cellulaire. Mais si elle est suffisamment brève et contrôlée, alors ses effets restent

physiologiques (Sáez et al., 2010). Ainsi, la libération de glutamate et d'ATP par ces canaux a été montrée (Stout et al., 2002; Ye et al., 2003) mais aussi du GSH par les HCx de Cx43 (Rana and Dringen, 2007). Les HCx peuvent être ouverts par la présence de radicaux libres lors de l'ischémie (Retamal et al., 2006).

2. Distribution, fonctions et régulations

a) Distribution des connexines

Toutes les cellules de l'organisme expriment des GJ à l'exception des cellules musculaires striées matures, des spermatozoïdes et des cellules circulantes du sang. Une Cx peut être exprimée dans différents tissus et un tissu peut exprimer plusieurs Cxs. La Cx43 est la plus ubiquitaire, elle est présente dans 35 types cellulaires différents (Laird, 2006).

Au niveau du SNC, les astrocytes expriment principalement la Cx43 et la Cx30 (Nagy et al., 1999). Certains astrocytes de la pie-mère et les épendymocytes présentent également la Cx26 (Mercier and Hatton, 2001; Nagy et al., 2004). La Cx30 et la Cx43 ne peuvent pas former de GJ ensemble dans les astrocytes: elles ne forment que des jonctions homomériques et homotypiques entre les astrocytes (Orthmann-Murphy et al., 2007). Les oligodendrocytes présentent les Cx29, Cx32 et Cx47, avec différentes localisations sub-cellulaires (Nagy et al., 2004). Ils peuvent former des jonctions hétérotypiques (Cx47/Cx43 et Cx32/Cx30) avec les astrocytes (Orthmann-Murphy et al., 2007). Les neurones expriment principalement la Cx36, la Cx45 et la Cx57. Les GJ neuronales permettent la formation de synapses électriques, mais sont plutôt faiblement exprimées par rapport aux Cx astrocytaires (Söhl et al., 2005a).

b) Propriétés - régulations dans le SNC

Bien que les GJ soient considérées comme peu sélectives par rapport à d'autres canaux, leur perméabilité est très contrôlée. La première barrière au passage de molécules ou d'ions est la taille du pore 10 à 15 nm de long et 1,5 à 2 nm de diamètre, qui ne permet pas le passage des molécules de plus de 1-1,5 kDa. Cependant, toutes les molécules inférieures à ce poids ne circulent pas librement entre deux astrocytes couplés. La sélectivité de passage dépend de la constitution en Cx du canal et de l'environnement moléculaire et ionique de la plaque (Harris, 2007). Le passage de molécules données dépend aussi de la probabilité d'ouverture des Cxs et du nombre de plaques jonctionnelles.

Les GJ sont modulés par le potentiel trans-jonctionnel (V_j), c'est-à-dire la différence entre les potentiels internes des deux cellules interconnectées. Pour la plupart des connexines, la conductance maximale est obtenue lorsque la différence de potentiel entre les

deux cellules est nulle ($V_j=0$) et elle décline progressivement avec l'augmentation de V_j . De plus, les GJ sont sensibles au potentiel de membrane (V_m) (González et al., 2007). Lors d'une dépolarisation membranaire, la communication par les GJ (GJC) est augmentée et lors d'une hyperpolarisation, elle est réduite (De Pina-Benabou et al., 2001).

Plusieurs molécules peuvent moduler l'ouverture/la fermeture des GJ : des ions (Ca^{2+} , K^+ , H^+), des modifications post-traductionnelles (phosphorylations), des seconds messagers (H_2O_2), des neurotransmetteurs (glutamate) et des molécules chimiques endogènes (endothelines).

La conductance des GJ est très sensible au pH intracellulaire, mais quasi-insensible au pH extracellulaire. L'acidification cytoplasmique limite la GJC, et l'alcalinisation l'augmente (Peracchia, 2004). L'effet du pH intracellulaire sur la conductance jonctionnelle varie beaucoup d'une Cx à l'autre. Il faut savoir que le passage de lactate par les MCTs s'accompagne du passage d'un ion H^+ , ce qui favorise l'alcalinisation des astrocytes et l'acidification des neurones. On peut donc suggérer que l'alcalinisation induite par la sortie du lactate induit une augmentation de la GJC. La conductance des GJ est également réduite quand la concentration intracellulaire en Ca^{2+} augmente. Cet effet passe notamment par l'activation de la voie des calmoduline kinases (Cam kinases) (Peracchia, 2004). L'augmentation de concentration extracellulaire en K^+ dépolarise les astrocytes et augmente la perméabilité des GJ, en passant également par la voie des Cam kinases (De Pina-Benabou et al., 2001).

Nous avons vu que les espèces actives de l'oxygène (mEAOs) peuvent être à l'origine d'une signalisation intracellulaire lors de la détection hypothalamique du glucose, lorsqu'ils sont produits en petite quantité et rapidement éliminés. La GJC astrocytaire est également modulée par l' H_2O_2 , qui induit une augmentation de la perméabilité *in vitro* (Rouach et al., 2004).

Les Cxs ne sont pas glycosylées mais peuvent être phosphorylées, notamment sur l'extrémité C-terminale (Laird, 2005; Solan and Lampe, 2009). Ces phosphorylations permettent la modulation de la fonctionnalité des GJ (conductance, probabilité d'ouverture, sensibilité au pH ou au potentiel), mais ne sont pas indispensables à la formation de GJ (Musil and Goodenough, 1991). La Cx30 n'est pas phosphorylée mais la Cx43 présente de multiples isoformes électrophorétiques en SDS-PAGE : P0, non phosphorylée est la plus mobile, alors que des stades intermédiaires de phosphorylation P1 et P2 peuvent être présents. La phosphorylation a majoritairement lieu sur des résidus Sérine/Thréonine, bien que quelques résidus Tyrosine aient aussi été identifiés (Márquez-Rosado et al., 2011). Les effets de ces phosphorylations dépendent des sites de phosphorylations et peuvent moduler le trafic intracellulaire vers la membrane plasmique ou la régulation de la communication intercellulaire (conductance, appariement de GJ). Dans les plaques jonctionnelles, la Cx43 est l'isoforme principalement phosphorylée (Musil and Goodenough, 1991). D'autres voies

de signalisations peuvent encore moduler la GJC : l'activation de la PKA augmente l'insertion de la Cx43 à la membrane alors que celle de la PKC ou de la voie des MAP kinases accélère son internalisation (Rackauskas et al., 2010).

L'expression corticale des Cx30 et 43 est finement régulée par les neurones. Cette régulation nécessite une interaction entre les deux types cellulaires (Koulakoff et al., 2008). La GJC est modulée par des neurotransmetteurs, notamment le glutamate (Rouach et al., 2002b, 2008). Il reste encore difficile de déterminer si le glutamate joue à la fois directement sur la GJC et/ou s'il induit une cascade de signalisations qui module secondairement les GJ.

Les endothélines sont des molécules endogènes qui sont connues pour réguler le flux sanguin, mais aussi pour inhiber les GJ astrocytaires (Blomstrand et al., 2004). Ainsi, leur inhibition est accompagnée d'une augmentation de la capture de glucose dans les astrocytes (Taberner et al., 1996, 2006), qui passe par l'augmentation de l'expression de GLUT1 et sa relocalisation à la membrane, et de l'expression d'hexokinases. Le lien entre GJC et glucose sera développé dans les paragraphes suivants.

c) Fonctions

La fonction principale des Cxs est la formation des canaux, qui permettent l'échange de petites molécules (Harris, 2007) entre deux cellules voisines ou avec le milieu extracellulaire (hémi-canaux) (Scemes et al., 2009). Les Cx peuvent aussi exercer de multiples fonctions non associées à leur capacité à faire des GJ, parmi lesquelles la régulation de l'expression génique, de la prolifération cellulaire, de l'adhésion et de la migration cellulaire (Elias et al., 2007; Kardami et al., 2007; Naus and Laird, 2010). Dans ce paragraphe, nous nous limiterons à la description des fonctions des Cx astrocytaires associées à la GJC dans le SNC.

Lors du développement et de la différenciation, les GJ font circuler des signaux morphogènes entre les cellules. Elles interviennent dans le développement de la crête neurale. L'absence ou la surexpression de la Cx43 conduit à des anomalies morphologiques, comme par exemple la modification de la mise en place des couches corticales du cerveau (Ewart et al., 1997). Les Cxs interviennent lors de la migration de la glie radiaire lors du développement, mais dans ce cas, leur rôle n'est pas associé à la formation de canal (Elias et al., 2007). De plus, la présence de GJC par les Cx43 et 30 entre les cellules de la glie radiaire est indispensable pour la neurogenèse dans le gyrus denté de l'hippocampe, à l'état adulte (Kunze et al., 2009).

Les GJ neuronales permettent la formation de synapses électriques par échanges d'ions et la synchronisation de l'activité d'un groupe de neurones (Söhl et al., 2005b).

Dans les astrocytes, la GJC permet de tamponner l'excès de K^+ et limite l'excitotoxicité suite à l'activation neuronale (Wallraff et al., 2006; Pannasch et al., 2011).

Les astrocytes, *via* la communication par les GJ et/ou les hémicanaux de Cxs modulent la survie neuronale, en libérant des molécules bénéfiques ou délétères. Ainsi, suivant les études réalisées *in vitro* et *in vivo* dans des conditions physiopathologiques, la communication par les Cx43 participent à la fois à la survie neuronale, ou au contraire, favorisent la nécrose (Giaume et al., 2010).

Nous savons qu'il existait un couplage fonctionnel entre l'activité neuronale et le flux sanguin, et qu'il impliquait les astrocytes, *via* une signalisation par l'AA. La production d'AA passe par une signalisation calcique. Diverses études ont montré que la GJC participait à la propagation de ces signaux calciques, notamment dans l'hyperémie fonctionnelle. Plus généralement, les réseaux astrocytaires sont capables de propager des **vagues calciques** (Scemes and Giaume, 2006)(Figure 32). La signalisation calcique induit la libération de molécules neuroactives telles que le glutamate, l'ATP ou la D-sérine. La propagation de ces vagues se fait par deux voies : d'une part, une voie extracellulaire qui consiste en la libération d'ATP, qui stimule des récepteurs purinergiques P2Y des astrocytes voisins et engendre une signalisation calcique (Guthrie et al., 1999); d'autre part, une voie intracellulaire, par le passage direct d'IP3 (produit suite à l'activation de la PLC) par les GJ. L'ensemble de ces voies aboutit à la libération des stocks internes de calcium (Figure 32).

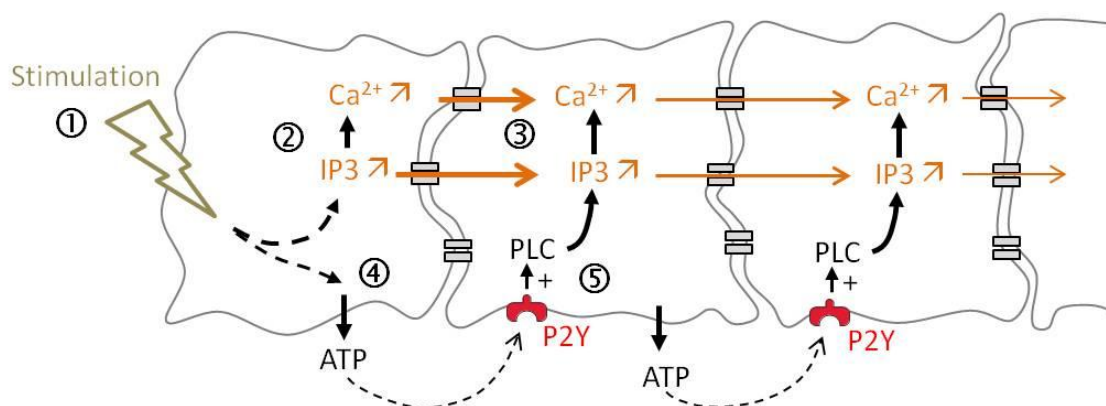


Figure 32 : Les vagues calciques

① Une stimulation (électrique, chimique,...) de l'astrocyte peut induire une augmentation de la concentration en calcium dans l'astrocyte, ② par la libération des stocks internes de calcium via la fixation de l'IP3 sur ses récepteurs au niveau du réticulum endoplasmique. ③ Le calcium et l'IP3 peuvent diffuser au sein du réseau astrocytaire par les GJ. ④ En parallèle, de l'ATP est libéré dans le milieu extracellulaire, et vient se fixer sur des récepteurs purinergiques P2Y, sur les astrocytes voisins. ⑤ L'activation des récepteurs P2Y stimule la PLC qui augmente le taux intracellulaire d'IP3 et de calcium, qui vont à leur tour diffuser dans le réseau. L'augmentation de calcium intracellulaire affecte différentes protéines membranaires et intracellulaires, et permettent la libération de « gliotransmetteurs ».

3. Les connexines et la fourniture énergétique

Nous venons de voir que les GJ participent à la propagation de signaux entre les astrocytes, mais aussi entre les neurones et les astrocytes. De plus, les astrocytes sont connus pour approvisionner les neurones en métabolites énergétiques. *In vitro*, il a été montré que les vagues calciques présentes dans les astrocytes suite une stimulation mécanique ou électrique, sont aussi accompagnées de « vagues métaboliques » (Bernardinelli et al., 2004)(Figure 33). En effet, l'augmentation de Ca^{2+} dans le réseau astrocytaire induit une augmentation de Na^+ , qui permet une augmentation de l'apport énergétique par la capture de glucose. Les vagues sodiques dépendent en partie de la présence de GJC (qui permet l'équilibration du Na^+ entre les astrocytes). En effet, ces vagues sont inhibées de moitié en présence d'inhibiteurs des GJC.

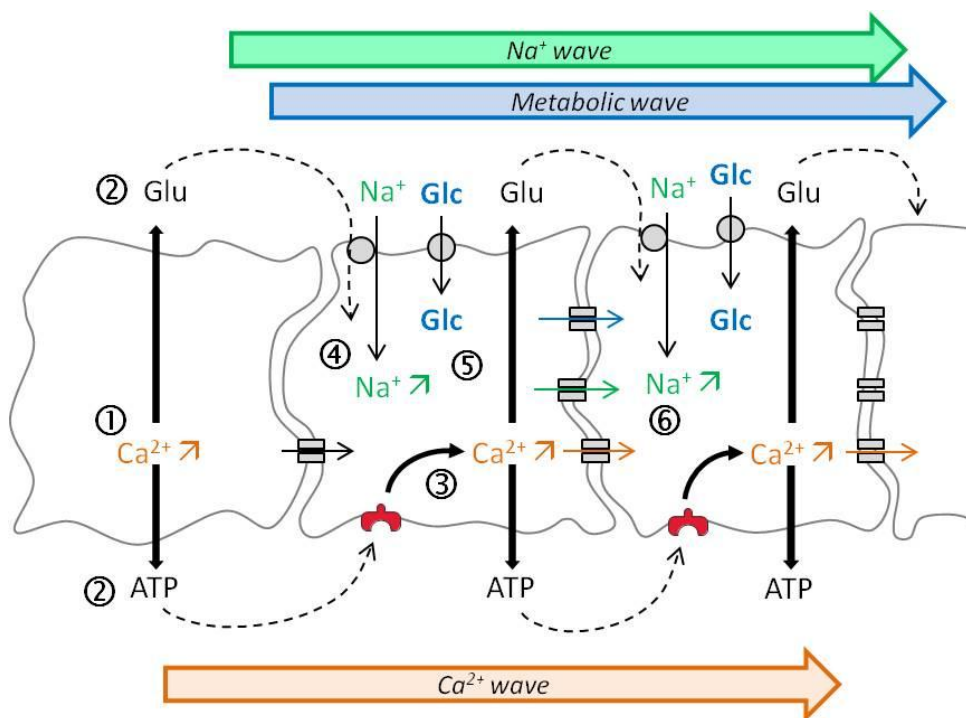


Figure 33 : Les vagues métaboliques

① L'augmentation de calcium suite à l'activité glutamatergique est suivie par ② la libération d'ATP et de glutamate dans le milieu extracellulaire. ③ L'ATP se fixe sur les récepteurs purinergiques des astrocytes voisins, ce qui induit une réponse calcique qui participe à la propagation de la vague calcique ⑥ (libération de Ca^{2+} et d'IP3). ④ En parallèle, le glutamate libéré est récupéré par les co-transporteurs Na^+ /Glutamate, ce qui augmente la concentration intracellulaire en Na^+ . ⑤ Le Na^+ a la capacité de diffuser par les GJ, ce qui génère une vague sodique. L'augmentation de Na^+ est suffisante pour augmenter l'activité de la pompe Na^+/K^+ ATPase, ce qui participe à la capture de glucose ⑤ pour fournir l'ATP nécessaire au fonctionnement de la pompe.

Au-delà de leur propre utilisation de glucose, nous avons vu que les astrocytes sont également capables de fournir plus de substrats énergétiques aux neurones en activité. Le

glucose et le lactate font partie des molécules qui peuvent passer par les GJ (Tabernero et al., 1996). De manière très intéressante, il a récemment été montré que les réseaux de GJ astrocytaires participent à l'approvisionnement énergétique des neurones en activité dans l'hippocampe (Rouach et al., 2008; Giaume et al., 2010). Ceci a été possible grâce à l'utilisation de dérivés fluorescents du glucose, le 2-NBDG (métabolisable) et le 6-NBDG (non métabolisable) (Figure 34). Le trafic de glucose dans le réseau astrocytaire est dû à une activité glutamatergique. De plus, en l'absence de glucose externe, la perfusion de lactate dans un seul astrocyte suffit à maintenir l'activité synaptique. Ceci implique les GJ de Cx43 et 30 et la métabolisation du glucose en lactate, car ces effets ne sont pas retrouvés dans des tranches d'hippocampe de souris KO pour les Cx43 et 30 ou lorsque un inhibiteur des MCTs est utilisé (Figure 34). A noter que c'est la différence de concentration en substrats énergétiques qui guide ce transfert, car il n'est pas retrouvé avec des traceurs inertes.

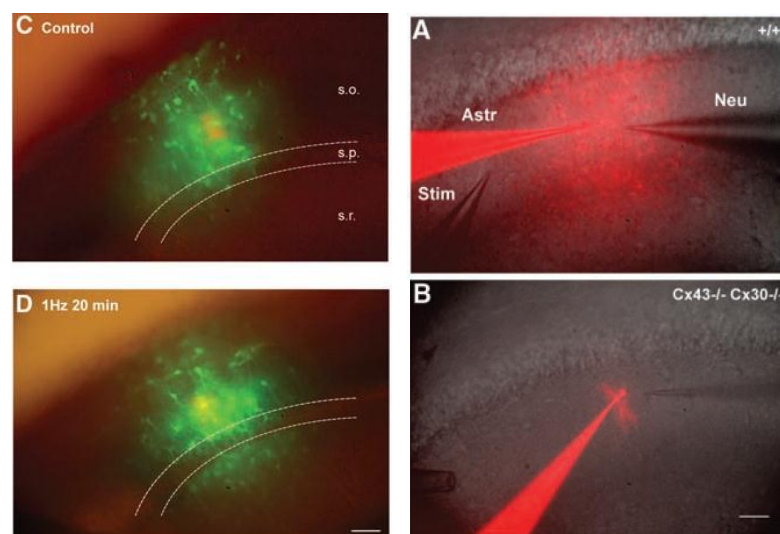


Figure 34 : La fourniture énergétique par les réseaux astrocytaires permet le maintien de l'activité synaptique en l'absence de glucose exogène.

Gauche | Images de la diffusion de glucose dans les réseaux astrocytaires en condition basale (C) et après stimulation électrique (D) des collatérales de Schaffer. **Droite** | Images de la diffusion de glucose ou de lactate avec une sonde fluorescente (sulforhodamine 101) à partir d'un astrocyte (Astr) et de la pipette d'enregistrement des fEPSCs d'un neurone (Neu), suite à la stimulation des collatérales de Schaffer (Stim), sur des tranches d'hippocampe de souris normales (A) ou KO pour les Cx43 et 30 (B). D'après Rouach et al., 2008.

Les connexines sont très exprimées au niveau des pieds astrocytaires, qui entourent les vaisseaux sanguins (Simard et al., 2003; Rouach et al., 2008). Le glucose capté de la circulation sanguine pourrait donc être rapidement redistribué dans les astrocytes périvasculaires, lors d'une hyperglycémie. Il a récemment été montré *in vitro* par des techniques de FRET, que lors d'une augmentation de la concentration en glucose extracellulaire, les astrocytes captaient rapidement ce glucose (Prebil et al., 2011). Les astrocytes pourraient donc moduler l'activité et/ou la détection des neurones GS, par la libération de glucose et/ou de lactate.



Objectif du travail et approches expérimentales

Au sein de notre équipe, nous nous intéressons à la détection hypothalamique du glucose. Cette détection déclenche des réponses régulatrices à court-terme, telles que la sécrétion d'insuline ou le rassasiement. Lorsqu'elle est altérée, alors les réponses ne sont pas correctement mises en place et participent au développement de pathologies métaboliques.

L'étude de la détection hypothalamique du glucose a souvent porté sur la caractérisation des neurones gluco-sensibles (GS), qui ont la capacité de détecter des variations de concentrations en glucose. Le transfert du glucose jusqu'aux neurones GS reste cependant peu étudié. Plusieurs études récentes, notamment au sein de notre équipe, montrent la participation des astrocytes dans cette détection. Les astrocytes sont des cellules gliales caractérisées par leur lien étroit avec les vaisseaux sanguins et leur rôle dans l'approvisionnement énergétique suite à l'activation neuronale (ANLS) : on parlera de « *fueling* » dans la suite de ce manuscrit. Ils présentent un métabolisme plutôt glycolytique, en transformant le glucose en lactate. Or, plusieurs études ont rapporté le rôle du lactate dans la modulation de plusieurs fonctions physiologiques, telles que la mémoire notamment (Newman et al., 2011; Suzuki et al., 2011).

Dans le cadre plus spécifique de la détection du glucose (« *sensing* »), où ce dernier est à la base même du mécanisme mis en jeu, les astrocytes porteraient une « double casquette » : le glucose et le lactate apportés aux neurones sont à la fois source d'énergie mais aussi signal, déclenchant des réponses spécifiques des neurones GS. Il a ainsi été démontré que l'étape astrocytaire était indispensable à la détection du glucose par l'hypothalamus. Le lactate, dérivé du glucose, du pyruvate ou du glycogène, pourrait traduire des variations de glycémie ou au moins moduler la réponse des neurones GS, suivant le ratio glucose/lactate présent (Lam et al., 2005a).

De plus, il est important de noter que les astrocytes sont organisés en réseaux structurés, qui peuvent être recrutés dans des phénomènes de couplage métabolique avec les neurones, pour assurer le *fueling* suite à l'activation neuronale (Rouach et al., 2008). Aucune étude à notre connaissance ne s'est intéressée à la circulation du glucose et du lactate au sein de ces réseaux astrocytaires dans le cadre du *sensing* hypothalamique du glucose.

La modulation de la détection hypothalamique du glucose par les astrocytes est étudiée depuis peu. Ma thèse s'est orientée suivant deux axes, qui ont globalement visé à mieux comprendre le rôle des astrocytes dans la détection hypothalamique du glucose.

- 1) Dans un premier temps, nous avons voulu étudier le couplage métabolique entre astrocyte et neurone. Nous avons tout d'abord analysé la réponse cérébrale suite à

une injection intra-carotidienne de lactate vers le cerveau, en termes de sécrétion d'insuline. Dans un second temps, nous avons utilisé un modèle physiopathologique, le rat hyperglycémique pendant 48h (48h-HG). Il avait déjà été rapporté une modification de la commande autonome de ces animaux après 48h. Nous avons voulu savoir ici quelle était la réponse de ces animaux suite à une élévation transitoire de la concentration cérébrale en glucose et en lactate, et si elle pouvait être corrélée à une modification d'expression des MCTs hypothalamiques, acteurs cruciaux du transfert de lactate entre astrocytes et neurones.

- 2) Le deuxième objectif de ce travail a été de déterminer si les réseaux astrocytaires formés de Cxs peuvent participer à la détection hypothalamique du glucose. Cette étude s'est divisée en deux points : dans un premier temps, nous avons réalisé la description immunohistochimique de l'expression des Cxs dans l'hypothalamus et l'analyse de leur expression dans différentes conditions métaboliques. Dans un second temps, afin d'étudier le rôle plus spécifique de la Cx43 (très fortement exprimée dans l'hypothalamus), nous avons inhibé son expression spécifiquement dans le MBH par interférence ARN. Nous avons ensuite évalué la sensibilité hypothalamique au glucose par le biais de deux tests fonctionnels : la sécrétion d'insuline (commande vagale) et l'effet satiétogène du glucose.

Partie I : La détection hypothalamique du glucose dans un modèle physiopathologique : implication du lactate et de son transfert par les MCTs ?

La première partie de ma thèse s'est orientée plus particulièrement vers l'étude du lactate et des MCTs lors de la détection hypothalamique du glucose. Ce travail fait l'objet d'une publication actuellement sous presse dans le journal *Neurosciences Letters*.

Les résultats principaux sont les suivants.

1) Nous avons montré que le lactate, comme le glucose, pouvait induire des réponses périphériques comme la sécrétion d'insuline. La sécrétion d'insuline est cependant plus faible et retardée par rapport à celle du glucose.

2) Nous avons ensuite utilisé un modèle animal développé au laboratoire, le rat rendu hyperglycémique pendant 48h (48h-HG) par la perfusion de glucose. Nous avons démontré que dans ce contexte, la détection hypothalamique du glucose et du lactate était perturbée. La sécrétion d'insuline en réponse au glucose perdure (au-delà de 10min) au lieu de revenir à un niveau basal, observé dès la 3^{ème} minute chez des animaux témoins. En réponse au lactate, deux profils de réponse se dégagent : certains rats 48h-HG présentent la même réponse que les rats témoins (pic de sécrétion à t=3min) ; alors que l'autre moitié des rats 48h-HG voit leur sécrétion d'insuline baisser drastiquement suite à l'injection de lactate.

3) En dépit de la modification de la détection cérébrale du glucose et du lactate, l'expression des MCTs hypothalamiques des rats 48h-HG ne varie pas par rapport aux rats témoins.

Plusieurs points de discussion sont soulevés par ces résultats. Premièrement, la sécrétion d'insuline suite à la détection du lactate est retardée par rapport au glucose, ce qui suggère sans doute, en premier lieu, une différence de transport jusqu'aux neurones.

Nous avons montré que la détection hypothalamique du glucose et du lactate est modifiée après 48h d'hyperglycémie (associée à une hyperinsulinémie et une hyperlactatémie). La sécrétion soutenue d'insuline suite au bolus de glucose est en accord avec des données de la littérature qui rapportent une sur-stimulation de l'axe parasympathique dans ce modèle (N'Guyen et al., 1994).

De manière intéressante, on distingue deux types de réponses au lactate chez les rats 48h-HG. Ce phénotype peut être rapporté au fait que la souche de rats utilisée dans l'étude était non-consanguine. Ceci apporte plus de variabilité dans les résultats obtenus, mais cette hétérogénéité se rapproche de la «réalité physiologique». Cette dichotomie (50%/50%) suggère la présence d'un polymorphisme génétique avec l'expression d'un gène dominant, retrouvé uniquement dans le cas de la stimulation avec le lactate, en condition

physiopathologique (48h d'hyperglycémie). Le glucose et le lactate pourraient avoir différents effets sur les mêmes neurones et/ou différentes populations de neurones, en fonction du statut métabolique de l'animal.

Les MCTs sont des acteurs importants du transport de lactate et sont modifiés dans l'hypothalamus de souris obèses. Chez les rats 48h-HG, l'expression protéique des MCTs hypothalamiques n'est pas modifiée.

Ces différents points seront repris dans la discussion générale (p. 111).

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](#)

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet

Alteration of hypothalamic glucose and lactate sensing in 48 h hyperglycemic rats

Camille Allard^{a,b,c}, Lionel Carneiro^{a,b,c}, Stephan C. Collins^{a,b,c}, Chloé Chrétien^{a,b,c}, Sylvie Grall^{a,b,c}, Luc Pénicaud^{a,b,c}, Corinne Leloup^{a,b,c,*}^a CNRS, UMR 6265, CSGA, F-21000 Dijon, France^b INRA, UMR1324, CSGA, F-21000 Dijon, France^c Université de Bourgogne, CSGA, F-21000 Dijon, France

h i g h l i g h t s

Brain lactate injection, as for glucose, triggers insulin secretion in normal rats.
 48 h-hyperglycaemia alters both hypothalamic glucose and lactate sensitivity.
 Protein levels of MCT1, 4 (glial) and 2 (neuronal) are not modified in this model.

a r t i c l e i n f o

Article history:

Received 31 July 2012

Received in revised form 9 November 2012

Accepted 13 November 2012

Keywords:

Hypothalamus

Glucose sensing

Lactate sensing

Hyperglycemia

Monocarboxylates transporters MCT1, 4 and 2

a b s t r a c t

Hypothalamic detection of nutrients is involved in the control of energy metabolism and is altered in metabolic disorders. Although hypothalamic detection of blood lactate lowers hepatic glucose production and food intake, it is unknown whether it also modulates insulin secretion. To address this, a lactate injection via the right carotid artery (cephalad) was performed in Wistar rats. This triggered a transient increase in insulin secretion. Rats made hyperglycemic for 48 h exhibited prolonged insulin secretion in response to a glucose injection via the carotid artery, but lactate injection induced two types of responses: half of the HG rats showed no difference compared to controls and the other half had markedly decreased insulin secretion. Astroglial monocarboxylates transporters MCT1 and MCT4 isoforms transfer lactate from blood to astrocytes and release lactate to the extracellular space, whilst the neuronal MCT2 isoform permits neuronal lactate uptake. We found that astroglial MCT1 and MCT4, and neuronal MCT2 protein levels in the medio-basal hypothalamus (MBH) were not modified by 48 h-hyperglycemia. Together, these results indicate that hypothalamic sensing of circulating lactate triggers insulin secretion. Both glucose and lactate sensing are altered in a model of hyperglycemia, without alteration of MBH MCTs protein levels.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Central glucose sensing is mediated by gluco-sensitive neurons (GS neurons), mainly localized in the medio-basal part of the hypothalamus (MBH) constituted by the arcuate and the ventromedial nuclei. This detection participates in the control of food intake and energy balance [5,14]. Recent studies suggest that astrocytes are involved in this process [12,17,22]. Astroglial end-feet enwrap blood vessels, making astrocytes an obligatory pathway for nutrients such as glucose and lactate. Shuttling fuels to neurons via astrocytes may be important for hypothalamic nutrient sensing.

Astroglial GLUT1 and GLUT2 play important roles in central glucose sensing. Their disruption leads to metabolism dysfunctions [3,8,20,22]. Moreover, some MBH-GS neurons are also lactate-sensitive [29,33,34]. Lactate has been demonstrated to mimic glucose effects [17] and to regulate hepatic glucose production via hypothalamic sensing [15]. Lactate transport occurs through monocarboxylates transporters (MCTs). MCT1 is expressed by endothelial cells, ependymocytes and astrocytes. MCT4 appears specific to astrocytes. The predominant neuronal isoform is MCT2. These MCTs are crucial for the metabolic shuttle between blood, astrocytes and neurons [25]. Both high fat diet-induced obesity and diabetes models exhibit alterations of hypothalamic MCTs expression, suggesting that these transporters may be involved in impaired nutrient sensing [6,26].

Here we tested whether: (1) increased cerebral blood lactate might trigger insulin secretion in rats, (2) protracted hyperglycemia (48 h) affects cerebral glucose and lactate sensing in terms of insulin

* Corresponding author at: CSGA, UMR6265 CNRS, UMR1324 INRA, Université de Bourgogne, F-21000 Dijon, France. Tel.: +33 380 681 665; fax: +33 380 681 601.
 E-mail address: leloup@cict.fr (C. Leloup).

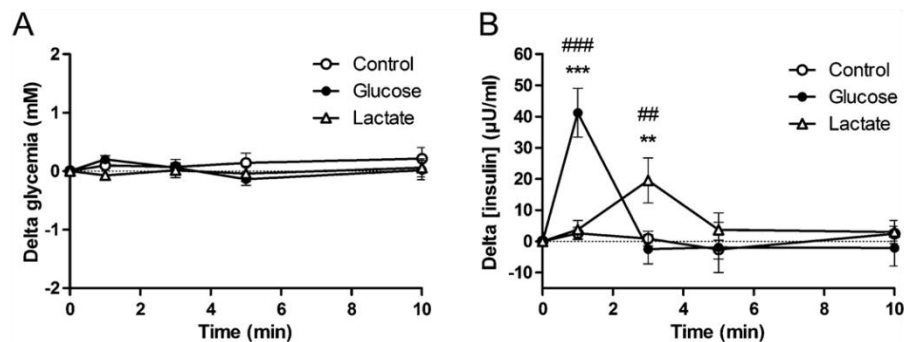


Fig. 1. Glycemia and insulinemia in response to a carotid load of NaCl, glucose or lactate toward the brain. Measurements were performed before and 1, 3, 5 and 10 min after the injection of either NaCl (controls, white circles, $n=7$), glucose (9 mg/kg) (black circles, $n=5$) or lactate (17 mg/kg) (white triangle, $n=7$) in rats. Delta glycaemia (A) and delta insulinemia (B) are compared to value at time 0, before injection. Values are represented as mean \pm sem. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$: significantly different from control rats. ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$: significantly different between the glucose and the lactate group.

secretion, (3) hyperglycemia causes early defects in MBH protein levels of MCT1, 4 and 2.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Outbred Male Wistar rats (275 g, Charles River) were maintained in a controlled standard environment. All procedures were in accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and the Animal Use and Care Advisory Committee of the University of Burgundy. The perfusion-induced hyperglycemia in unrestrained rats was done as described previously [18,23]. Briefly, a 30% glucose solution was perfused for 48 h at 2–3 ml/h via the jugular vein. The hyperglycemia obtained is close to those found in uncontrolled diabetes mellitus (15 mM). Control animals were perfused with saline.

2.2. Cerebral glucose and lactate sensing tests and biochemical analyses

Cerebral sensing tests were performed on pentobarbital-anesthetized rats (Centravet, Velaine-en-Haye, France) and are further described in supplementary data and a previous publication [19]. Briefly, a carotid load of NaCl (0.9 g/l), glucose (9 mg/kg) or lactate (17 mg/kg), (iso-osmolar and pH 7.4), was injected toward the brain. Insulinemia (Ultra Sensitive Rat Insulin ELISA kit, Merckodia, distributed by Eurobio, Courtaboeuf, France), plasma lactate (LDH from Roche, Meylan, France, adapted from [30]) and glycemia (glucose analyzer Performa AccuChek, Roche, Meylan, France) were measured before and after the injection at several time points.

2.3. Western blotting

Whole MBH protein extracts (20 μ g) (DC Protein Assay kit, Biorad) were migrated onto 12% denaturing polyacrylamide gel, then transferred onto PVDF-membrane (Biorad) and blocked 1 h 30 with a 5% nonfat milk-TBST solution. Membranes were incubated with primary rabbit polyclonal antibodies (anti-MCT1, 2 and 4, Millipore, Saint Quentin-en-Yvelines, France) and secondary antibodies. A monoclonal mouse anti- β -actin (Millipore) was used for standardization. Bands were revealed by chemiluminescence (Western Ckit, Biorad, Marnes-la-Coquette, France) and quantified (ChemiDoc and the ImageLab software, Biorad). Further details can be found online, in supplementary materials.

2.4. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm sem. Saline and 48 h-HG groups were compared by a two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test (Graph Pad software). When an interaction between treatment and time was present, a one-way ANOVA followed by Dunnett's test was performed. For Western blotting, groups were compared with an unpaired Student's *t*-test. Significant levels were set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Insulin secretion after cerebral glucose and lactate injection

As described previously [1,11,12,19,20], the intra-carotid glucose load resulted in a transient increase in insulin secretion without alteration of glycemia (1 at 1 min: 41.2 ± 7.8 U/ml, $p < 0.001$). The lactate injection resulted in a delayed insulin transient compared to the glucose injection (1 at 3 min: 19.5 ± 7.2 U/ml, $p < 0.01$) again, without affecting glycemia (Fig. 1A and B). A saline bolus (control group) had no effect on insulin secretion.

3.2. 48 h hyperglycemia causes alteration in cerebral glucose and lactate sensing

Glucose-perfused rats (HG rats) exhibited hyperglycemia throughout the 48 h (15.3 ± 0.8 mM) while saline-perfused rats were normoglycemic (6.6 ± 0.1 mM) (Fig. 2A). Before perfusion, insulinemia was similar between groups (28.7 ± 50 and 27.3 ± 2.9 U/ml for saline vs. HG, respectively). The glucose perfusion led to hyperinsulinemia (214.4 ± 10.4 and 177.0 ± 26.9 U/ml at 24 and 48 h, respectively, $p < 0.001$) (Fig. 2B), whereas plasma insulin in saline perfused rats remained stable (27.0 ± 3.5 and 20.3 ± 3.5 U/ml, at 24 h and 48 h, respectively). Thus, HG rats exhibited hyperglycemia and hyperinsulinemia similar to that of diabetic rodent models. Blood lactate concentration also significantly increased in HG compared to saline rats after the 48 h glucose perfusion (4.0 ± 0.3 mM vs. 2.6 ± 0.3 mM, respectively, $p < 0.001$) (Fig. 2C), in agreement with acidose seen in diabetic subjects.

The 30s intra-carotid glucose load did not modify the glycemia of 48 h-saline or glucose-perfused rats (Fig. 3A). Saline-perfused rats exhibited increased insulinemia 1 min after glucose injection (47.5 ± 9.2 U/ml), which disappeared thereafter (Fig. 3B), as found in control rats (without perfusion) (Fig. 1B). In HG rats, this glucose

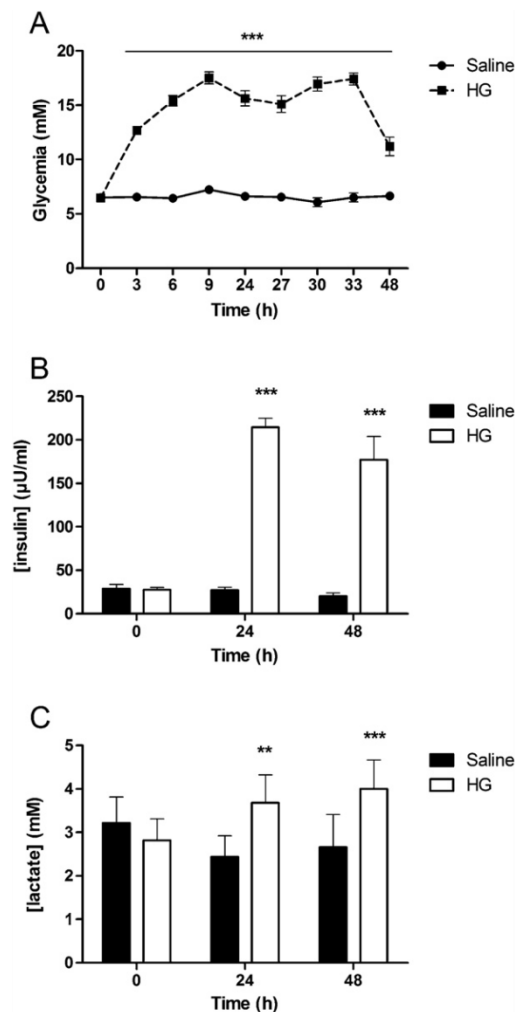


Fig. 2. Glycemia, blood lactate and insulinemia during the 48 h perfusion with 30% glucose or saline. Glycemia (A), $n = 9$ for saline rats and $n = 18$ for HG rats), insulinemia (B), $n = 6$ rats in each group) and blood lactate concentration (C), $n = 6$ rats in each group) in glucose-perfused rats (HG rats, dotted line and white bars) and in saline-perfused rats (solid line and black bars). Values are mean \pm sem. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: significantly different from saline-perfused group.

challenge resulted in a prolonged insulinemia increase that never regained basal values (at 10 min: 57.8 ± 17.3 U/ml) (Fig. 3B).

Blood lactate levels increased in HG rats (Fig. 2C), but lactate is not a secretagogue for pancreatic β -cells, ensuring the effect following the intra-carotid injection of lactate is solely due to cerebral lactate change [28]. No changes in glycemia in both groups occurred during the test (Fig. 4A). In HG animals, lactate injection induced two types of responses (Fig. 4B): 50% of the animals exhibited increased insulin secretion, similar to saline-perfused rats (Area Under the Curve (AUC) = 389.9 in HG-Non Responder (HG-NR) rats vs. AUC = 127.4 in saline rats) and the other 50% exhibited a strong reduction of insulin secretion compared to saline rats (AUC = -926.6 in HG-Responder (HG-R) rats) (Fig. 4B).

3.3. No changes in MBH MCTs protein levels between saline and HG rats

Western blot quantification reveal no significant variations of MCT1 ($90.5 \pm 9.5\%$), MCT4 ($102.0 \pm 3.7\%$) or MCT2 ($92.2 \pm 3.1\%$) protein levels in the MBH of 48 h-HG rats compared to MBH of saline-perfused rats (Fig. 5).

4. Discussion

We show for the first time that cerebral blood lactate triggers insulin secretion in normal rats. The secretion profile was quite similar to that observed after a glucose challenge [1,11,12,19,20], with insulinemia peaking 3 min after the load. The discrepancies in response time and amplitude observed may be explained by the presence of different transporters with specific kinetics (GLUTs for glucose transport and MCTs for lactate) and/or, the fact that the gradient concentration might be less favorable for lactate transfer from blood to astrocytes than for glucose. Nevertheless, this response is in accordance with a previous report showing that hypothalamic sensing of circulating lactate is required to regulate hepatic glucose production [15]. Consistent with these findings, increased blood lactate also rapidly suppresses the expression of the orexigenic peptide NPY and increases the expression of the anorexigenic peptide POMC, which decrease food intake [7,16].

During normoglycemia, brain lactate mainly derives from astroglial glucose metabolism and is transferred to the extracellular space close to GS neurons. During persistent hyperglycemia, blood lactate is proportionally increased [9,27], and may participate to dys-regulations in nutrient sensing. In 48 h HG-rats, we showed that a carotid injection of glucose triggered a sustained insulin response instead of the transient increase normally observed in control rats [1,11,12,20]. This illustrates that brain glucose sensing is sensitized by chronic hyperglycemia and capable of mounting a compensatory hyper-response to a glucose challenge [23]. Both parasympathetic and sympathetic activities, which activate and inhibit insulin secretion respectively, are profoundly modified in this 48 h-hyperglycemic model [23]. The prolongation of brain glucose-induced insulin secretion in HG rats may be the result of increased vagal command as previously reported [2] which could be a factor contributing to energetic imbalance via inappropriate insulin secretion and eventually exhaustion of β -cell function.

Insulin responses to the cephalic injection of lactate in HG animals were heterogeneous. Whilst half of the animals exhibited a secretory pattern similar to control rats, the other half exhibited a profound decrease in insulin secretion. We infer these discrepancies to the use of an outbred strain of rats. Complex traits (phenotypes governed by several genes) display higher variability in such strains due to the heterogeneity of their genetic background. These strains are thus generally more suited to physiological studies because: (1) they closely mimic a human population, (2) the threshold to expose differences between groups is inherently higher thus preventing the study of microphenotypes and (3) it is less likely to miss a phenotype of interest than in isogenic strains [10]. If, however, the heterozygosity level of an outbred population falls due to genetic drift [32], any phenotype may well segregate closer to its mean value or, occasionally, several means. The Wistar rats provided by Charles River, have been rederived twice, in 1947 and 1975 (data provided by supplier), which is enough to introduce genetic drift [32]. The bimodal lactate-induced insulin response thus highlights the presence of a genetic polymorphism affecting this phenotype. Interestingly, the same 50–50 pattern has already found in outbred Wistar rats with “low” and “high” responders in cephalic insulin response to oral glucose [4]

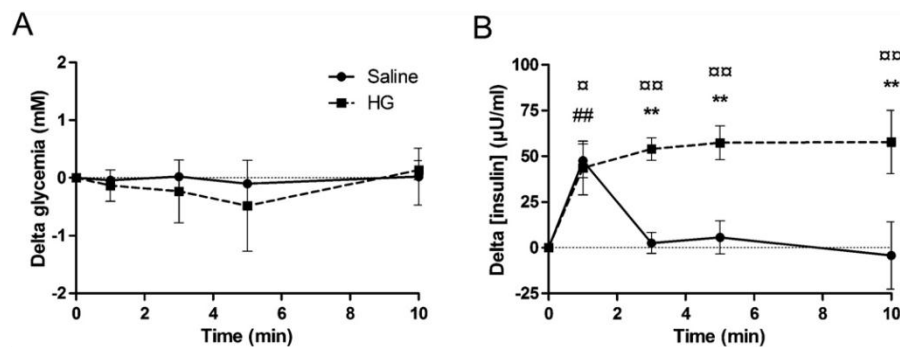


Fig. 3. Insulin secretion in response to a cerebral glucose load in 48 h-hyperglycemic animals. The carotid glucose load (9 mg/kg) toward the brain was performed on HG rats (dotted line, $n=6$) or saline rats (solid line, $n=5$). Delta glycaemia (A) and delta insulinemia (B) are compared to value at time 0, before injection. Values are represented as mean \pm sem. ** $p < 0.01$, significantly different from saline rats. ## $p < 0.01$, significantly different from time 0 in saline group. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ significantly different from time 0 in HG group.

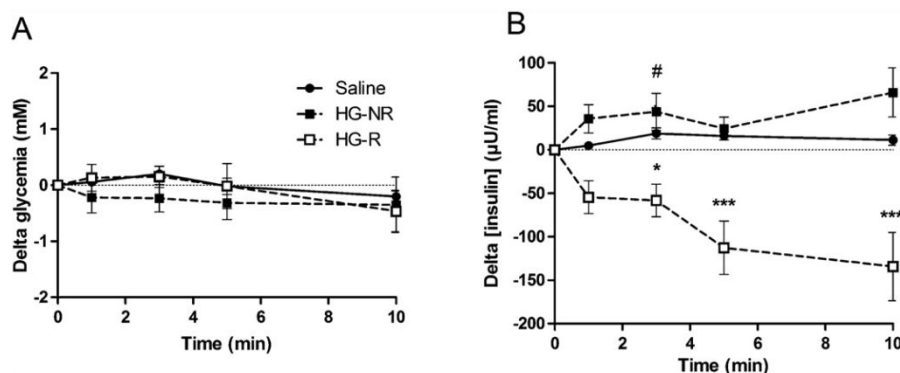


Fig. 4. Insulin secretion in response to a cerebral lactate load. Rats have received a carotid injection of lactate (17 mg/kg) toward the brain. (A) Delta glycaemia of saline rats (solid line, $n=5$) and HG animals (which have been divided in two groups according to the insulin response: non-responder (HG-NR, black square, dotted line, $n=6$) or responder (HG-R, white square, dotted line, $n=6$)) and (B) delta insulinemia are compared to value at time 0. Values are means \pm sem. # $p < 0.05$, saline group significantly different from $t=0$ min. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, HG-R rats significantly different from saline rats.

and in another outbred rat strain (Sprague-Dawley), which present a dual sensibility to diet-induced obesity [21]. These distinct phenotypic profiles may be relevant for quantitative trait locus mapping in genetic studies that have recently focused on outbred populations [10]. At the cellular level, glucose-mediated inhibition of orexin neurons is suppressed by lactate exposure [31], which is tentatively similar to our observations *in vivo* although it is not possible to ascertain in our case whether glucose and lactate-responding cell populations are the same. We speculate that the energetics and redox state of these fuel-sensitive cells might be involved. When blood glucose increases in normal status, lactate is mainly produced from glial cells and is not provided from the blood, a process that uses NADH, leading astrocytes into an oxidized state, which favors lactate export through MCT (co-H⁺ transport) [13]. Neurons converting this lactate into pyruvate will increase their NADH content, increasing their oxidative metabolism and the production of reactive oxygen species which may then be used as downstream signals for the modulation of neuronal activity [19]. However, an abnormal rise in blood lactate as observed in recurrent hyperglycemic status would lead to excessive lactate transport from blood to astrocytes, thus slowing down LDH activity or even reversing its activity. This may in turn decrease lactate export to GS neurons and lead to decrease of NADH supplies to neurons mitochondria (from lactate), finally decreasing their response *in vivo* to lactate, as observed in 48 h-HG rats.

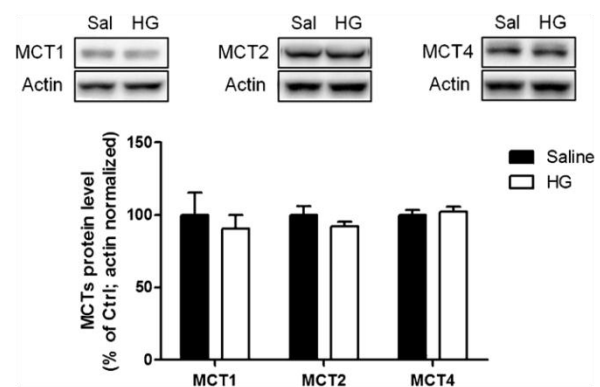


Fig. 5. Effect of 48 h-hyperglycemia on MBH MCT1, 4 and 2 protein levels. Western Blot analyses of MCT1 (~43 kDa), MCT2 (~40 kDa) and MCT4 (~45 kDa) protein levels in MBH homogenates of HG-rats (white histograms, $n=12$) compared with saline rats (black histograms, $n=6$). Results are expressed as percentage of saline after optic density had been normalized using β -actin signal (~42 kDa) as a reference. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test.

MCTs expression is altered in the hypothalamus of diabetic [6] and obesity models [26], suggesting that altered transport of monocarboxylates may interfere with hypothalamic nutrient detection. We thus examined the protein levels of MCT (1, 2, 4) in the MBH of HG animals but report no alterations of the three isoforms of MCTs. Thus, the perturbation of hypothalamic glucose and lactate sensing in this model of early chronic hyperglycemia are not associated with MCTs levels. These results however don't exclude alterations of the transport activity, which will need further in vitro investigations.

Altogether, these experiments highlight that increased brain blood lactate modulates insulin secretion, mimicking glucose effects. A 48 h-hyperglycemia, which simulates early defects of untreated diabetes type 2, was associated with alterations of nutrient sensing: exacerbated insulin secretion in response to glucose, but reduced secretion in response to lactate for some of the animals. These results demonstrate a distinct role for glucose and lactate during metabolic disturbances, at least for the brain control of insulin secretion.

Author contributions

C.A., L.C. and C.L. designed and performed the experiments. C.C. and S.G. participated to the experiments. C.A., S.C. and C.L. interpreted data and wrote the manuscript. L.P. contributed to discussion and reviewed the manuscript.

Acknowledgements

C. A. has a fellowship from the Région Bourgogne, C. L. has a grant from Région Bourgogne (FABER-FEDER), from Agence Nationale de la Recherche (ANR 2011-“ConnexSensing”). We are indebted to A. Lefranc for assistance with the rats (CSGA, UMR6265CNRS-UMR1324 INRA-uB, F-21000 Dijon, France).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2012.11.033>.

References

- [1] T. Alquier, C. Leloup, N. Atef, X. Fioramonti, A. Lorsignol, L. Pénicaud, Cerebral insulin increases brain response to glucose, *Journal of Neuroendocrinology* 15 (2003) 75–79.
- [2] N. Atef, M.C. Laury, J.M. N'Guyen, N. Mokhtar, A. Ktorza, L. Pénicaud, Increased pancreatic islet blood flow in 48 h glucose-infused rats: involvement of central and autonomic nervous systems, *Endocrinology* 138 (1997) 1836–1840.
- [3] I. Bady, N. Marty, M. Dallaporta, M. Emery, J. Gyger, D. Tarussio, et al., Evidence from glut2-null mice that glucose is a critical physiological regulator of feeding, *Diabetes* 55 (2006) 988–995.
- [4] H.R. Berthoud, D.A. Bereiter, E.R. Trimble, E.G. Siegel, B. Jeanrenaud, Cephalic phase, reflex insulin secretion. Neuroanatomical and physiological characterization, *Diabetologia (Suppl. 20)* (1981) 393–401.
- [5] C. Blouet, G.J. Schwartz, Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis, *Behavioural Brain Research* 209 (2010) 1–12.
- [6] M. Canis, M.H. Maurer, W. Kuschinsky, L. Duembgen, R. Duelli, Increased densities of monocarboxylate transporter MCT1 after chronic hyperglycemia in rat brain, *Brain Research* 1257 (2009) 32–39.
- [7] S.H. Cha, M.D. Lane, Central lactate metabolism suppresses food intake via the hypothalamic AMP kinase/malonyl-CoA signaling pathway, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 386 (2009) 212–216.
- [8] M. Chari, C.S. Yang, C.K.L. Lam, K. Lee, P. Mighiu, A. Kokorovic, et al., Glucose transporter-1 in the hypothalamic glial cells mediates glucose sensing to regulate glucose production in vivo, *Diabetes* 60 (2011) 1901–1906.
- [9] Y.D. Chen, B.B. Varasteh, G.M. Reaven, Plasma lactate concentration in obesity and type 2 diabetes, *Diabète & Métabolisme* 19 (1993) 348–354.
- [10] R. Chia, F. Achilli, M.F.W. Festing, E.M.C. Fisher, The origins and uses of mouse outbred stocks, *Nature Genetics* 37 (2005) 1181–1186.
- [11] A.-L. Colombani, L. Carneiro, A. Benani, A. Galinier, T. Jaillard, T. Duparc, et al., Enhanced hypothalamic glucose sensing in obesity: alteration of redox signaling, *Diabetes* 58 (2009) 2189–2197.
- [12] E. Guilloid-Maximin, A. Lorsignol, T. Alquier, L. Pénicaud, Acute intracarotid glucose injection towards the brain induces specific c-fos activation in hypothalamic nuclei: involvement of astrocytes in cerebral glucose-sensing in rats, *Journal of Neuroendocrinology* 16 (2004) 464–471.
- [13] A.P. Halestrap, N.T. Price, The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation, *The Biochemical Journal* 343 (Pt 2) (1999) 281–299.
- [14] S.D. Jordan, A. C. Köhner, J.C. Brüning, Sensing the fuels: glucose and lipid signaling in the CNS controlling energy homeostasis, *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 67 (2010) 3255–3273.
- [15] A. Kokorovic, G.W.C. Cheung, L. Rossetti, T.K.T. Lam, Hypothalamic sensing of circulating lactate regulates glucose production, *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13 (2009) 4403–4408.
- [16] C.K.L. Lam, M. Chari, P.Y.T. Wang, T.K.T. Lam, Central lactate metabolism regulates food intake, *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 295 (2008) E491–E496.
- [17] T.K.T. Lam, R. Gutierrez-Juarez, A. Pocaï, L. Rossetti, Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism, *Science (New York N.Y.)* 309 (2005) 943–947.
- [18] M.C. Laury, F. Takao, D. Bailbe, L. Pénicaud, B. Portha, L. Picon, et al., Differential effects of prolonged hyperglycemia on in vivo and in vitro insulin secretion in rats, *Endocrinology* 128 (1991) 2526–2533.
- [19] C. Leloup, C. Magnan, A. Benani, E. Bonnet, T. Alquier, G. Offer, et al., Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing, *Diabetes* 55 (2006) 2084–2090.
- [20] C. Leloup, M. Orosco, P. Serradas, S. Nicolaidis, L. Pénicaud, Specific inhibition of GLUT2 in arcuate nucleus by antisense oligonucleotides suppresses nervous control of insulin secretion, *Brain Research. Molecular Brain Research* 57 (1998) 275–280.
- [21] B.E. Levin, J. Triscari, A.C. Sullivan, Relationship between sympathetic activity and diet-induced obesity in two rat strains, *The American Journal of Physiology* 245 (1983) R364–R371.
- [22] N. Marty, M. Dallaporta, M. Foretz, M. Emery, D. Tarussio, I. Bady, et al., Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors, *The Journal of Clinical Investigation* 115 (2005) 3545–3553.
- [23] J.M. N'Guyen, C. Magnan, M.C. Laury, C. Thibault, J. Levetau, M. Gilbert, et al., Involvement of the autonomic nervous system in the in vivo memory to glucose of pancreatic beta cell in rats, *The Journal of Clinical Investigation* 94 (1994) 1456–1462.
- [24] L. Pellerin, P.J. Magistretti, Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (1994) 10625–10629.
- [25] K. Pierre, A. Parent, P.-Y. Jayet, A.P. Halestrap, U. Scherrer, L. Pellerin, Enhanced expression of three monocarboxylate transporter isoforms in the brain of obese mice, *The Journal of Physiology* 583 (2007) 469–486.
- [26] G.M. Reaven, C. Hollenbeck, C.Y. Jeng, M.S. Wu, Y.D. Chen, Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM, *Diabetes* 37 (1988) 1020–1024.
- [27] S.M. Schmid, K. Jauch-Chara, M. Hallschmid, K.M. Oltmanns, A. Peters, J. Born, et al., Lactate overrides central nervous but not beta-cell glucose sensing in humans, *Metabolism: Clinical and Experimental* 57 (2008) 1733–1739.
- [28] Z. Song, V.H. Routh, Differential effects of glucose and lactate on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus, *Diabetes* 54 (2005) 15–22.
- [29] J. Toffaletti, M.E. Hammes, R. Gray, B. Lineberry, B. Abrams, Lactate measured in diluted and undiluted whole blood and plasma: comparison of methods and effect of hematocrit, *Clinical Chemistry* 38 (1992) 2430–2434.
- [30] A. Venner, M.M. Karnani, J.A. Gonzalez, L.T. Jønsen, L. Fugger, D. Burdakov, Orexin neurons as conditional glucosensors: paradoxical regulation of sugar sensing by intracellular fuels, *The Journal of Physiology* 589 (2011) 5701–5708.
- [31] B. Yalcin, J. Nicod, A. Bhomra, S. Davidson, J. Cleak, L. Farinelli, et al., Commercially available outbred mice for genome-wide association studies, *PLoS Genetics* 6 (2010).
- [32] X.-J. Yang, L.-M. Kow, D.W. Pfaff, C.V. Mobbs, Metabolic pathways that mediate inhibition of hypothalamic neurons by glucose, *Diabetes* 53 (2004) 67–73.
- [33] X.-J. Yang, L.M. Kow, T. Funabashi, C.V. Mobbs, Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms, *Diabetes* 48 (1999) 1763–1772.

Partie II : Rôle des connexines astrocytaires dans la détection du glucose

Dans la deuxième partie de ma thèse, nous avons étudié les connexines (Cxs) qui participent à la formation des GJ astrocytaires. En effet, les astrocytes sont organisés en réseaux, qui permettent le passage de petites molécules. Récemment, il a été démontré que ces réseaux de Cxs sont indispensables au trafic de métabolites (glucose et lactate) jusqu'aux neurones en activité (Rouach et al., 2008). Nous avons d'abord caractérisé la distribution hypothalamique des Cxs astrocytaires, les Cx43 et 30, qui sont les isoformes majoritaires. Dans un second temps, nous avons suivi l'expression protéique de ces Cxs dans le MBH, dans différentes conditions métaboliques. Enfin, nous avons adopté une stratégie d'inhibition de l'expression de la Cx43 (la plus exprimée) dans le MBH et testé la détection hypothalamique du glucose chez ces animaux.

I. Matériels et méthodes

A. Animaux

Les expériences ont été réalisées sur des rats Wistar Han (250-275g, Charles River, Lyon, France). Les rats sont maintenus dans une pièce éclairée 12 h par jour (7h30-19h30), à la température de 22°C, avec la nourriture et la boisson *ad libitum*. Les chirurgies sont réalisées sous anesthésie gazeuse (Isoflurane 2,5-3%, Abbott, dans 1l/min d'oxygène, Air Liquide, France). Après opération, les rats sont isolés dans des cages individuelles. Le suivi quotidien du poids corporel (3h après le début de la phase diurne) permet de vérifier la bonne santé et la récupération des animaux. Les animaux sont anesthésiés avant euthanasie par une injection intra-péritonéale de pentobarbital (50 mg/kg, Centravet, Velaine en Haye, France). Les protocoles expérimentaux suivent les directives européennes (86/609/EEC) et ont été approuvés par le comité d'éthique de l'Université de Bourgogne.

B. Conditions métaboliques

Plusieurs groupes de rats ont été formés. Pour l'étude du statut métabolique, le groupe nourri (Fed) a été sacrifié au début de la phase diurne. Le groupe à jeun (Fasted) a été sacrifié après 20h de jeûne, au même moment que le groupe nourri. Le groupe « renourri » (Refed) a été sacrifié après 20h de jeûne et 4h de réalimentation *ad libitum*. Pour l'étude de l'effet de l'hyperglycémie sur l'expression des Cx, les animaux sont anesthésiés au pentobarbital (4h après le retrait des croquettes) pendant la durée de l'expérience (3h) et reçoivent deux injections sous-cutanées à t=0h et t=1h30 de sérum physiologique (groupe témoin « NaCl ») ou de glucose 60% (groupe « 3h-HG »). La glycémie est mesurée toutes les 30min. Seuls les animaux dont la glycémie dépasse 10mM ont été gardés dans l'étude. Les animaux ayant subi 48h d'hyperglycémie (48h-HG) sont décrits dans l'article mentionné en page 84.

C. Stéréotaxie et injection de siRNA

Avant la chirurgie, les animaux reçoivent une injection sous-cutanée de buprénorphine (0,03 mg/kg Axience). Sous anesthésie gazeuse, après avoir fixé la tête du rat à l'aide des barres d'oreilles dans le cadre stéréotaxique (Kopf), la peau du crâne est incisée et l'os est nettoyé pour permettre la vue des sutures. Le guide-canule bilatéral est inséré jusqu'au niveau du MBH suivant les coordonnées retenues d'après l'atlas de Paxinos et Watson, soit 3,1mm en arrière du bregma, 0,4mm sur le côté latéral et 9 mm sous la surface du crâne. Après avoir désinfecté la plaie et injecté en sous-cutané de la lidocaïne (10 mg/kg, Ceva), le guide-canule est maintenu en place avec de la colle chirurgicale. Pour les expériences de réalimentation, les animaux sont ensuite opérés afin de poser un cathéter à demeure dans la carotide en direction du cerveau. Celui-ci est maintenu en place par des sutures et sort entre les omoplates de l'animal, où il est fixé par de nouvelles sutures et un point de colle. Le cathéter est rempli de sérum physiologique hépariné pour éviter la coagulation. 2 ml de sérum physiologique sont injectés en sous-cutané dans chaque flan, pour éviter la déshydratation. L'animal est ensuite mis dans sa cage sur un tapis chauffant et surveillé jusqu'à son réveil.

L'injection de siRNA est réalisée 5 jours après la chirurgie stéréotaxique, lorsque le rat a bien récupéré (prise de poids et de croquettes normales). Les siRNA de 21 nucléotides (Genecust, Luxembourg) sont préparés en utilisant le système JetSI (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) et injectés (400 pM) *via* le guide-canule pour atteindre le MBH. La séquence de siRNA cible spécifiquement la Cx43 et nous a été gracieusement communiquée par Arantxa Tabernero (siRNA, brin sens : 5'- GCUGGUUACUGGUGACAGAUdTdT-3'). La diminution d'expression de la Cx43 dans le MBH a été mesurée après 24, 48 et 72h. Les cathéters carotidiens (animaux pour le test de réalimentation seulement) sont contrôlés tous les deux jours, en injectant 50µl de sérum physiologique hépariné.

D. Injection intracarotidienne de glucose vers le cerveau

Le test de la détection du glucose est toujours réalisé en début d'après-midi suite à une période de 4 heures sans croquettes, permettant ainsi une stabilisation des glycémies et une homogénéisation du groupe.

Le test est pratiqué sur des rats anesthésiés au pentobarbital. Une incision est pratiquée à la base du cou, les tissus conjonctifs et musculaires sont dégagés. La carotide est isolée, ligaturée à l'extrémité la plus proche du coeur. Le cathéter est inséré dans la carotide en direction du cerveau et ligaturé pour le maintenir en place. Suite à la cathérisation, on injecte une solution saline héparinée (50 UI/ml) dans le cathéter pour éviter la coagulation. Après stabilisation de la glycémie, l'animal reçoit un bolus de glucose 9 mg/kg. Le bolus de 100 µl est injecté au temps t=0 min en 30 secondes. Des échantillons de sang (environ 200 µl) sont prélevés au niveau de la queue au temps t=0 min (juste avant l'injection du bolus de glucose), t=1 min, t=3 min, t=5 min, t=10 min, pour le dosage de l'insulinémie. Le sang est

prélevé dans des eppendorfs contenant 2 µl d'héparine à la concentration de 5000 UI/ml pour éviter la coagulation. Le sang est ensuite rapidement centrifugé à 5000 g/min pendant 5 minutes. Les plasmas sont alors isolés, congelés et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

E. Test de réalimentation

Les animaux sont mis à jeun juste avant le début de la période diurne (10h) 48h après l'injection des siRNA. Après 20h de jeûne (soit environ 72h après l'injection des siRNA), les animaux éveillés reçoivent par le cathéter carotidien une injection de sérum physiologique (NaCl) ou de glucose 9mg/kg (Glc), 100µl en 30sec. Des croquettes sont disposées dans leur cage et la prise alimentaire est mesurée pendant 4h, toutes les heures. A la fin du test, les animaux sont anesthésiés, une solution de bleu de bromophénol est injectée afin de vérifier le bon emplacement du cathéter carotidien et du guide-canule. Les animaux sont ensuite sacrifiés et le MBH est prélevé et immédiatement congelé dans de l'azote liquide.

F. Immunohistochimie

Les animaux sont anesthésiés au pentobarbital puis reçoivent une perfusion intracardiaque de 80 ml de PBS hépariné (Eurobio, 50U/ml d'héparine, Sanofi Aventis). Les cerveaux sont ensuite rapidement prélevés, congelés à -25°C dans de l'isopentane refroidi, puis stockés à -80°C. Le jour de l'expérience, les cerveaux sont disposés dans la chambre du cryostat dont la température est descendue à -20°C. Ils sont enrobés de milieu de montage cryogénique (Sakura, Tissue Tek) puis découpés en tranches coronales fines de 20µm, déposées sur des lames SuperFrost (Thermofisher). Après séchage des coupes à température ambiante, les coupes sont fixées avec une solution de paraformaldéhyde à 2% (Sigma), pendant 20min à 4°C, sous agitation. Les coupes sont ensuite bloquées, avec une solution de PBS-2% gélatine et 0,2% Triton X-100 (VMR) (=PBS*), 1h à 4°C sous agitation. Les coupes sont incubées avec l'anticorps primaire anti-Cx43 au 1/500 (BD Biosciences, 610062), anti-Cx30 au 1/500 (Zymed, 712200) ou anti-facteur Von Willebrand (FVW) au 1/400 (Sigma, F3520). Après deux rinçages avec la solution de PBS*, les coupes sont incubées avec l'anticorps secondaire Alexa Fluor Chèvre anti-Souris 488 au 1/4000 (Invitrogen, A-11029) pour la Cx43 et Alexa Fluor Chèvre anti-Lapin 488 au 1/4000 pour la Cx30 ou au 1/1000 pour le FVW (Invitrogen, A-11034). Après rinçages et montage entre lame et lamelle, les coupes sont observées sous un microscope à fluorescence muni d'un apotome (Zeiss). La spécificité du marquage a été testée en omettant l'anticorps primaire.

G. Western blot

Les tissus sont repris dans un tampon de lyse contenant 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% de Sodium Deoxycholate, 0,1% SDS, 50mM Tris, pH 8 (environ 10µl de tampon par µg de protéines) puis broyés à l'aide d'une bille métallique au Tissue Lyser (Qiagen)

2x2min à 20Hz. Les échantillons sont rapidement centrifugés puis la concentration protéique est déterminée avec le kit DC Protein Assay (Biorad). 20µg de protéines sont déposés dans un gel pré-coulé 12% d'acrylamide (Biorad). Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF de 0,2µm (Biorad). Les sites aspécifiques sont bloqués avec une solution saline contenant du Tween (10mM Tris, 150mM NaCl, 0,2% Tween, pH 8, appelée TBST) contenant 5% de lait non gras, pendant 1h à température ambiante. Les incubations d'anticorps durent 1h à température ambiante, excepté pour le premier anticorps primaire. Chaque bain d'anticorps est suivi d'une série de 4 rinçages de 5min avec du TBST. Les anticorps anti-Cx43 (souris monoclonal, 1/2000, BD Biosciences), anti-Cx30 (lapin polyclonal, 1/500, Zymed), anti-MCT1 (lapin polyclonal, 1/500, Millipore), anti-MCT2 (lapin polyclonal, 1/20 000, Millipore), anti-MCT4 (lapin polyclonal, 1/250, Millipore), anti-GLUT1 (lapin polyclonal, 1/1000, Millipore) et anti-GLUT3 (lapin polyclonal, 1/4000, Millipore) sont dilués dans du TBST-1% lait et incubés sous agitation à 4°C pour la nuit. Les membranes sont incubées avec un anticorps secondaire anti-souris ou anti-lapin (suivant l'anticorps primaire) couplé à l'HRP (1/10 000, GE Healthcare). Puis, un anticorps anti-GAPDH (souris monoclonal, 1/6000, Ambion) est utilisé dans du TBST-1% lait, puis ensuite un anticorps secondaire anti-souris couplé à l'HRP (1/10 000, GE Healthcare). Les bandes sont révélées par chimiluminescence après l'ajout d'un réactif (Western C, Biorad), puis enregistrées avec le système ChemiDoc XRS+ et le logiciel ImageLab (Biorad), pour la quantification des bandes.

H. Analyses biochimiques

La glycémie est mesurée à partir d'une gouttelette de sang déposée sur une bandelette d'un lecteur glycémique Performa AccuChek (Roche, France). L'insulinémie est mesurée en utilisant un kit ELISA ultra-sensible (AlpCo, Eurobio, France).

I. Statistiques

L'analyse statistique est réalisée avec le logiciel Prism 4.0 (GraphPad). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm sem. La normalité a été testée avec un test de Kolmogorov-Smirnov. Suite aux résultats, des tests de Student ou des tests t non-appariés avec une correction de Welch lorsque les variances sont hétérogènes ont été réalisés pour les comparaisons simples (entre deux points donnés). Pour les comparaisons multiples, une analyse de variance (ANOVA) à 2 paramètres (suivie d'un post-test de Bonferroni) a été réalisée pour détecter les interactions. Lorsqu'il existe une interaction, les comparaisons entre les groupes sont réalisées indépendamment grâce au test de Student ou de Mann-Whitney selon l'hétérogénéité des variances. Lorsque le traitement siRNA ne produit pas d'effet significatif, une ANOVA à un paramètre a été utilisée combinée au test post-hoc de Bonferroni. La normalité de la distribution a été vérifiée avec le test de Kolmogorov-Smirnov. Les différences significatives sont notées *, **, *** sur les figures lorsque les valeurs de « p » étaient respectivement < 0,05 ; 0,01 et 0,001.

II. Résultats

A. Expression des connexines astrocytaires Cx43 et Cx30 dans le MBH

Les connexines 30 et 43 sont les unités protéiques de base de la formation des GJ astrocytaires. Nous avons mesuré leur expression dans différentes régions cérébrales par Western blot, et observé leur distribution dans l'hypothalamus par immunohistochimie. La Cx43 est fortement exprimée dans le MBH par rapport à d'autres régions cérébrales, ainsi en proportion de l'expression trouvée dans le MBH : $52,0 \pm 5,2\%$ pour le cortex pariétal, $35,3 \pm 4,2\%$ pour le thalamus, $63,2 \pm 8,8\%$ pour l'hippocampe, $19,7 \pm 3,7\%$ pour le cervelet et $68,7 \pm 6,2\%$ pour le tronc cérébral. En revanche, l'expression de la Cx30 dans l'ensemble de ces structures n'est pas significativement différente, en raison d'une plus grande hétérogénéité (respectivement $108,5 \pm 13,8\%$ pour le cortex, $51,5 \pm 5,5\%$ pour le thalamus, $32,7 \pm 18,3\%$ pour l'hippocampe, $80,0 \pm 13,9\%$ pour le cervelet et $119,8 \pm 18,8\%$ pour le tronc cérébral par rapport à l'expression dans le MBH) (Figure 35A et B).

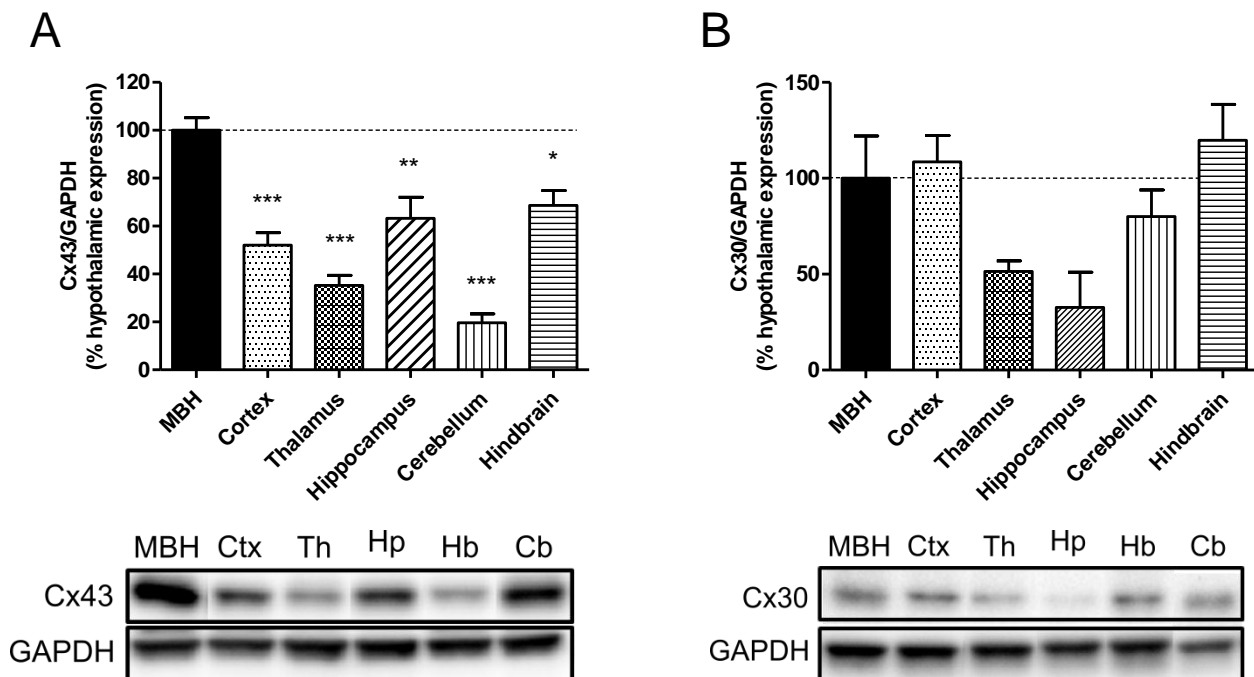


Figure 35 : Les connexines astrocytaires sont exprimées dans l'hypothalamus

Quantification densitométrique et exemples représentatifs des western blots de la Cx43 (A) et de la Cx30 (B) réalisés sur différentes régions cérébrales de rats (n=4) : l'hypothalamus médio-basal (MBH ou Ht), le cortex (Ctx), le thalamus (Th), l'hippocampe (*hippocampus* ou Hp), le cervelet (*cerebellum* ou Cb) et le tronc cérébral (*hindbrain* ou Hb). Les valeurs représentent les moyennes en %/moyenne du MBH en % ± les sem de ce même rapport. L'analyse statistique est réalisée par une ANOVA à un paramètre, suivi d'un post-test de Bonferroni.

Les immunohistochimies anti-Cx43 révèlent un marquage qui dessine les microvaisseaux sanguins du MBH ([Figure 36A](#)). Ce marquage autour des capillaires est confirmé par le marquage Cx43 qui entoure le marquage FVW ([Figure 36B](#)). Le marquage Cx30 est plus diffus dans l'hypothalamus, même si l'on note une densité légèrement plus importante au niveau de la bordure ventriculaire du NA ([Figure 36C](#)).

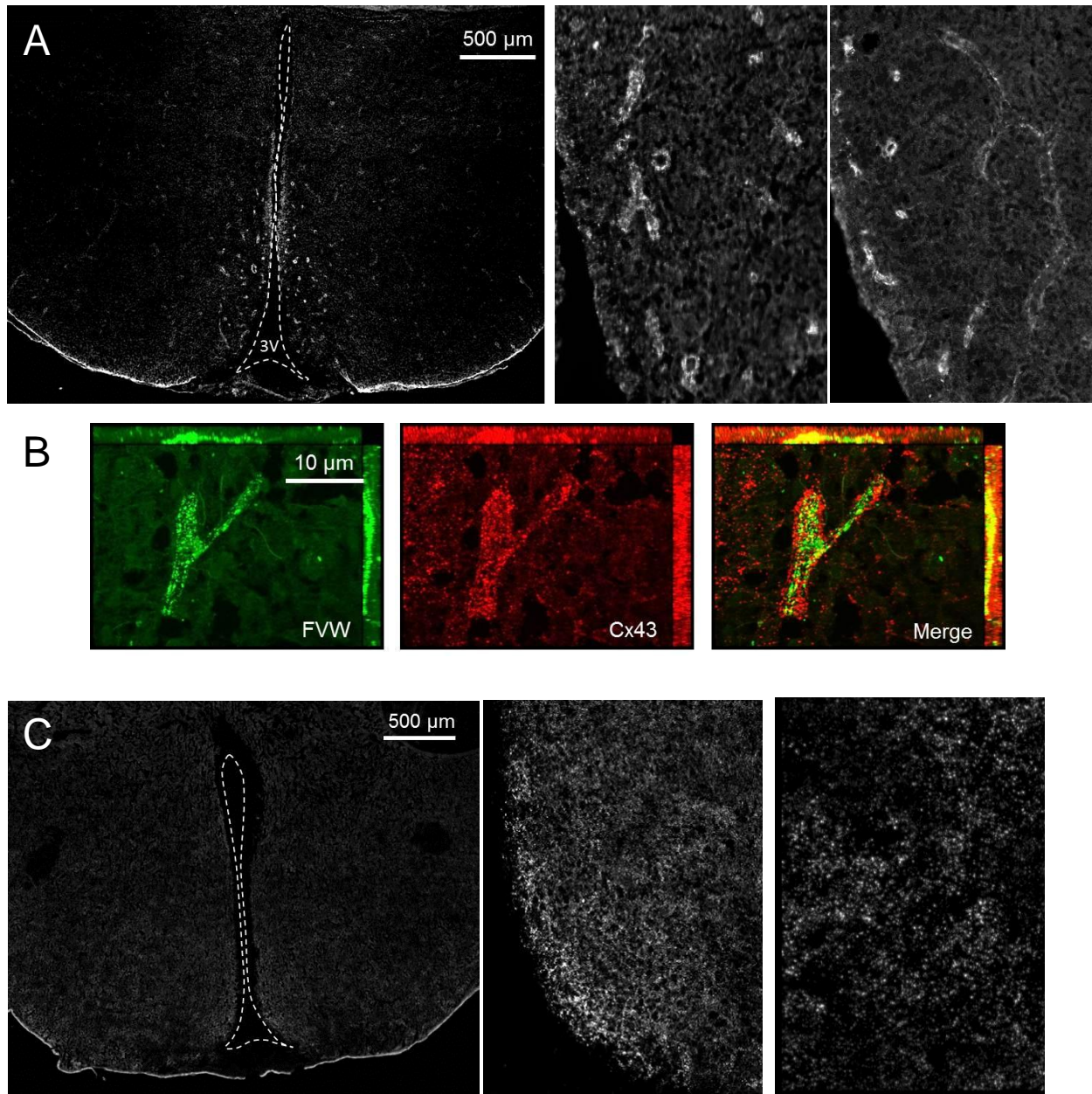


Figure 36 : Les connexines astrocytaires présentent une répartition différente au sein du MBH.

A] La Cx43 est très exprimée dans les pieds astrocytaires entourant les capillaires du MBH. **B]** Observation à l'apoteome d'une immunohistochimie du facteur von Willebrand (vert, FVW) et de la Cx43 (rouge). La superposition des images montre la présence de la Cx43 autour des capillaires du MBH. **C]** L'expression de la Cx30 est plus diffuse dans l'hypothalamus, d'aspect ponctiforme, avec une expression un peu plus marquée au niveau du NA en bordure du 3V. Immunohistochimies réalisées sur des coupes de cerveaux de rats (n=6).

B. Effet du statut métabolique sur l'expression des connexines

Les Cxs 43 sont très exprimées à l'interface de l'endothélium vasculaire avec le parenchyme cérébral, et particulièrement au niveau hypothalamique, dans le MBH riche en neurones GS. Nous avons donc voulu explorer si des conditions connues pour modifier la détection hypothalamique du glucose pouvaient également altérer l'expression des Cxs astrocytaires. Ainsi, suite à un jeûne de 20h (condition où la détection hypothalamique du glucose est diminuée, données non publiées), l'expression hypothalamique (MBH) de la Cx43 est diminuée ($67,9 \pm 4,1\%$ par rapport aux rats nourris), alors que celle de la Cx30 est très fortement augmentée ($265,9 \pm 16,8 \%$ par rapport aux rats nourris). Lorsque ces rats sont nourris pendant 4h suite au jeûne, l'expression des Cxs astrocytaires tend à augmenter par rapport aux niveaux à jeun ($85,9 \pm 5,2 \%$ pour la Cx43 et $321,6 \pm 30,4 \%$ pour la Cx30, non différent du statut à jeun) (Figure 37 A et B). Pour la Cx43, les niveaux d'expression se rapprochent donc de ceux obtenus au statut nourri. En revanche, la Cx30 est augmentée d'un facteur trois par rapport à ce statut de référence.

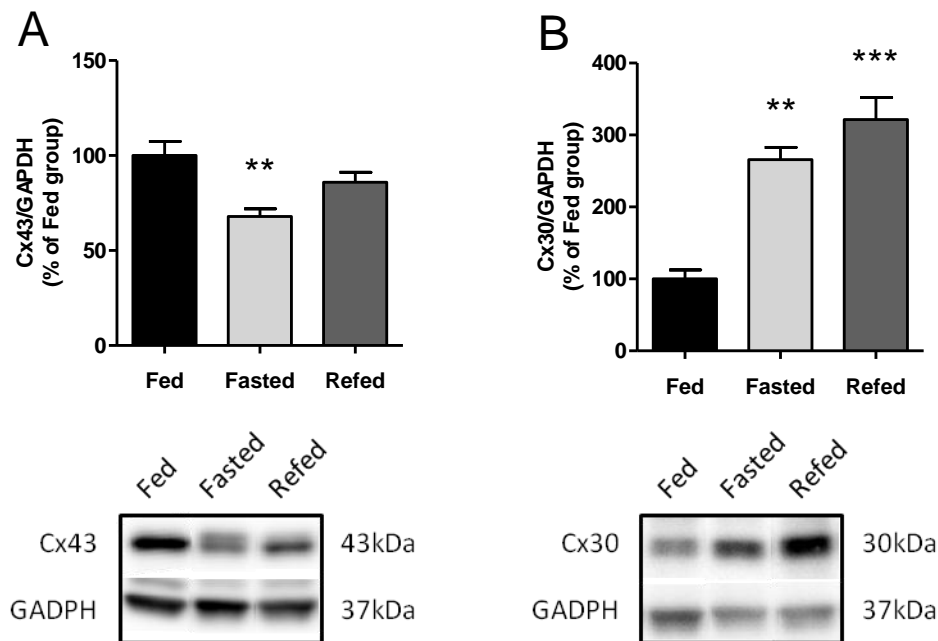


Figure 37: Expression des connexines astrocytaires après un jeûne (20h) et une réalimentation (4h).

Quantification densitométrique et exemples représentatifs de western blots de la Cx43 (A) et de la Cx30 (B) réalisés sur des homogénats tissulaires de MBH après un jeûne de 20h et une réalimentation de 4h (n=4-5). Les valeurs représentent les moyennes en %/moyenne des rats Fed en % \pm les sem de ce même rapport. L'analyse statistique est réalisée par une ANOVA à un paramètre, suivi d'un post-test de Bonferroni.

Afin d'étudier l'effet plus spécifique de l'hyperglycémie sur le profil d'expression des Cxs, nous avons rendu des rats hyperglycémiques pendant 3h ou 48h. Après 3h, les rats présentent une augmentation de l'expression de la Cx43 dans le MBH ($152,9 \pm 12,8 \%$ par

rapport aux rats témoins ayant reçu une injection de NaCl (Figure 38A). Lorsque l'hyperglycémie est maintenue autour de 15mM pendant 48h (statut où la détection hypothalamique du glucose est modifiée, cf. Partie I des résultats), alors l'expression de la Cx43 se normalise ($117,8 \pm 6,3$ % par rapport aux rats témoins ayant reçu une perfusion de NaCl) (Figure 38B). En revanche, l'expression de la Cx30 n'est pas modifiée après 3 ou 48h d'hyperglycémie ($108,1 \pm 12,6$ % par rapport aux rats témoins après 3h d'HG et $105,7 \pm 2,7$ % après 48h-HG) (Figure 38C et D).

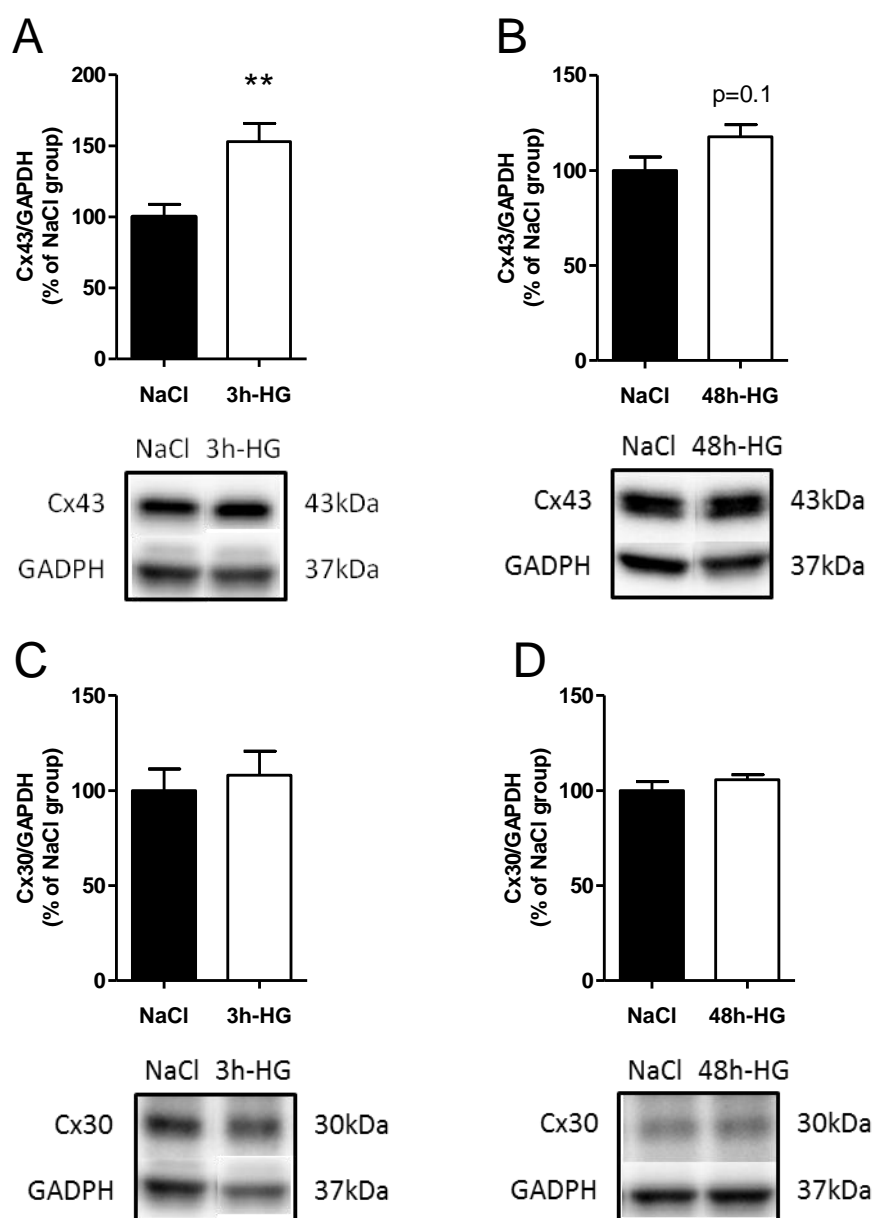


Figure 38 : Expression des connexines astrocytaires après une hyperglycémie

Quantification densitométrique et exemples représentatifs des western blots de la Cx43 (A-B) et de la Cx30 (C-D) réalisés sur des homogénats tissulaires de MBH après une hyperglycémie de 3h (n=6 dans chaque groupe) ou de 48h (n=5 pour NaCl, n=8 pour 48h-HG). Les valeurs représentent les moyennes en %/moyenne des rats témoins en % \pm les sem de ce même rapport. L'analyse statistique est réalisée par un test de Student.

C. Implication de la Cx43 dans la détection hypothalamique du glucose

Afin de déterminer si la Cx43 était nécessaire dans la détection hypothalamique du glucose, nous avons inhibé son expression, *via* l'injection de siRNA dirigés contre l'ARNm codant pour cette protéine. L'injection a été faite spécifiquement dans le MBH, où la proportion de neurones GS est la plus importante.

L'expression de la Cx43 suite à l'injection de siRNA a été mesurée par western blot sur des lysats protéiques du MBH 24, 48 et 72 après l'injection des siRNA. 24h après l'injection, l'expression de Cx43 ne diffère pas significativement entre les groupes recevant les siRNA ciblant la Cx43 (groupe nommé siCx43) et le groupe de rats témoins (-27,0 ± 9,9% d'inhibition) nommés siCtrl, qui reçoivent une séquence aléatoire, ne s'hybridant avec aucune séquence identifiée. Dès 48h, nous avons pu observer une diminution significative de l'expression protéique de Cx43 (-45,8 ± 5,5%), où elle atteint son maximum. L'inhibition diminue ensuite et on observe une restauration partielle de l'expression à 72h où l'inhibition n'est plus que de -29,7 ± 4,3% (Figure 39A). Le suivi du poids et de la prise alimentaire des animaux révèle un effet propre à l'injection, retrouvé chez les deux groupes d'animaux (Figure 41).

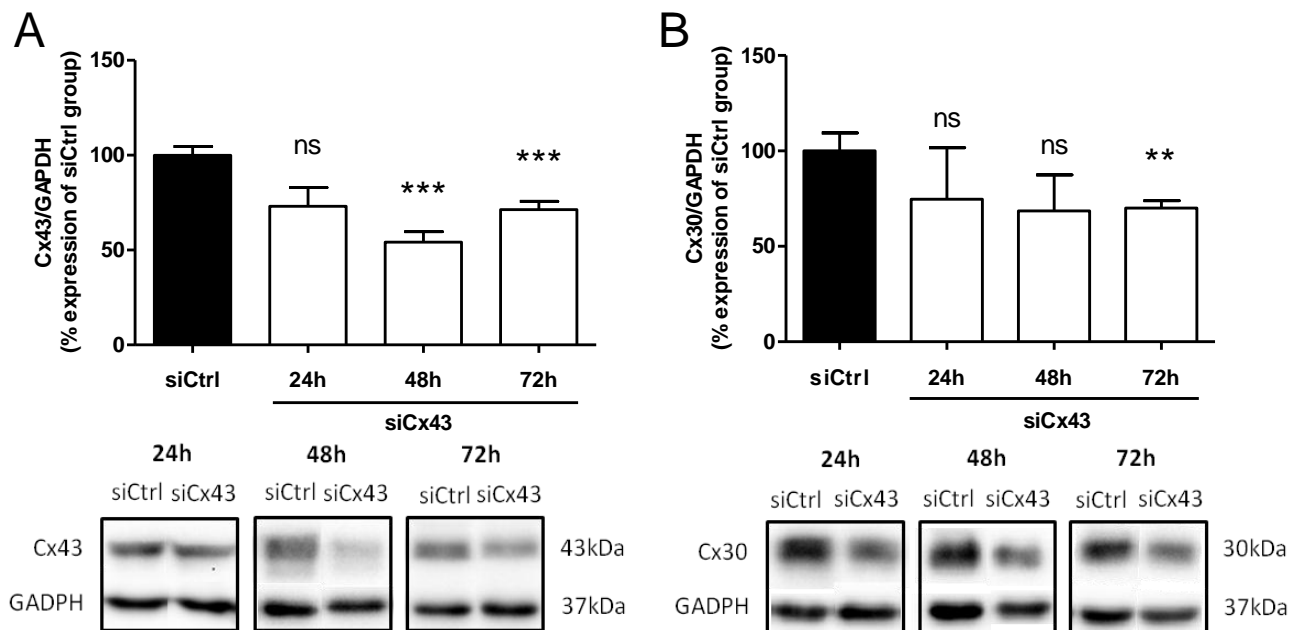


Figure 39 : Suivi de l'inhibition des connexines astrocytaires suite à l'injection de siRNA
Quantification densitométrique et exemples représentatifs des Western blots de la Cx43 (A) (n=10-14) et de la Cx30 (B) (n=5-11), 24, 48 et 72h après l'injection de siRNA. Les valeurs représentent les moyennes en %/moyenne des rats siCtrl en % ± les sem de ce même rapport. L'analyse statistique est réalisée avec un test de Student entre les siCtrl et les siCx43 pour chaque temps donné.

Dans la littérature, il est souvent rapporté que des phénomènes de compensation se mettent en place : il peut y avoir surexpression d'une Cx suite à la diminution d'une autre Cx exprimée dans un type cellulaire donné. Nous avons ainsi vérifié l'expression de la Cx30. De manière surprenante, il apparaît que la Cx30 est elle aussi diminuée 72h après l'injection des siCx43, au moment où l'expression de la Cx43 augmente de nouveau ($-25,3 \pm 24,2 \%$ à 24h, $-31,5 \pm 18,9 \%$ à 48h et $-29,9 \pm 3,8 \%$ à 72h), bien qu'il n'existe pas d'homologie de séquence entre les deux ([Figure 39B](#)).

L'efficacité maximale d'inhibition est obtenue 48h après l'injection des siRNA et reste significativement plus basse à 72h. Suite à la diminution de l'expression de la Cx43, la Cx30 astrocytaire n'est pas surexprimée de façon compensatoire, et diminue à 72h, alors que l'expression de la Cx43 est, elle, moins inhibée qu'à 48h.

Des expériences précédentes, réalisées dans le laboratoire, ont montré qu'une injection similaire de siRNA dans le MBH ne diffusait pas au-delà de la zone d'intérêt, soit *via* le parenchyme, soit *via* le liquide céphalorachidien du 3V ([Carneiro et al., 2012](#)). Par des expériences d'immunohistochimie, nous avons vérifié que l'inhibition de la Cx43 était localisée au niveau du MBH et n'était pas présente dans d'autres régions cérébrales telles que le cortex ou le thalamus ([Figure 40](#)).

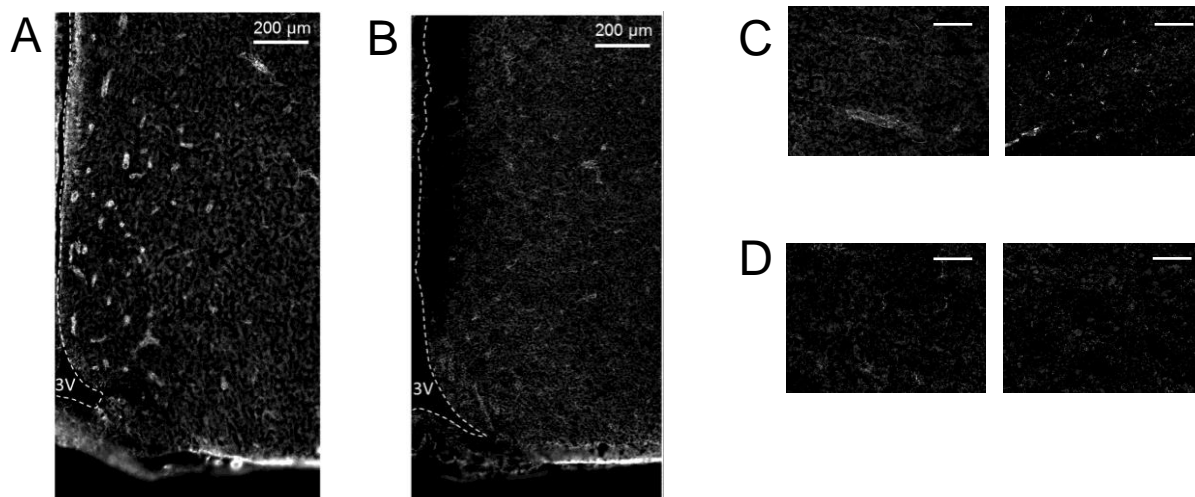


Figure 40 : Inhibition représentative de l'expression de la Cx43 après injection des siCx43 dans le MBH.

Marquage de la Cx43 sur une coupe de MBH (A), de cortex pariétal (C gauche) et du thalamus ventromédian (D gauche) d'un animal ayant reçu des siCtrl. Marquage de la Cx43 sur une coupe de MBH (B), de cortex pariétal (C droit) et du thalamus ventromédian (D droit) d'un animal ayant reçu des siCx43. Barre d'échelle 200µm (A-B) et 100µm (C-D).

Dans un premier temps, les conséquences de l'injection et de l'inhibition de la Cx43 dans le MBH sur des paramètres de l'homéostasie énergétique ont été évaluées. La PA ainsi que le poids corporel ont été suivis avant (-48h et -24h) et après l'injection des siRNA

(Figure 41A et B). Suite à l'injection, les deux groupes d'animaux présentent une cinétique de PA différente. Ainsi, 24h après l'injection des siRNA, alors qu'une chute du poids corporel est observée dans les deux groupes, seule la PA des siCtrl est modifiée (Figure 41B). 48h après l'injection, la PA se stabilise dans le groupe siCtrl mais diminue dans le groupe siCx43. Finalement, à 72h, les animaux siCtrl ont retrouvé une prise alimentaire et un gain de poids similaire au temps avant injection. En revanche, bien que le poids des deux groupes d'animaux ne soit pas différent à 72h, les rats siCx43 présente une PA significativement plus basse que le groupe témoin siCtrl. 72h après l'injection intracérébrale de siRNA, la PA des animaux témoins est donc restaurée, montrant une récupération totale (poids et PA). C'est pourquoi l'ensemble des expériences ont été réalisées à t=72h. Aucune modification du poids corporel n'a été mesurée au cours du temps entre les deux groupes : ils présentent des courbes de poids similaires (Figure 41A).

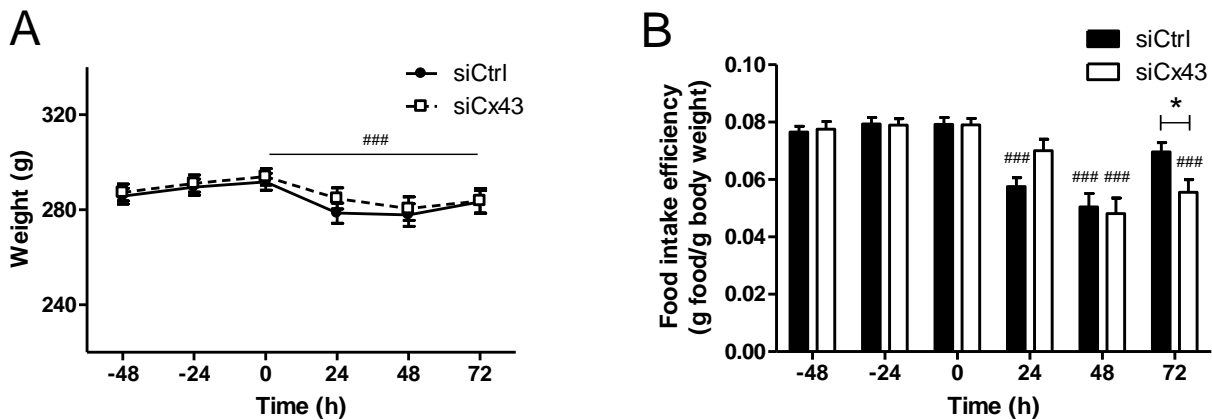


Figure 41 : Suivi du poids et de la prise alimentaire après l'injection des siRNA.

L'inhibition de la Cx43 dans le MBH induit une chute significative du poids ($p < 0,001$) qui n'est pas différente entre les deux groupes d'animaux (A), ainsi qu'une diminution de l'efficacité de la prise alimentaire à 72h chez les siCx43 (B). Les valeurs de poids représentent les moyennes \pm sem. Les valeurs de PA représentent les moyennes en %/moyenne des rats siRNA au temps t0 en % \pm les sem de ce même rapport. L'analyse statistique a été réalisée par une ANOVA à deux paramètres suivie d'un post-test de Bonferroni, pour détecter des différences au cours du temps et entre chaque groupe ($n=21$ pour les siCtrl et $n=19$ pour les siCx43).

Nous avons donc retenu le temps 72h pour réaliser nos expériences afin de nous situer dans un contexte physiologique, non perturbé par la récupération du poids et de la PA des animaux suite à l'injection. De plus, les immunohistochimies présentées plus haut sur les coupes transversales de ces animaux à 72h montrent un tissu MBH dont la structure est homogène, exempt de traumatisme lié à l'injection, au moins à cette échelle.

L'expression des autres protéines majeures du transport du glucose et du lactate a été évaluée dans le MBH à 72h. Aucune modification n'a été notée que ce soit pour MCT1, 2 et 4 (transporteurs de lactate) ou GLUT1 et 3 (principaux transporteurs de glucose),

suggérant qu'aucun mécanisme de compensation n'ait été mis en place *via* ces protéines (Figure 42).

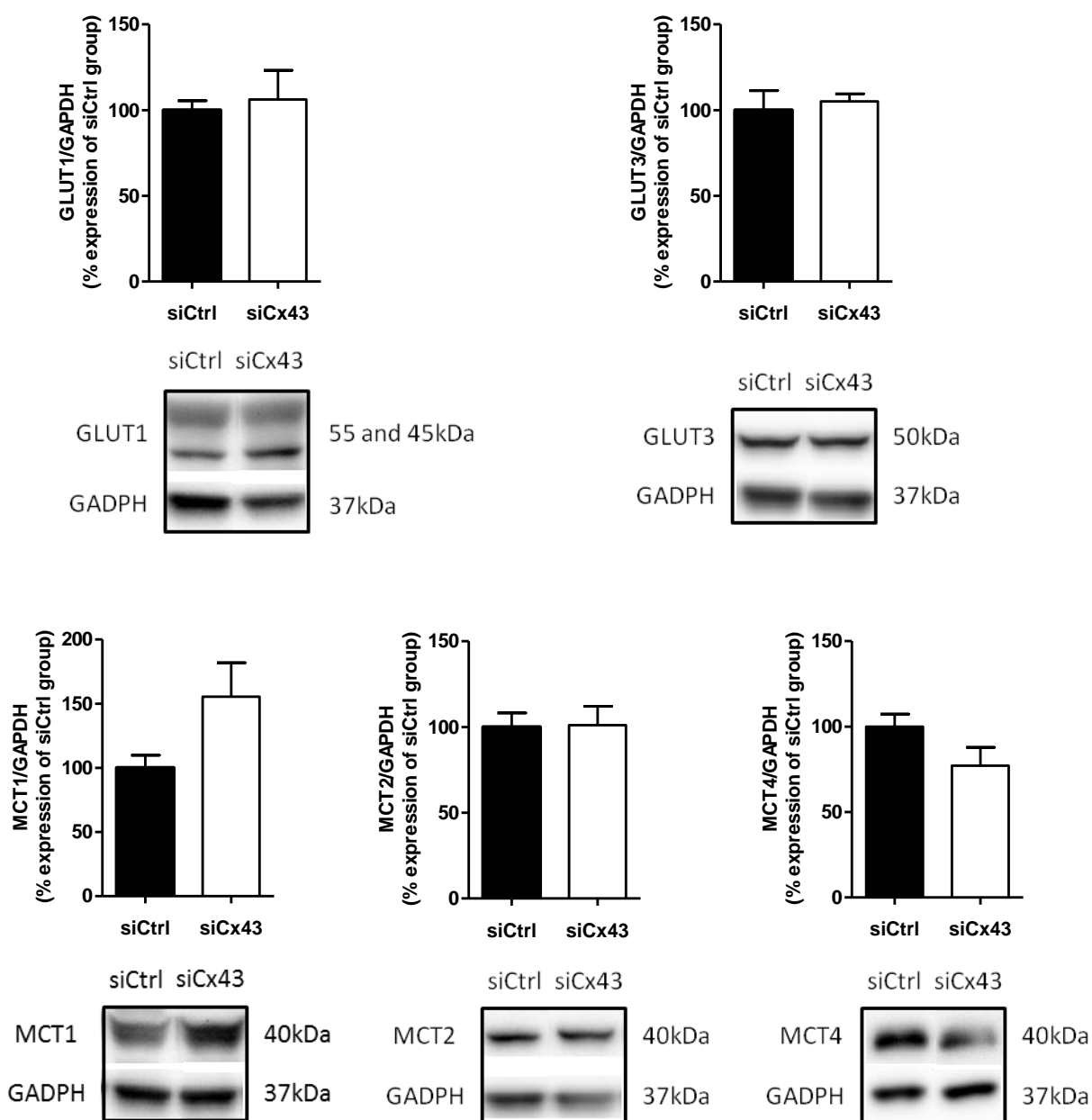


Figure 42 : Expression des transporteurs de glucose et de lactate 72h après l'injection de siRNA.

Quantification densitométrique et exemples représentatifs des Western Blot de GLUT1, GLUT3, MCT1, MCT2 et MCT4, 72h après l'injection de siCtrl ou siCx43 (n=6-13). Les valeurs représentent les moyennes en %/moyenne des rats siCtrl en % \pm les sem de ce même rapport. L'analyse statistique a été faite avec un test de Student.

Enfin, certains paramètres biochimiques liés à l'homéostasie glucidique ont été mesurés. Ces mesures montrent que ni la glycémie ($6,9 \pm 0,1$ mM pour les siCtrl vs $7,0 \pm 0,3$

mM pour les siCx43) ni l'insulinémie ($22,0 \pm 6,0 \mu\text{U/ml}$ pour les siCtrl vs $28,8 \pm 7,4 \mu\text{U/ml}$ pour les siCx43) ne sont affectées par l'inhibition de la Cx43 dans le MBH (Figure 43).

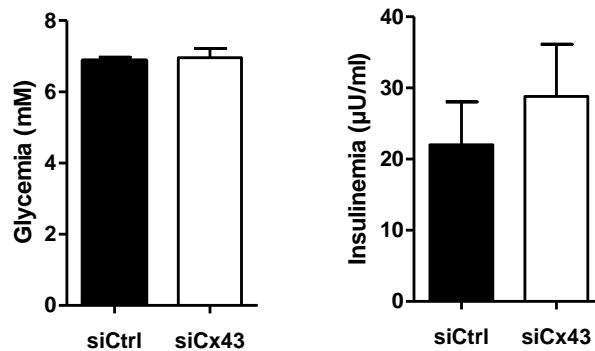


Figure 43 : Glycémie et Insulinémie à 72h après l'injection des siRNA.

A partir des prélèvements sanguins, le dosage de la glycémie (A) et de l'insulinémie (sur les plasmas, dosage ELISA) (B) sont réalisés (n=5 dans chaque groupe). Les données sont représentées par les moyennes \pm sem et analysées par des tests de Student.

Pour comprendre le rôle des réseaux astrocytaires par la Cx43 dans la détection du glucose au niveau du MBH, nous avons étudié les conséquences de son inhibition dans la détection d'une augmentation cérébrale transitoire de la concentration extracellulaire en glucose. Deux études ont été réalisées pour cela. La première implique l'axe hypothalamo-pancréatique et le contrôle nerveux de la sécrétion d'insuline. La seconde concerne la prise alimentaire et l'effet satiétogène du glucose sur les rats mis à jeun lors de la réalimentation.

1. Inhibition de la Cx43 et sécrétion d'insuline

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressé à l'axe hypothalamo-pancréatique. Dans l'équipe, il a été montré précédemment qu'une injection carotidienne de glucose vers le cerveau (9mg/kg) induisait 1 min après l'injection un pic de sécrétion d'insuline en périphérie. Cette injection ne provoque aucune modification de glycémie, la sécrétion observée est donc uniquement due à la détection cérébrale du glucose. Cette détection cérébrale nécessite la métabolisation du glucose par les astrocytes pour déclencher la réponse, en effet, l'activation neuronale enregistrée dans le NA et la sécrétion d'insuline sont abolies en présence d'inhibiteurs du métabolisme astrocytaire ou des transporteurs de lactate (Guillod-Maximin et al., 2004; Lam et al., 2005a).

Nous avons donc exploré la sensibilité hypothalamique au glucose des rats siCx43 en utilisant ce test. La glycémie, suite à l'injection carotidienne, reste constante dans les deux groupes (Figure 44A). La sécrétion d'un pic d'insuline à 1 min est bien présente chez les rats siCtrl ayant reçu un bolus de glucose (delta insulinémie de $40,9 \pm 6,2 \mu\text{U/ml}$ en réponse au

glucose) (Figure 44B). La détection cérébrale du glucose lors de ce test n'est donc pas altérée chez les animaux siCtrl.

En revanche, les rats chez lesquels la protéine Cx43 a été inhibée de 30% en moyenne, le pic d'insuline est fortement diminué en réponse au glucose (delta insulinémie à 1 min de $15,7 \pm 8,1 \mu\text{U/ml}$, soit une diminution de plus d'un facteur 2 comparée aux rats siCtrl). Ce résultat montre donc le rôle de la protéine Cx43 lors de la détection du glucose (Figure 44).

Les connexines astrocytaires, qui participent à la formation des GJ des réseaux astrocytaires, apparaissent donc nécessaires à la détection du glucose dans le MBH, qui conduit à la sécrétion d'insuline suite à une augmentation de la concentration cérébrale en glucose.

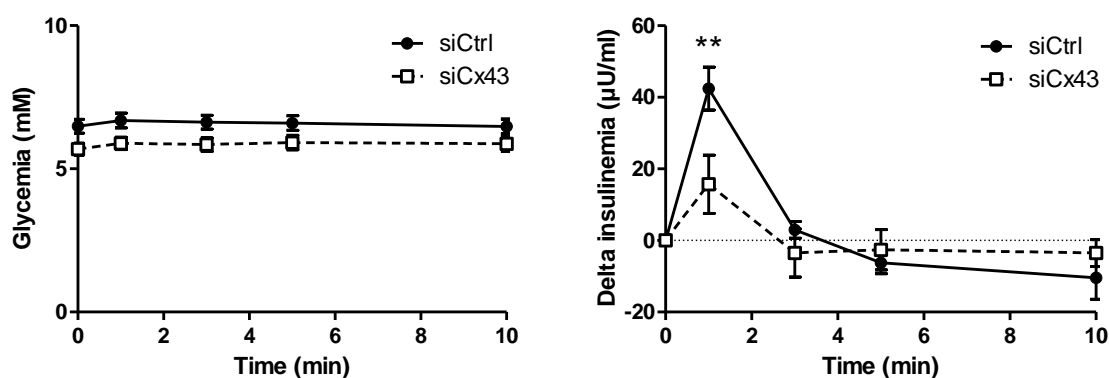


Figure 44 : Diminution de la sensibilité au glucose du MBH 72h après l'injection de siCx43.

Les rats reçoivent un bolus de glucose de 9mg/kg en direction du cerveau. **A**] Glycémie (mM) lors du test, présenté sous forme de moyenne \pm sem. **B**] Variation de la sécrétion d'insuline (delta insulinémie, en $\mu\text{U/ml}$) par rapport au temps $t=0\text{min}$ avant injection. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm sem. Les différences significatives résultent de l'analyse statistique par une ANOVA à deux paramètres suivie d'un post test de Bonferroni ($n=10$ pour les siCtrl et $n=7$ pour les siCx43).

2. Inhibition de la Cx43 et signal satiétogène du glucose

Dans un premier temps, nous avons mis au point un test de réalimentation qui permette d'apprécier l'effet satiétogène du glucose. Ce test consiste en l'injection de glucose par la carotide en direction du cerveau de rats éveillés à jeun depuis 20h (pour stimuler leur PA ensuite sur un temps court), la prise alimentaire étant alors mesurée pendant les 4h suivant l'injection de glucose. Le test de réalimentation est effectué 72h après l'injection de siRNA. L'ensemble de ces résultats sont préliminaires : le nombre d'animaux de certains groupes n'est pas suffisamment élevé pour mettre en évidence une significativité statistique.

Les rats siCtrl ont ainsi tendance à manger moins lorsqu'ils ont reçu une injection de glucose vers le cerveau après 4h de réalimentation comparativement à ceux n'ayant reçu que du NaCl (Figure 45). Ces résultats suggèrent que les rats ayant eu une injection de glucose atteignent un rassasiement plus rapidement que les animaux ayant reçu du NaCl. Ces résultats vont dans le sens du rôle satiétogène du glucose dû à sa détection cérébrale, montré lors d'une injection de glucose dans le MBH directement (Carneiro et al., 2012). Les rats siCx43 ayant reçu l'injection de NaCl présentent une PA similaire au groupe siCtrl NaCl. En revanche, suite à l'injection de glucose, la PA des rats siCx43 reste équivalente à celle des animaux ayant reçu l'injection de NaCl (Figure 45).

Ces résultats préliminaires suggèrent que le signal de satiété induit par le glucose injecté vers le cerveau pourrait être diminué lorsque l'expression des Cx astrocytaires est diminuée.

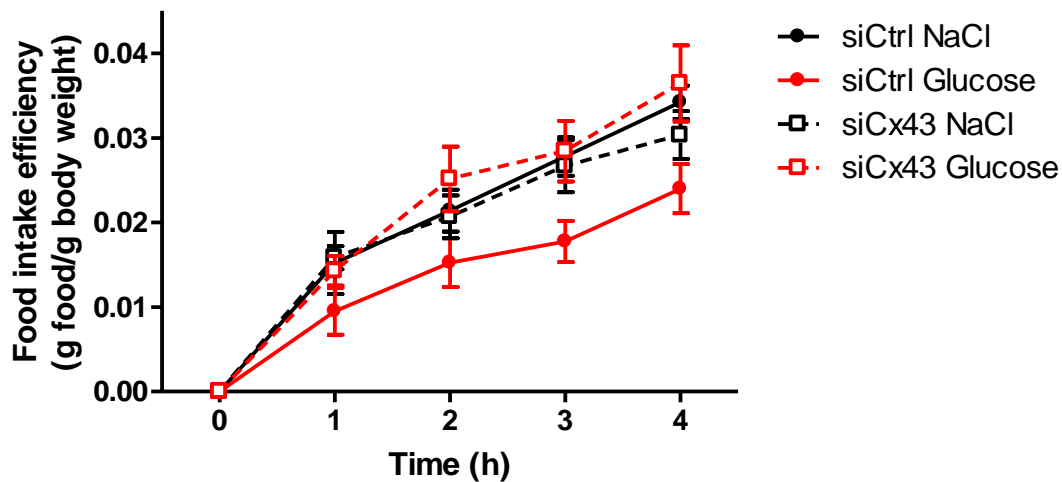


Figure 45 : Suivi de la prise alimentaire suite à l'injection de glucose vers le cerveau lors d'un test de réalimentation chez le rat préalablement mis à jeun.

Des rats placés à jeun pendant 20h sont remis en présence de croquettes et leur prise alimentaire est mesurée durant 4h suite à une injection carotidienne vers le cerveau d'un bolus de 200µl sur 1min de NaCl 0,9% ou de glucose 9mg/kg. Les données sont représentées par les moyennes ± sem. L'analyse statistique est effectuée par une ANOVA à deux paramètres suivie d'un post test de Bonferroni. (siCtrl NaCl n=5, siCtrl Glc n=4, siCx43 NaCl n=6, siCx43 n=7).

Nous avons vu que le jeûne et la réalimentation induisent une modification de l'expression des Cxs astrocytaires chez des rats normaux (Figure 37). Avant d'aller plus loin, nous avons donc vérifié l'expression hypothalamique des Cxs des rats siRNA après un jeûne de 20h et une réalimentation de 4h. De manière surprenante, le jeûne abolit l'inhibition normalement retrouvée 72h après l'injection des siCx43 (Figure 46A et C). De même, la réalimentation provoque une surexpression de la Cx43 (NaCl ou Glucose) et une tendance à l'augmentation de la Cx30 dans le groupe siCx43 (Figure 46B et D).

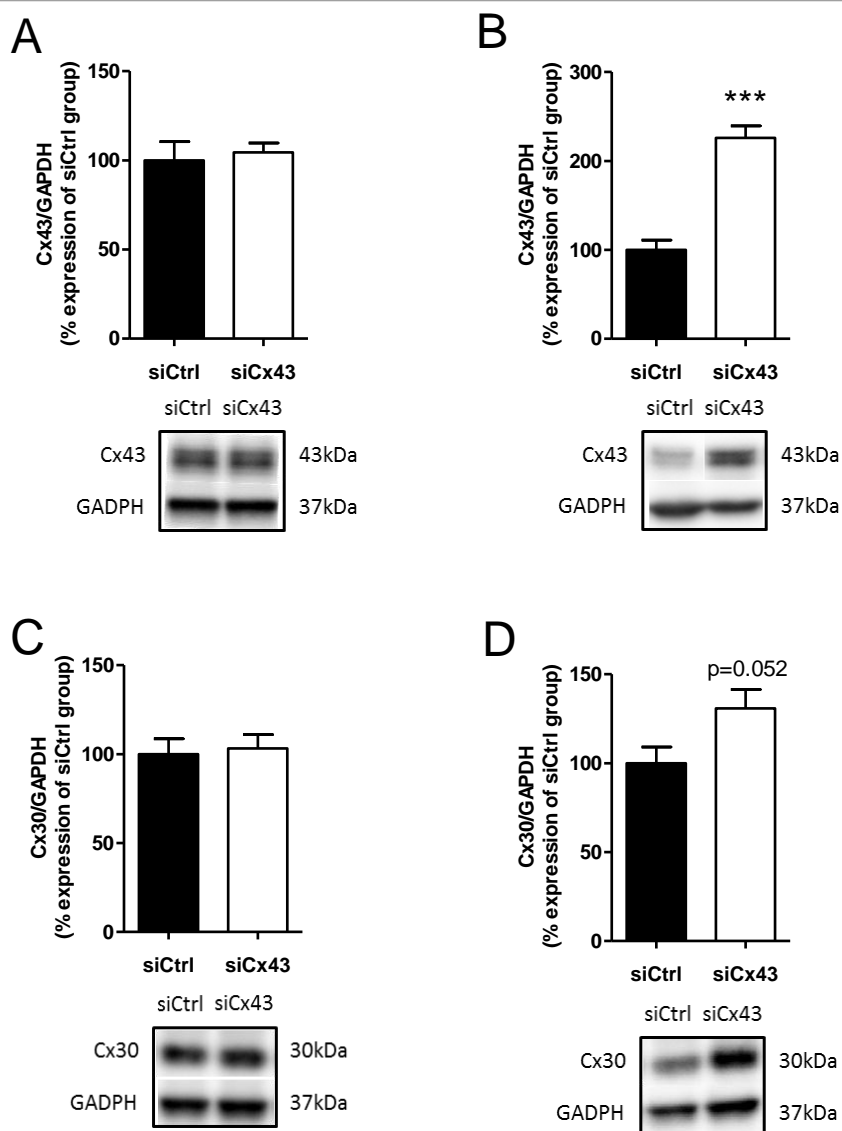


Figure 46 : Expression des connexines astrocytaires chez des animaux siRNA après un jeûne de 20h et une réalimentation de 4h.

Quantification densitométrique et exemples représentatifs des Western Blots de la Cx43 (A) et de la Cx30 (C) 72h après l'injection des siRNA et ayant subi un jeûne de 20h (n=6 dans chaque groupe). Expression de la Cx43 (B) et de la Cx30 (D), 72h après l'injection des siRNA, suite à une réalimentation de 4h après un jeûne de 20h (n=5 dans chaque groupe). Les valeurs représentent les moyennes en %/moyenne des rats siCtrl en % ± les sem de ce même rapport. L'analyse statistique a été faite avec un test de Student.

III. Discussion

La détection hypothalamique du glucose est un mécanisme qui participe au maintien de l'homéostasie glucidique, et plus généralement à l'équilibre énergétique global de l'organisme. Les neurones GS ont toujours été considérés comme les acteurs centraux de cette détection et ont fait l'objet d'intenses recherches. Néanmoins, depuis quelques années, les astrocytes se sont également révélés être indispensables pour la détection de l'hyperglycémie et la mise en place des réponses périphériques adaptées.

Une première étude réalisée dans notre équipe a montré que les astrocytes du NA hypothalamique sont activés (co-marquage GFAP-cFos) suite à la détection d'une augmentation de la concentration cérébrale en glucose. Lorsque le métabolisme glucidique des astrocytes est perturbé, il n'y a plus d'activation cellulaire et la sécrétion d'insuline normalement présente disparaît (Guillod-Maximin et al., 2004). D'autres travaux appuient ce résultat en montrant, d'une part, que le lactate injecté dans le MBH mime les effets du glucose et, d'autre part, que le transport de glucose dans les astrocytes et sa métabolisation en lactate est une étape obligatoire de la détection hypothalamique du glucose (Lam et al., 2005a; Marty et al., 2005; Bady et al., 2006).

A notre connaissance, le transfert du glucose dans les réseaux astrocytaires entre le sang et les neurones GS n'a jamais été étudié dans le cadre de la détection hypothalamique du glucose. Pourtant, les astrocytes sont des intermédiaires organisés en de véritables réseaux, qui communiquent entre eux par de nombreuses plaques jonctionnelles.

Une étude récente de l'équipe de C. Giaume a montré que dans l'hippocampe, grâce à l'utilisation de glucose fluorescent, l'activité neuronale module le transfert de métabolites énergétiques au sein des réseaux astrocytaires (Rouach et al., 2008). La perfusion de glucose ou de lactate dans un seul astrocyte permet le maintien de cette activité en dépit de l'absence de glucose dans le milieu. De plus, cet effet est inhibé et/ou absent chez les souris KO pour la Cx43 et/ou la Cx30, ce qui montre l'importance capitale de la GJC pour le transfert de métabolites énergétiques jusqu'aux neurones. Ici, le transfert du glucose à travers les GJ est conditionné par l'activation neuronale, ce qui n'est, a priori, pas le cas lors de la détection du glucose, où l'activation neuronale se produit secondairement, en réponse aux variations de concentration en glucose.

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'implication des connexines astrocytaires, unités protéiques de base des GJ, dans la détection hypothalamique du glucose chez le rat, *in vivo*.

Dans un premier temps, la caractérisation de la distribution des Cxs astrocytaires dans l'hypothalamus a permis de montrer que la Cx43 est très exprimée dans le MBH comparativement à d'autres régions cérébrales. La Cx30 est répartie de manière plus homogène au sein des structures étudiées (cortex, hippocampe, thalamus, cervelet, tronc

cérébral), comme précédemment reporté (Nagy et al., 1999). Nous avons pu mettre en évidence que la Cx43 était très abondante autour des capillaires du MBH, délimitant avec précision les sections ou contours des vaisseaux sanguins. La richesse des Cxs dans les pieds astrocytaires avait déjà été rapportée au niveau du cortex et de l'hippocampe (Simard et al., 2003; Rouach et al., 2008). Dans le MBH, les vaisseaux sanguins sont fenêtrés, ce qui laisse supposer que les pieds astrocytaires sont en « contact plus direct » avec les variations de glycémie, mais ceci reste à déterminer. L'expression de la Cx30 présente certaines caractéristiques également, comme une absence totale de marquage de la bordure du 3V (où sont normalement retrouvés les tanocytes) et une relative abondance dans le NA. La Cx30 entre dans la formation de GJ entre les prolongements astrocytaires du NA, permettant ainsi la dissémination du glucose au sein des réseaux astrocytaires qui se trouvent à proximité des populations de neurones GS du NA.

Par ailleurs, l'expression des Cxs et la GJC sont modulées par un grand nombre de facteurs, tels que des neurotransmetteurs, des facteurs de croissance, des peptides, des cytokines (Rouach et al., 2002a). Ici, nous avons déterminé l'expression protéique des Cxs lors de différents statuts métaboliques : rats nourris après la phase nocturne, rats à jeun pendant 20h (en hypoglycémie et hypoinsulinémie) et rats nourris pendant 4h après les 20h de jeûne (en légère hyperglycémie et hyperinsulinémie postprandiales). Les variations très rapides d'expression protéique s'expliquent par la demi-vie très courte des Cxs (Solan and Lampe, 2009). L'augmentation de l'expression de la Cx43 est présente dans le MBH suite à des situations d'excès énergétiques, telles qu'après un repas (réalimentation de 4h qui suit un jeûne de 20h) ou une hyperglycémie de 3h. En revanche, cette surexpression ne perdure pas après 48h d'hyperglycémie, situation qui devient délétère comme en attestent les perturbations de la détection hypothalamique du glucose (*cf.* article [Partie I](#)). Dans le MBH, la Cx30 est surexprimée après un jeûne de 20h et la réalimentation qui s'en suit, mais ne varie pas lors de l'hyperglycémie (3h ou 48h).

Les Cxs astrocytaires sont donc modulées de manière différente en conditions de jeûne et d'hyperglycémie de courte durée. La présence de glucose semble déterminer à très court-terme l'augmentation de la Cx43 dans le MBH, comme le montre les variations d'expression des Cxs *in vitro*, suite à différentes concentrations en glucose. De manière générale, le diabète (caractérisée par une hyperglycémie) est associé à une diminution de la GJC dans plusieurs types cellulaires (Inoguchi et al., 2001; Takenaka et al., 2011; Carvalho et al., 2012). Une réduction de la GJC astrocytaire est observée dans des cultures d'astrocytes réalisées avec 25mM de glucose, mais aussi dans des tranches de cerveaux de rats traités à la streptozotocine (STZ, modèle de diabète de type I) (Gandhi et al., 2010; Ball et al., 2011). Cette chute de la communication intercellulaire s'accompagne d'une diminution de l'expression des Cx43 et 30. Dans notre modèle, l'hyperglycémie a été réalisée au maximum

sur 2 jours, contrairement aux 20 à 24 semaines d'hyperglycémie des rats STZ, ce qui pourrait expliquer l'absence de variations d'expression des Cxs que nous observons.

Dans nos conditions *in vivo*, il est difficile de déterminer si la modification de l'expression des Cxs est due à une action directe sur les astrocytes ou suite à une régulation indirecte par l'activité des neurones du MBH. En effet, il a déjà été rapporté que les neurones pouvaient moduler l'expression des Cxs (Koulakoff et al., 2008). La Cx43, présente dans les pieds astrocytaires du MBH, est proche de la circulation sanguine, où des variations de glycémie peuvent se produire. Le modèle de rat HG-48h, qui présente des défauts de la détection hypothalamique du glucose et du lactate ne montre pas de différences d'expression des Cx43 et 30. Ceci suggère une régulation en réponse à l'hyperglycémie, sans doute pour limiter la gluco-toxicité. Néanmoins, une absence de variation d'expression des Cxs n'exclut pas d'autres altérations fonctionnelles astrocytaires et neuronales : il faudra notamment tester la GJC astrocytaire *ex vivo* sur des tranches d'hypothalamus après 48h d'hyperglycémie et d'hyperinsulinémie. De plus, dans ces conditions, des défauts de libération de neurotransmetteurs peuvent survenir et conduisent à la modification de l'expression des Cxs à plus long terme, comme c'est le cas dans un modèle de diabète de type I (Gandhi et al., 2010; Ball et al., 2011). Toutefois, il reste difficile de dissocier les effets de ces variations sur le *fueling* (apport d'énergie aux neurones en conditions de déficit, à relier avec l'augmentation de la Cx30 pendant le jeûne) et sur le *sensing* (modulation des variations de glucose à proximité des neurones GS).

Des études *in vitro* sur des cultures primaires d'astrocytes hypothalamiques pourraient permettre de discriminer les différents facteurs mis en jeu dans des conditions de jeûne (hypoglycémie, hypoinsulinémie, corps cétoniques, ghréline, ou encore les effets de neurotransmetteurs libérés lors du jeûne au niveau du MBH comme le NPY ou l'AgRP par exemple) et qui participent à la modification de l'expression différentielle des Cxs astrocytaires.

Afin de déterminer si les Cxs astrocytaires sont nécessaires à la détection hypothalamique du glucose, nous avons choisi de bloquer l'expression de la Cx43 (majoritaire), par interférence ARN. L'injection de siRNA dirigés spécifiquement contre la Cx43 a été réalisée dans le MBH. Cette zone hypothalamique regroupe les noyaux (NA, VMH) identifiés comme étant un des premiers sites à percevoir les variations de glycémie et contient une forte concentration de neurones GS (Ciofi et al., 2009; Blouet and Schwartz, 2010). Cette stratégie nous a permis de réduire l'expression protéique de la Cx43 d'environ -30% trois jours après l'injection, temps auquel les rats contrôles avaient récupéré de la chirurgie nécessaire à l'injection. A ce temps, aucune compensation dans l'expression des autres transporteurs de métabolites n'a été mise en place (MCTs ou GLUTs). La modification de l'expression d'une Cx entraîne souvent des mécanismes de compensation des autres Cxs

exprimées dans un type cellulaire donné. De manière surprenante, la diminution de l'expression de la Cx43 s'accompagne à 72h d'une diminution de celle de la Cx30 (environ -30%). Il n'existe cependant aucune homologie de séquence de nos siRNA avec la séquence de la Cx30 qui permettent d'expliquer ce résultat. Toutefois, cette chute combinée de l'expression des Cxs astrocytaires a déjà été décrite dans un modèle de souris KO pour la Cx30 : la perte de la Cx30 s'accompagne de la perte de la Cx26, notamment au niveau hypothalamique (Lynn et al., 2011).

Le glucose et le lactate apporté par les astrocytes sont avant tout des substrats énergétiques pour les neurones. En condition basale, le niveau abaissé de l'expression des Cxs astrocytaires (-30%) ne semble pas perturber les fonctions neuronales de l'hypothalamus en raison de l'absence d'un phénotype marqué, au moins à 72h. Néanmoins, même en absence de variation de la glycémie et de l'insulinémie, la PA est diminuée à 72h. Ceci suggère que les animaux siCx43 présentent une diminution des dépenses énergétiques, car le poids n'est pas statistiquement différent de celui des rats siCtrl. Des études supplémentaires, avec une invalidation de plus long-terme, sera nécessaire pour explorer ces points.

Les études qui montrent la participation des astrocytes dans la fourniture énergétique des neurones sont souvent réalisées dans des conditions « stimulées », c'est-à-dire suite à une activation neuronale. Afin d'étudier l'importance des Cxs astrocytaires sur la détection hypothalamique du glucose, nous avons injecté du glucose par la carotide, ce qui nous assure que le transport du glucose du sang vers les neurones était respecté (« route » physiologique). La diminution des Cxs astrocytaires empêche la sécrétion d'insuline normalement présente. Nous montrons dans cette étude, de façon intégrée, qu'une perturbation des Cxs astrocytaires dans l'hypothalamus conduit à la mise en place de désordres retrouvés lors de pathologies métaboliques, telles que le diabète de type II (modification de la sécrétion d'insuline). Cette expérience montre l'implication des réseaux astrocytaires dans la détection hypothalamique du glucose. Cependant, ce résultat ne nous permet pas de conclure sur le rôle exact des réseaux astrocytaires dans la détection du glucose : sont-ils importants pour transmettre les variations de concentration en glucose ? Ou bien participent-ils à l'apport énergétique nécessaire au maintien de l'activité des neurones GS ?

Afin de démontrer la stimulation directe des neurones GE par le transfert de glucose au sein du réseau astrocytaire, des études électrophysiologiques sur tranches de cerveau seront nécessaires (en cours de mise au point au laboratoire). Par la technique du double patch clamp, il sera possible d'enregistrer l'activité d'un neurone GE, alors qu'une solution en glucose fluorescent 10 mM (stimulation) vs 2,5 mM (témoin), sera perfusée dans un astrocyte à proximité (et 2,5mM glucose dans le bain (concentration basale, suffisante à la fourniture énergétique)).

La cellule β -pancréatique est souvent prise comme modèle pour la détection du glucose. Beaucoup de mécanismes sont similaires entre son fonctionnement et le neurone GE. De manière intéressante, dans le pancréas endocrine, la communication intercellulaire par les GJ (formées de Cx36) entre cellules β est indispensable à la sécrétion pulsatile d'insuline induite par le glucose (Head et al., 2012). Ce paramètre est d'ailleurs un des premiers à être altéré dans le diabète. Dans ce cas, il est tentant de faire l'analogie entre les mécanismes retrouvés dans la cellule β et le « couple » réseaux d'astrocytes-neurones GE. Les Cxs astrocytaires, en disséminant rapidement le glucose et/ou le lactate au sein du réseau, pourraient permettre d'atteindre rapidement l'ensemble des neurones GS de l'hypothalamus et générer ainsi des réponses rapides.

Les résultats, encore préliminaires, tendent à indiquer que chez les rats siCx43, l'effet satiétogène du glucose est diminué. Ces expériences nécessitent d'être réalisées sur un plus grand nombre d'animaux pour confirmer ce résultat et de procéder à quelques contrôles. 72h après l'injection, l'effet des siRNA est en train de s'estomper car l'inhibition diminue chez les rats siCx43. Lorsqu'ils sont mis à jeûner pendant 20h (le jeûne se termine exactement à 72h d'inhibition), les niveaux d'expression de la Cx43 sont similaires entre les rats siCtrl et siCx43. Or nous avons vu que le jeûne provoque chez des animaux normaux une chute de l'expression de la Cx43, qui n'est manifestement plus présente chez les animaux siCx43. La diminution d'expression de la Cx43 induite par les siCx43 est peut-être toujours présente, mais elle n'est pas davantage accentuée par le jeûne. Dans le groupe de rats siCx43, la réalimentation semble même accélérer la néo-synthèse de Cx43 (tendance pour la Cx30, $p=0.052$), car l'expression protéique de Cx43 des rats siCx43 est deux fois supérieure à celle des rats siCtrl. Cela suggère que le jeûne suivi d'une réalimentation a provoqué, chez les rats siCx43, un « mécanisme de défense » contre un seuil trop bas de Cx43, d'où peut-être, l'observation d'une néo-synthèse plus élevée chez ces animaux. Néanmoins, le comportement de ces rats (tendance à l'hyperphagie après le bolus de glucose) ne laisse rien paraître de ce phénotype. Cependant, la mesure de la quantité globale des protéines ne présage pas de leur localisation subcellulaire et de leur fonctionnalité. Il sera donc intéressant de contrôler cette dernière, en testant la communication par les GJ des réseaux astrocytaires, sur des tranches d'hypothalamus *ex vivo*.

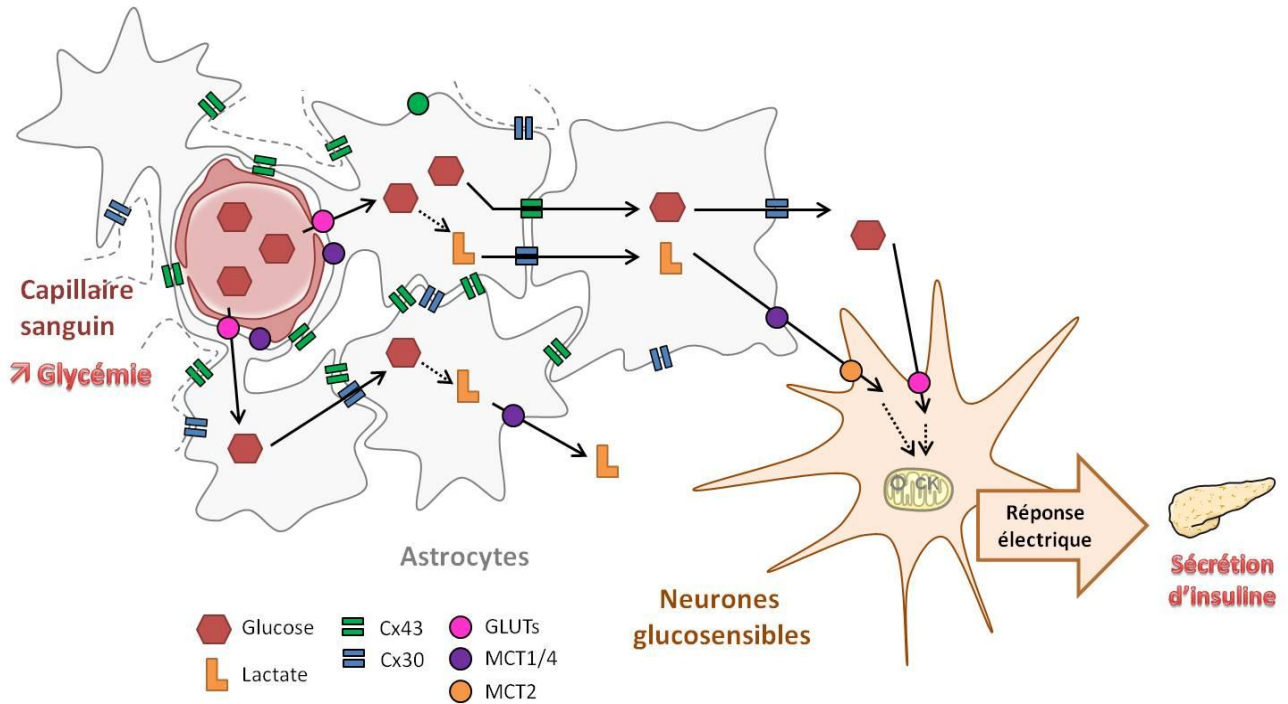


Figure 47 : Schéma de conclusion

L'ensemble de ce travail nous a permis de montrer que les connexines 43 et 30, à la base des réseaux astrocytaires formés de GJ sont indispensables à la détection hypothalamique du glucose. Les astrocytes, en approvisionnant les neurones GS en glucose et lactate par les Cxs, permettent notamment le déclenchement d'une sécrétion d'insuline par le pancréas.

Discussion générale et perspectives

Au niveau de l'hypothalamus, le *fueling* (approvisionnement énergétique) est intimement lié au *sensing* (détection des nutriments). Ces deux facettes de la régulation du métabolisme font intervenir les astrocytes. L'objectif de ce travail était d'étudier leur participation, par le couplage métabolique et la formation de réseaux, dans la détection hypothalamique du glucose.

Notre étude a porté sur deux axes :

- Le couplage astrocyte-neurone : Nous avons montré que le lactate était détecté au niveau central et induisait, comme le glucose, une sécrétion d'insuline rapide et transitoire. Dans un modèle animal d'hyperglycémie et d'hyperlactatémie de 48h, la détection (*sensing*) du glucose et du lactate est modifiée. Nous n'avons pas pu relier cette observation à une altération de l'expression protéique des MCTs.
- Les réseaux astrocytaires : Les Cxs 43 et 30 qui forment principalement les GJ, sont très exprimées dans l'hypothalamus, en particulier dans le MBH. Leur expression semble dépendre du statut métabolique de l'animal. L'inhibition de leur expression dans le MBH bloque les réponses normalement observées suite à un bolus de glucose.

Dans le premier axe de ce travail, l'origine du lactate qui module la détection hypothalamique du glucose est sanguine. En condition normale, le cerveau utilise principalement le glucose issu de la circulation sanguine. De nombreux travaux ont montré que les astrocytes métabolisent ce glucose en lactate, qui est à son tour principalement utilisé par les neurones. En revanche, lors du diabète, la glycémie et la lactatémie sont très fortement augmentées (Reaven et al., 1988). Les gradients de concentrations de ces métabolites sont alors modifiés : la concentration cérébrale en glucose va avoir tendance à augmenter, et la forte concentration en lactate sanguin pourrait perturber la production lactique normalement présente au sein des astrocytes (Figure 24, p. 63). Ceci pourrait conduire à un déséquilibre redox qui altérerait la fonction astrocytaire, et en conséquence le fonctionnement neuronal (Figure 48).

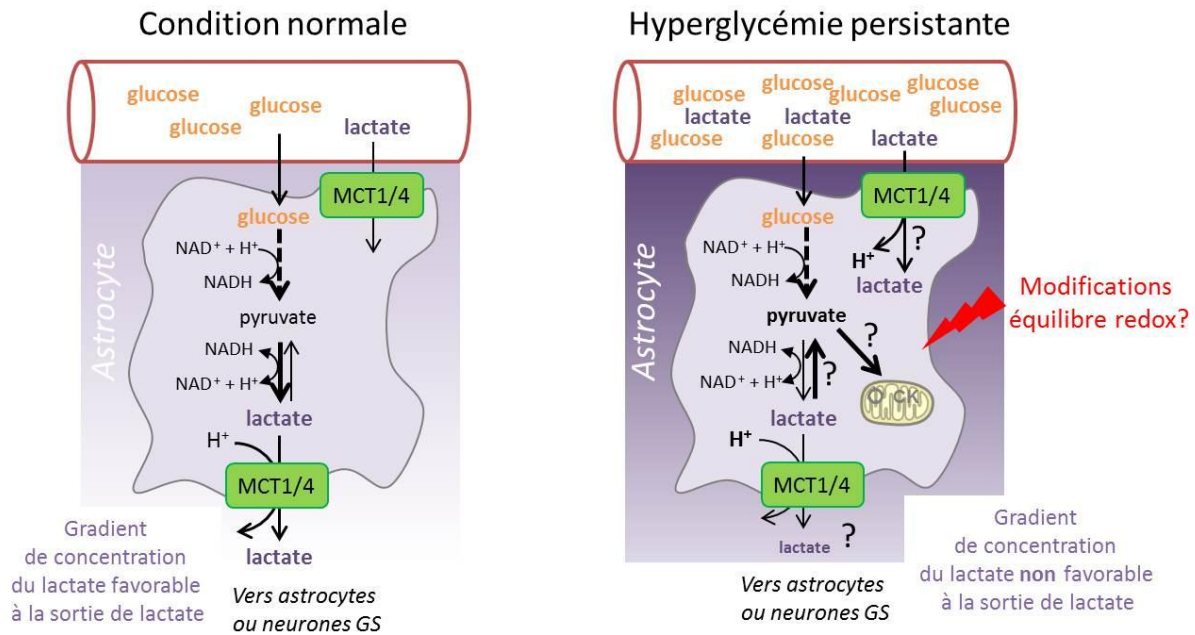


Figure 48 : Hypothèses sur l'effet de l'hyperglycémie sur le métabolisme astrocytaire

En condition normale. Le glucose est transporté du sang dans l'astrocyte, où il est métabolisé en pyruvate par la glycolyse. Afin de maintenir le pool d'équivalents réduits, le pyruvate est transformé en lactate. Le lactate est exporté hors de l'astrocyte par les MCTs 1 et 4, co-transporté avec un proton. La lactatémie sanguine étant faible, le lactate est peu transporté dans l'astrocyte.

En condition pathologique d'hyperglycémie persistante. L'hyperlactatémie sanguine, qui accompagne l'hyperglycémie, peut conduire au passage plus important de lactate dans l'astrocyte. Cet apport massif de lactate et de protons entraînerait plusieurs dérégulations telles que : l'acidification du milieu intracellulaire et un déséquilibre redox. Le lactate excédentaire pourrait être transformé en pyruvate (pour limiter l'acidification en utilisant les ions H^+), qui serait à son tour métabolisé dans la mitochondrie. Ceci permettrait l'oxydation du $NADH$. L'export de lactate dans le milieu extracellulaire serait alors réduit.

Une des caractéristiques des astrocytes est leur très forte expression de Cxs. Ces protéines permettent la formation de GJ (2 connexons apposés) ou d'hémi-canaux (1 seul connexon). Les hémi-canaux transportent des molécules directement du cytoplasme vers le milieu extracellulaire (Saez et al., 2005), parmi lesquels on trouve des molécules de signalisation (ATP, glutamate par exemple). Il sera intéressant de déterminer si la modulation de l'export par ces hémi-canaux de signaux tels que le glucose, le lactate ou l'ATP est possible dans le cadre de la détection du glucose.

Les tanocytes présentent également des hémi-canaux de Cx43 (bien visible sur les immunohistochimies, Figure 36, p. 94). Ces cellules ont été nouvellement décrites comme participant à la détection du glucose *in vitro* (Frayling et al., 2011). Les tanocytes pourraient moduler la fonction des astrocytes, par une signalisation purinergique. L'ATP est notamment connu pour déclencher une glycogénolyse dans les astrocytes (Sorg et al., 1995)

et le lactate (libéré à partir de la glycogénolyse) pourrait être un signal pour les neurones GS.

Outre l'ATP, les mEAOs sont aussi de bons candidats pour moduler l'ANLS et le couplage astrocytaire par la GJC dans le cadre du *sensing*. Notre équipe a déjà montré que la signalisation mEAOs était indispensable pour la détection hypothalamique du glucose.

Or, les Cxs sont redox-sensibles : l' H_2O_2 induit une augmentation du couplage astrocytaire (Rouach et al., 2004). Cet effet est relayé par la capacité des mEAOs à oxyder les groupements cystéine présents sur les boucles extracellulaires des Cxs, ce qui favorise la formation de ponts disulfures et *in fine*, des GJ (Sosinsky and Nicholson, 2005). On peut imaginer que lors d'une hyperglycémie, la production de mEAOs suite à la métabolisation du glucose par la mitochondrie induit une augmentation de l'apport en substrats énergétiques (glucose, lactate) par l'induction du couplage astrocytaire par les GJ. Cette régulation est rapide et la formation des mEAOs est rapidement interrompue par un système de défenses anti-oxydantes dans des conditions normales. Les mEAOs sont des molécules signalisatrices qui, avec le glucose, induisent notamment la stabilisation du facteur HIF (*Hypoxia Inducible Factor*). HIF a récemment été impliqué dans la sensibilité au glucose des neurones POMC (Zhang et al., 2011). Lorsque HIF est absent des neurones POMC, alors les animaux développent une obésité sévère. Il est à noter que le facteur HIF induit aussi une augmentation de l'expression des MCTs astrocytaires *in vitro* (Brix et al., 2012), ce qui pourrait éventuellement faire le lien entre la capture de lactate et la sensibilité au glucose des neurones POMC.

Dans des conditions pathologiques, l'excès de mEAOs peut devenir délétère et conduire à des perturbations du *sensing*. Ainsi, le rat Zucker, un modèle de rat obèse insulino-résistant, présente une hypersensibilité cérébrale au glucose. Elle est due à altération de l'équilibre redox (dont une diminution des défenses anti-oxydantes) qui résulte en une production de mEAOs en réponse à des taux de glucose bas, normalement sans effet sur la sécrétion d'insuline (Colombani et al., 2009).

Les astrocytes sont connus pour libérer du glutathion réduit (GSH), une molécule anti-oxydante, par des hémi-canaux formés de Cxs (Dringen et al., 1999; Rana and Dringen, 2007) et participent ainsi au maintien de l'équilibre redox des neurones. La surexposition aux mEAOs pourrait désensibiliser les astrocytes ou même être toxique, et conduire à une perturbation de la GJC. Il a été montré que dans le colliculus inférieur, un stress oxydant important, dû à l'hyperglycémie persistante, précède la diminution de la GJC astrocytaire dans le diabète (Gandhi et al., 2010; Ball et al., 2011). D'autre part, lorsque la production d' H_2O_2 est trop importante, la production de lactate par les astrocytes *in vitro* est diminuée (Liddell et al., 2009). La diminution de la production de lactate, associée à une réduction de la GJC, pourrait altérer l'activité des neurones GS en touchant simultanément le *sensing* (absence de signal excitateur GE/inhibiteur GI) ainsi que le *fueling* (diminution de l'activité

globale des neurones, par manque de substrats énergétiques). Ces données invitent à étudier plus en détails la physiologie astrocytaire dans les maladies métaboliques.

Dans divers modèles animaux où la détection hypothalamique du glucose est altérée, des modifications d'expression des acteurs du couplage métabolique entre astrocytes et neurones sont présentes. Une étude récente a montré que l'expression de GLUT1 astrocytaire est anormalement basse dans un modèle animal de diabète (Chari et al., 2011). Lorsque son expression est normalisée, alors la production hépatique de glucose et la glycémie des animaux redeviennent normales (Chari et al., 2011). Dans des modèles de diabète induit par l'injection de streptozotocine (STZ, mimant un diabète de type I) ou d'obésité génétique ou causée par un régime gras (diabète de type II), l'expression des MCTs est modifiée dans le cerveau (Pierre et al., 2007; Canis et al., 2009). Le transfert de lactate des astrocytes aux neurones est modifié dans ces conditions, et pourrait alors participer aux perturbations de la détection du glucose connue dans ces modèles. De plus, la morphologie des astrocytes se modifie dans des conditions de régimes gras ou de surnutrition (Horvath et al., 2010; García-Cáceres et al., 2011).

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que le lactate sanguin est détecté au niveau central et que cette détection, ainsi que celle du glucose, est modifiée après 48h d'hyperglycémie, *in vivo*. Néanmoins, l'expression protéique des MCTs et des Cxs ne varie pas dans ce modèle.

En raison des interrelations très importantes entre astrocytes et neurones, si la physiologie neuronale est modifiée, il est probable qu'une modification de l'activité astrocytaire y soit associée. Nous montrons que la présence des Cxs astrocytaires, formant les GJ, est indispensable à la détection hypothalamique du glucose. Ces résultats appuient la mise en place de recherches plus approfondies sur le rôle des astrocytes dans la mise en place de pathologies.

Présentations

Ce travail de thèse a donné lieu à plusieurs communications orales et affichées en congrès régionaux, nationaux et internationaux.

Communications orales :

- Forum des Jeunes Chercheurs • Besançon • septembre 2012

Communication Orale : « Implication du réseau astrocytaire dans la détection hypothalamique du glucose : rôle des connexines »

- Congrès Annuel de la Société Francophone du Diabète (SFD) • Nice • mars 2012

Communication Orale (Session Métabolisme) : « Implication de la Cx43 dans la détection hypothalamique du glucose »

- Congrès Annuel de la Société Francophone du Diabète (SFD) • Genève (Suisse) • mars 2011

Communication Orale (Session Régulation Centrale du Métabolisme) : « Implication de la Cx43 dans la détection hypothalamique du glucose »

Communications affichées :

- Congrès Annuel de la Société Américaine des Neurosciences (SfN) • Nouvelle-Orléans (Etats-Unis) • octobre 2012

Communication Affichée (Session Inflammation and Glia in Intake and Metabolism) : “Involvement of the astroglial networks in the hypothalamic glucose-sensing: Role of Connexin 43”

- Congrès Annuel Physiologie, Pharmacologie et Thérapeutique (P2T) • Dijon • avril 2012

Communication Affichée (Session Neurophysiologie) : “Involvement of Cx43 in the hypothalamic glucose-sensing”

- Forum des Jeunes Chercheurs • Dijon • juin 2011

Communication Affichée : « Implication du réseau astrocytaire dans la détection hypothalamique du glucose : rôle des connexines »

Participation à des travaux de recherche

Au cours de ma thèse, j'ai également participé à une autre étude sur la détection hypothalamique du glucose, réalisée principalement par Lionel Carneiro. Elle visait à comprendre le rôle de la dynamique mitochondriale dans la signalisation mEAOs, induite par l'hyperglycémie.

Dans ce travail, j'ai mis au point et réalisé les immunohistochimies anti-OXPHOS qui ont permis de visualiser le réseau mitochondrial. Ce travail a donné lieu à un article, publié dans *Antioxydant and Redox Signaling*, en 2012.

Importance of Mitochondrial Dynamin-Related Protein 1 in Hypothalamic Glucose Sensitivity in Rats

Lionel Carneiro,¹ Camille Allard,¹ Christophe Guissard,² Xavier Fioramonti,¹
 Cécile Tourrel-Cuzin,³ Danielle Bailbé,³ Corinne Barreau,² Géraldine Offer,² Emmanuelle Nédelec,¹
 Bénédicte Salin,⁴ Michel Rigoulet,⁴ Pascale Belenguer,² Luc Pénicaud,¹ and Corinne Leloup¹

Abstract

Aims: Hypothalamic mitochondrial reactive oxygen species (mROS)-mediated signaling has been recently shown to be involved in the regulation of energy homeostasis. However, the upstream signals that control this mechanism have not yet been determined. Here, we hypothesize that glucose-induced mitochondrial fission plays a significant role in mROS-dependent hypothalamic glucose sensing. **Results:** Glucose-triggered translocation of the fission protein dynamin-related protein 1 (DRP1) to mitochondria was first investigated *in vivo* in hypothalamus. Thus, we show that intracarotid glucose injection induces the recruitment of DRP1 to VMH mitochondria *in vivo*. Then, expression was transiently knocked down by intra-ventromedial hypothalamus (VMH) DRP1 siRNA (siDRP1) injection. 72 h post siRNA injection, brain intracarotid glucose induced insulin secretion, and VMH glucose infusion-induced refeeding decrease were measured, as well as mROS production. The siDRP1 rats decreased mROS and impaired intracarotid glucose injection-induced insulin secretion. In addition, the VMH glucose infusion-induced refeeding decrease was lost in siDRP1 rats. Finally, mitochondrial function was evaluated by oxygen consumption measurements after DRP1 knock down. Although hypothalamic mitochondrial respiration was not modified in the resting state, substrate-driven respiration was impaired in siDRP1 rats and associated with an alteration of the coupling mechanism. **Innovation and Conclusion:** Collectively, our results suggest that glucose-induced DRP1-dependent mitochondrial fission is an upstream regulator for mROS signaling, and consequently, a key mechanism in hypothalamic glucose sensing. Thus, for the first time, we demonstrate the involvement of DRP1 in physiological regulation of brain glucose-induced insulin secretion and food intake inhibition. Such involvement implies DRP1-dependent mROS production. *Antioxid. Redox Signal.* 17, 433–444.

Introduction

THE HYPOTHALAMUS and more particularly the ventromedial hypothalamic area [VMH which includes the arcuate nucleus (ARC) and ventromedial nucleus (VMN)] play a key role in energy homeostasis (8, 30, 31, 35). In addition to the fueling role of glucose, it also monitors physiological functions, such as food intake and insulin secretion, through modulation of glucose-sensitive neuron activity (17, 18). Analogies between mechanisms involved in hypothalamic glucose-responsive neurons and the pancreatic β -cells have been highlighted (17, 20, 23, 38). Recently, several studies have indicated that mitochondrial reactive oxygen species (mROS) are required for the hypothalamic glucose-sensing

Innovation

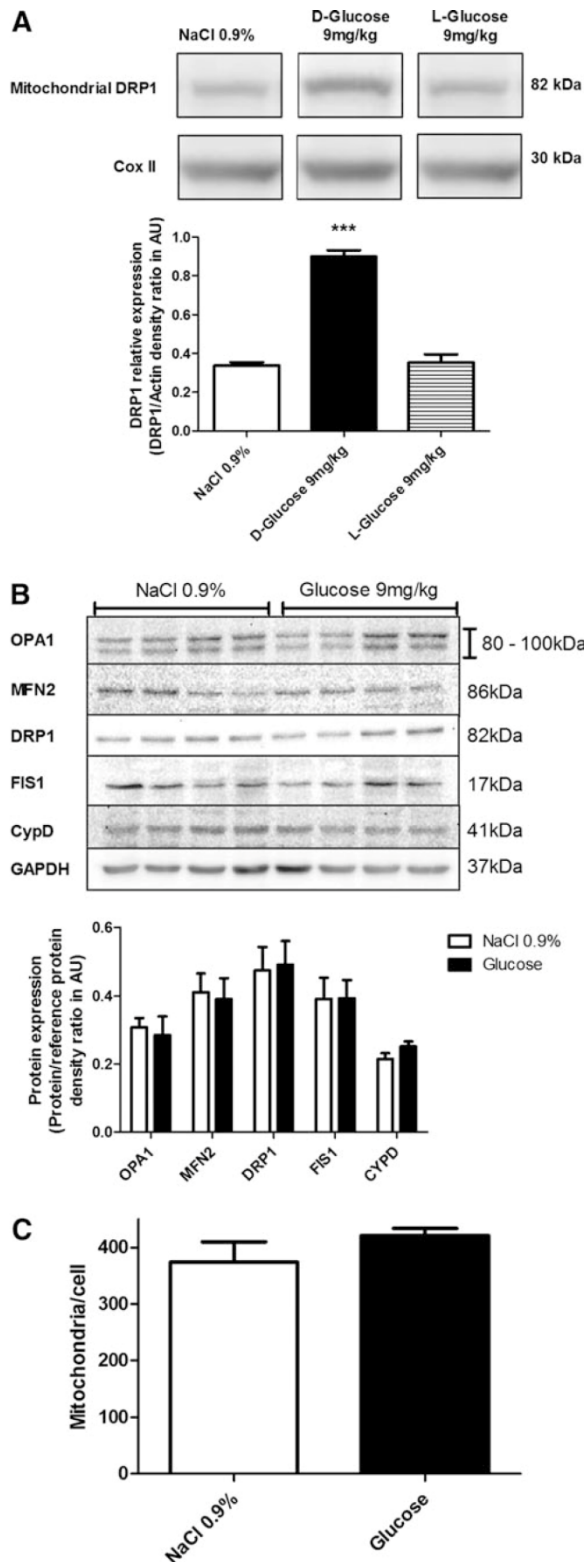
Current research reveals that the mitochondrial DRP1 protein is necessary for ROS signaling in hypothalamic glucose sensing mechanism. Our results suggest that the mitochondrial DRP1 protein may be a subtle upstream actor in glucose-induced mROS signaling in the hypothalamus, thereby promoting the effects of glucose *in vivo*. These results highlight a new mechanism involved in glucose detection which is primordial for both the control of food intake and energy metabolism. Further investigations will be necessary to determine the role of DRP1 in metabolic disorders associated with defective hypothalamic glucose detection.

¹Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation (CSGA), Université de Bourgogne, Dijon, France.

²Université de Toulouse, Laboratoire Métabolisme Plasticité Mitochondries, Toulouse, France.

³Laboratoire de Biologie et Pathologie du Pancréas Endocrine, Unité Biologie Fonctionnelle et Adaptative, Université Paris Diderot, Paris, France.

⁴Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires (IBGC), Université Bordeaux, Bordeaux, France.



mechanism. Increased brain glucose level increases hypothalamic mROS. Also, inhibition of hypothalamic mROS impairs increased brain glucose-induced insulin secretion (11, 21, 22). Interestingly, the mROS regulatory pathway might also be involved in lipid sensing in the same area of the brain (6) and in glucose sensing in pancreatic β -cells (24, 32). Altogether, these studies suggest that mROS are important physiological messengers in metabolite-sensitive cells. Respiratory studies have helped to define a better understanding of how mROS vary upon different metabolic/hormonal states according to metabolic status and why they constitute an integrative signal (1, 6, 11, 21, 22, 24).

Mitochondria are dynamic organelles that continually change form. Different sets of proteins control mitochondria dynamics through fission and fusion mechanisms (10). Fusion mechanisms are under control of optic atrophy 1 (OPA1) and mitofusins (MFNs). The fission machinery involves fission protein 1 (FIS1) and dynamin-related protein 1 (DRP1). DRP1, which is mainly cytoplasmic under basal conditions, translocates to the mitochondrial membrane where it forms a contractile "ring" involved in the division of the mitochondria. Mitochondrial fusion and fission are on a tightly regulated equilibrium to maintain mitochondrial morphology in the cell and are critical for cell function (7).

Mitochondrial morphology is associated with mROS production and energy status. Nutrients and hormones can alter mitochondria morphology (39, 41). For instance, a recent study showed the involvement of mitochondrial dynamics in high glucose-induced ROS production (40). Acute exposure of hepatic and muscular cell lines to high glucose concentrations induced a rapid and transient mitochondrial fission. This mitochondrial fission is associated with an increase in ROS levels. In contrast, inhibiting mitochondrial fission was shown to abolish high glucose-induced ROS levels. Thus, morphological changes of mitochondria appeared to be an upstream causal factor for ROS production under acute hyperglycemic stimulation. This suggests that mitochondrial dynamics act as a regulating factor of mitochondrial activity.

The aim of this study was to determine whether mitochondrial dynamics protein DRP1, involved in fission mechanisms, could constitute an upstream actor in VMH mROS production, and consequently play a role in VMH glucose sensing. We hypothesized that a DRP1 mitochondrial translocation occurs in VMH in response to a transient cerebral

FIG. 1. Transient cerebral hyperglycemia induces the translocation of DRP1 to mitochondria in the VMH. (A) Western blot analysis of DRP1 expression on mitochondrial membranes after an intracarotid injection of 0.9% NaCl (Control group, $n=8$), 9 mg/kg D-glucose (Stimulated group, $n=8$) or 9 mg/kg L-glucose (Osmotic control group, $n=5$). Representative immunoblots for mitochondrial DRP1 and CoxII (control for lane quantity) are shown. Results are expressed as density ratio of DRP1/CoxII in arbitrary units (AU). One-way ANOVA analysis, followed by Bonferroni post test, $***p<0.001$. **(B)** Western blot analysis of total hypothalamic OPA1 and MFN2 (mitochondrial fusion proteins), DRP1 and FIS1 (mitochondrial fission protein), and CypD (inner mitochondrial matrix protein) after the carotid glucose vs NaCl load. **(C)** Number of mitochondria per cell in VMH after the carotid glucose injection compared to carotid NaCl injection.

hyperglycemia. This process will be necessary for the mROS-induced physiological responses.

Results

Transient cerebral glucose increase triggers the recruitment of VMH DRP1 to mitochondrial membranes

Under basal conditions, most of the cellular DRP1 is located in the cytosol. Fusion is induced when DRP1 is relocalized to the mitochondrial membrane (34). We evaluated VMH DRP1 cellular localization in response to an intracarotid glucose bolus injection (9 mg/kg). Intracarotid glucose injection toward the brain significantly increased DRP1 level (263% of controls) in VMH mitochondria extract 1 minute post-injection. No significant modification of increased mitochondrial DRP1 was detected in the cortex and thalamus (data not shown). In addition, the nonmetabolizable glucose analog L-glucose did not increase mitochondrial DRP1 (Fig. 1A). These data suggest that DRP1 is rapidly relocalized to the mitochondria in response to increased glucose. Total protein levels of fusion proteins (OPA1 and MFN2), fission proteins (DRP1 and FIS1), and mitochondrial inner membrane protein CypD, a mediator of mitochondrial permeability transition pore opening, were unchanged in NaCl- or glucose-injected rats (Fig. 1B). The analysis of mitochondrial morphology did not reveal significant modification in VMH areas of glucose-injected rats compared to NaCl-injected rats (Supplementary Fig. S1B; Supplementary data are available online at www.liebertonline.com/ars). However, the number of mitochondria per cell was not increased after the carotid D-glucose injection [373.9 ± 35.8 mitochondria per cell in NaCl group vs 421.2 ± 12.6 for D-Glucose group (Fig. 1C)]. Transmission electron microscopy was used to appreciate the mitochondrial ultrastructure (Fig. 2). Mitochondria of NaCl- or glucose-injected rats exhibited a similar ultrastructure (Fig. 2A) and the number of mitochondria per μm^2 of VMH was unchanged (Fig. 2B).

DRP1 downregulation inhibits mitochondrial fission in vivo

Downregulation of DRP1 by RNA interference was used to investigate its role in hypothalamic glucose sensing. Therefore, siRNAs directed against DRP1 or siRNA controls were injected into the VMH, and DRP1 levels estimated by Western blot in the ventromedial part of the hypothalamus that includes ARC. DRP1 extinction reached 28.9 ± 5.8%, 35.1 ± 9.9%, 76.6 ± 2.5%, and 40.7 ± 23.3% at 24, 48, 72, and 96 h post-injection, respectively (Fig. 3A). No modification in DRP1 expression was observed in the cortex, thalamus, brainstem, or lateral hypothalamus (LH) 72 h post-injection (Fig. 3B). No modification in other proteins expression involved in mitochondrial dynamics was found, showing that only DRP1 expression was affected (Fig. 3C). Because the greatest decrease in DRP1 levels occurred 72 h post-injection, we chose this time to evaluate the impact of VMH DRP1 siRNA on glucose sensing. The impact of DRP1 siRNA injection on mitochondrial morphology was evaluated by fluorescent microscopy imaging 72 h after siRNA injections. No mitochondrial morphological differences was measured between siDRP1 and siControl animals (Supplementary Fig. S2), only a decreased

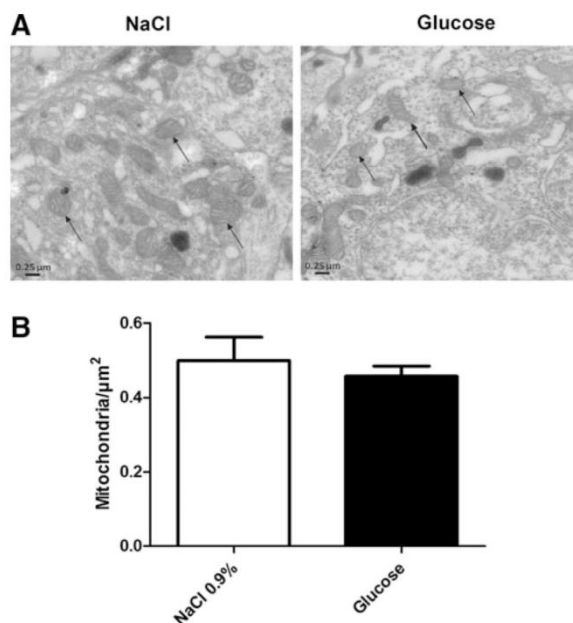


FIG. 2. Transmission electron microscopy on VMH tissue. (A) Pictures of mitochondrial ultrastructure in VMH of NaCl (left) vs. glucose-injected (right) rats, arrows indicate mitochondria. (B) Number of mitochondria per μm^2 in VMH of NaCl and glucose-treated rats (each group $n=4$, count of mitochondria from 100 pictures per rat).

number of mitochondria per cell was observed (376.8 ± 45.6 mitochondria/cell for siControl vs. 229.1 ± 27.7 for siDRP1, $p < 0.05$) (Fig. 3D). 72 h after the siRNA injection, both siDRP1 and siControl rats exhibited a similar food intake and weight gain as before injection (data not shown).

Downregulation of DRP1 in VMH decreases glucose sensitivity due to the loss of mROS signaling and impacts both insulin secretion and the satiating effect of glucose

To decipher the role of DRP1 in VMH glucose sensing, we evaluated the consequences of its downregulation in the detection of an increased glucose concentration through two different tests. The first test involved the hypothalamic pancreatic axis and the parasympathetic control of insulin secretion. The second test allowed the measurement of the satiating effect of glucose on fasted rats with a refeeding test. The role of DRP1 inhibition was first determined in response to intracarotid glucose injection-induced insulin secretion (22). Intracarotid glucose injections had no effect on peripheral blood glucose level in both siControl and siDRP1 groups (Fig. 4A). However, intracarotid glucose injection-induced insulin secretion was significantly inhibited in siDRP1-treated rats (for siControls, delta insulin level 103.2 ± 20.4 mU/L; siDRP1 = 37.8 ± 7.2 mU/L) (Fig. 4B). In addition, impaired insulin secretion was accompanied with a complete inhibition of mROS production induced by a glucose load (siControl + NaCl: 17033 ± 3540 AU; siControl + Glucose: 37797 ± 6211 AU; siDRP1 + NaCl: 13139 ± 1469 AU; siDRP1 + Glucose: 18156 ± 1974 AU) (Fig. 4C). No difference was found in other brain

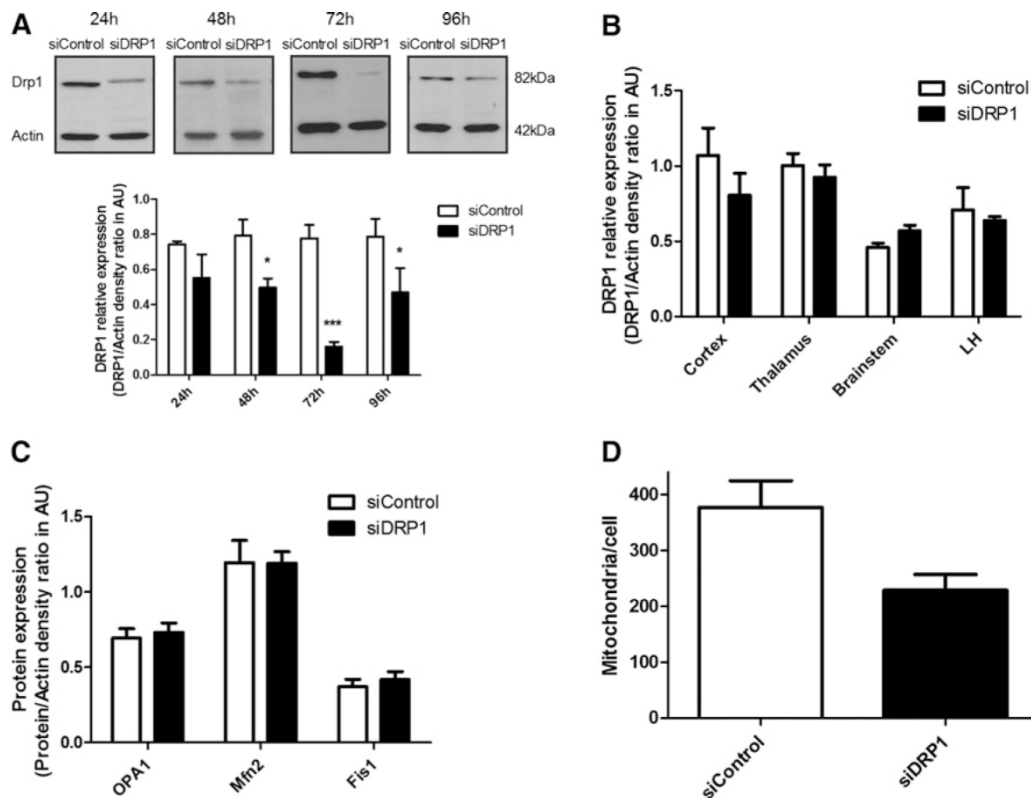
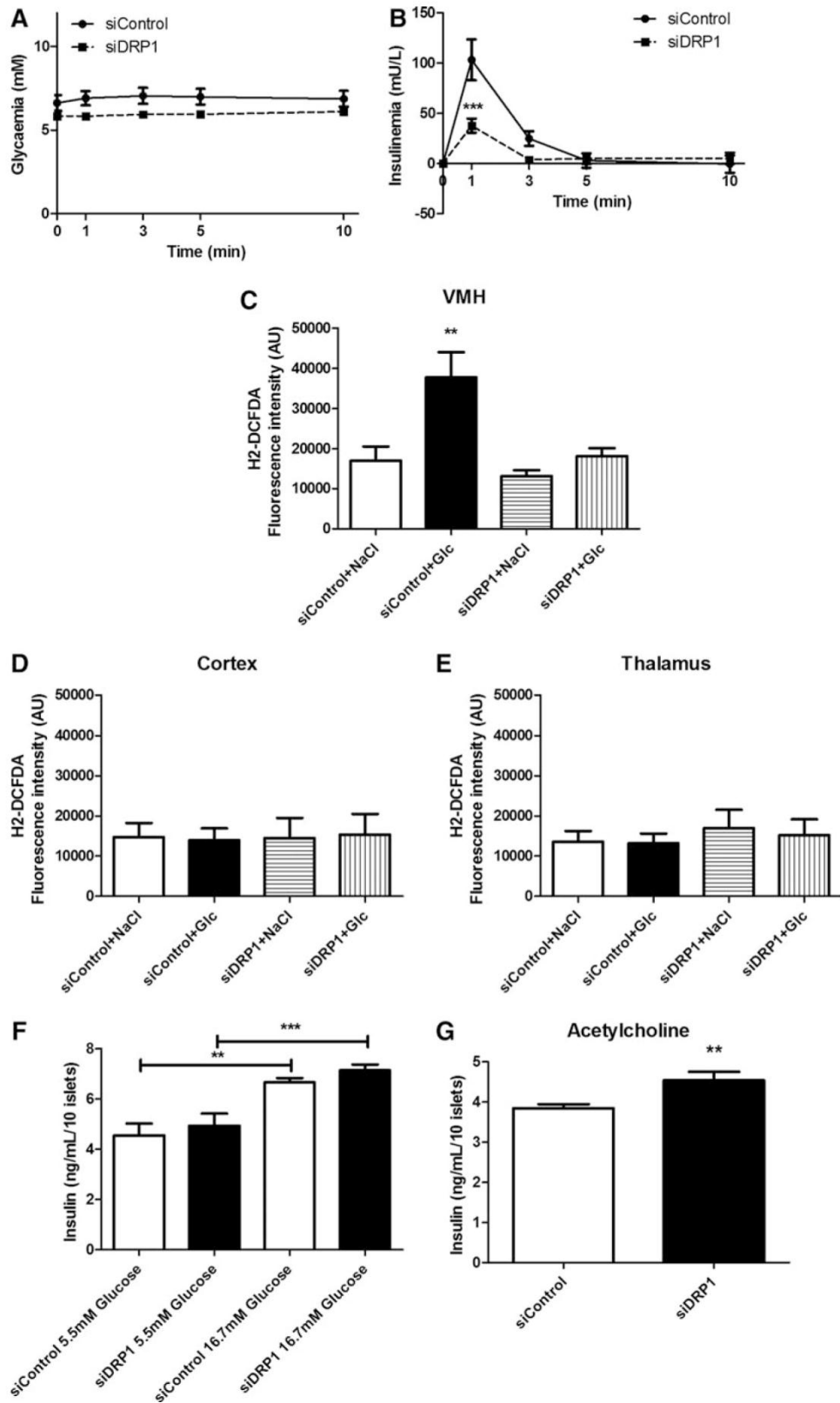


FIG. 3. SiDRP1 rats show decreased protein levels of DRP1 without affecting the other main actors of mitochondrial dynamics. **(A)** Representative immunoblots for VMH DRP1 and actin protein levels in siDRP1 or siControl rats 24, 48, 72, and 96 h post-injection (*upper panel*). Relative DRP1 expression quantification (*lower panel*) is expressed as the ratio of DRP1 density to actin density. There is a significant decrease in DRP1 protein level in siDRP1 rats 48 h, 72 h, and 96 h post-injection. $N=5$ for all groups; unpaired *t*-test (with Welch's correction for time 24 h), $*p < 0.05$, $***p < 0.001$. **(B)** Relative DRP1 expression quantification in other brain regions 72 h after siRNA injection; $n=5$ for all groups, unpaired *t*-test (with Welch's correction for LH). **(C)** Immunoblot quantification of OPA1 and MFN2 (mitochondrial fusion proteins) and FIS1 (mitochondrial fission protein) 72 h post-injection, $n=5$ for all groups, unpaired *t*-test. Results are expressed as the ratio of protein density to actin density. There is no difference in OPA1, MFN2, or FIS1 expression in siDRP1-treated animals compared to controls. **(D)** Number of mitochondria per cell in VMH after SiControl or SiDRP1 injection.

FIG. 4. Fission inhibition induced by VMH siDRP1 knockdown inhibits hypothalamic glucose sensing, mROS production, and insulin secretion. **(A)** Peripheral blood glucose level after 9 mg/kg intracarotid glucose injection in siDRP1 and siControl rats; $n=7$ per group, two way ANOVA followed by Bonferroni post-test. **(B)** Delta plasma insulin level (values compared to time 0 min before injection) after 9 mg/kg intracarotid glucose injection in siDRP1 and siControl rats. Intracarotid glucose injection-induced insulin secretion is significantly impaired in siDRP1 rats at 1 and 3 min post-injection; $n=7$ per group; two way ANOVA followed by Bonferroni post-test, $***p < 0.001$. **(C–E):** VMH **(C)**, cortex **(D)**, and thalamus **(E)** ROS production in siDRP1 and siControl rats measured 1 min after intracarotid glucose load. Data are represented as H2-DCFDA fluorescence intensity in AU. ROS production is increased in the VMH ($n=5$ for siControl NaCl, $n=4$ siControl glucose; $n=6$ siDRP1 NaCl and $n=4$ siDRP1 glucose, one way ANOVA followed by Bonferroni post-test, $**p < 0.01$) and not affected in the cortex ($n=5$ for siControl NaCl, $n=6$ siControl glucose, $n=6$ siDRP1 NaCl, and $n=6$ siDRP1 glucose, one way ANOVA followed by Bonferroni post-test) or thalamus ($n=6$ for siControl NaCl, $n=6$ siControl glucose, $n=5$ siDRP1 NaCl, and $n=5$ siDRP1 glucose, one way ANOVA followed by Bonferroni post-test). **(F)** Insulin release from siDRP1 and siControl rat islets at 5.5 or 16.7 mM extracellular glucose level. Insulin release is increased in response to 16.7 mM glucose increase in siControl and siDRP1 rats; $n=12$ in each group except for siControl 16.7 mM, $n=11$; one-way ANOVA followed by Bonferroni post-test, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. **(G)** Insulin release from siDRP1 and siControl rat islets treated with acetyl-methylcholine bromide (muscarinic receptor agonist) showed increased insulin secretion compared with siControl group. Data are mean \pm SEM, $n=12$ for siControl and $n=11$ for siDRP1; Unpaired *t* test with Welch's correction, $**p < 0.01$.



regions such as the cortex (Fig. 4D) or thalamus (Fig. 4E). To assume that decreased insulin secretion was not the consequence of impaired pancreatic β -cell function, *ex vivo* glucose-induced insulin secretion was evaluated in islets of siControl and siDRP1-injected animals. Islets of siDRP1-treated rats had a similar basal insulin secretion (in 5.5 mM glucose) to siControl islets, and they did not show any impairment in pancreatic insulin secretion in response to 16.7 mM glucose (siControl: 6.67 ± 0.17 ng/ml/10 islets, siDRP1: 7.15 ± 0.22 ng/ml/10 islets) (Fig. 4F). Because intracarotid glucose injection-induced insulin secretion involves the activation of parasympathetic nerves (2, 13, 16), we evaluated the islets' sensitivity to a cholinergic agonist. Islets were stimulated with a muscarinic cholinergic receptor agonist (acetyl-methylcholine bromide) in 5.5 mM glucose. SiDRP1 animals showed increased insulin secretion in response to the acetyl-methylcholine bromide (siControls: 3.84 ± 0.10 ng/ml/10 islets; siDRP1: 4.54 ± 0.21 ng/ml/10 islets) (Fig. 4G).

We next evaluated the effect of siDRP1 treatment on VMH glucose infusion-induced decrease in food intake after refeeding. First of all, this effect was evaluated in animals without siRNA treatment. In control animals, VMH glucose infusion attenuated increased food intake after refeeding following an overnight fast (NaCl group: 7.22 ± 0.54 g and Glucose group: 4.59 ± 0.42 g at the end of the test) (Fig. 5A). VMH glucose infused-SiDRP1 animals showed a significant reduction in food intake inhibition during 4 h of refeeding compared to SiControl rats, while food ingestion in response to NaCl VMH infusion was similar in both siControl and siDRP1-treated animals (siControl+Glucose: 3.52 ± 0.48 g; siDRP1+Glucose: 6.25 ± 0.56 g; siControl+NaCl: 7.22 ± 0.43 g; siDRP1+NaCl: 5.83 ± 0.44 g) (Fig. 5B). As for intracarotid glucose-induced insulin secretion, we examined if decreased food intake induced by VMH glucose infusion involved impaired VMH ROS production in siDRP1 rats. In siControl animals, VMH glucose infusion increased mROS production threefold the level of NaCl in infused-SiControl group (siControl+NaCl: 1362 ± 117 AU; siControl+Glucose: 3800 ± 864 AU) (Fig. 5C). However, mROS production was not increased in glucose-infused siDRP1-treated rats (siDRP1+NaCl: 1234 ± 204 AU; siDRP1+Glucose: 1291 ± 119 AU) (Fig. 5C). These results suggest that the satiating effect of VMH glucose infusion is dependent on mROS production through mitochondrial DRP1-dependent fission.

VMH mitochondrial respiration of DRP1-inhibited rats exhibits a decreased activity in response to substrates

To explore the VMH mitochondrial function, oxygen consumption was analyzed on permeabilized hypothalamic tissue. Basal respiratory activity was similar between siControl and siDRP1 mitochondria (Fig. 6A). Substrate-driven respiration determined by glutamate stimulation was significantly decreased in siDRP1 rats (siControls: $148.0 \pm 5.9\%$ of basal consumption; siDRP1: $126.3 \pm 2.6\%$) (Fig. 6B). State 3 (substrate/ADP-driven) respiration was assessed with saturating ADP concentration (Fig. 6C). In these conditions, the O_2 flux was decreased in siDRP1 rats (siControls: $283.83 \pm 20.49\%$ of basal O_2 flux; siDRP1: $209.45 \pm 24.22\%$). Carboxyatractyloside (CAtr), an ATP-ADP exchange inhibitor, was then added to obtain the ADP-independent resting state 4. Respiratory inhibition was significantly attenuated in siDRP1 rats

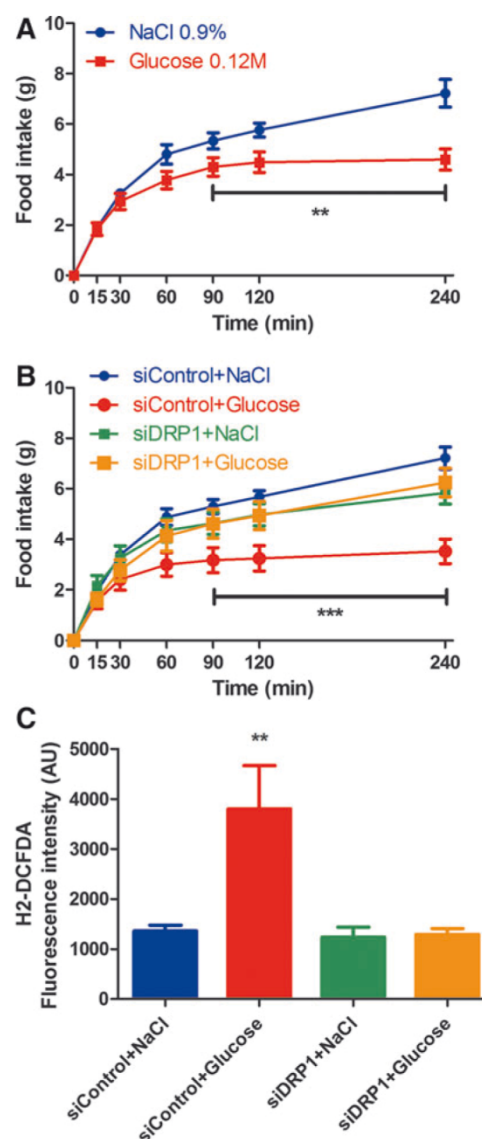
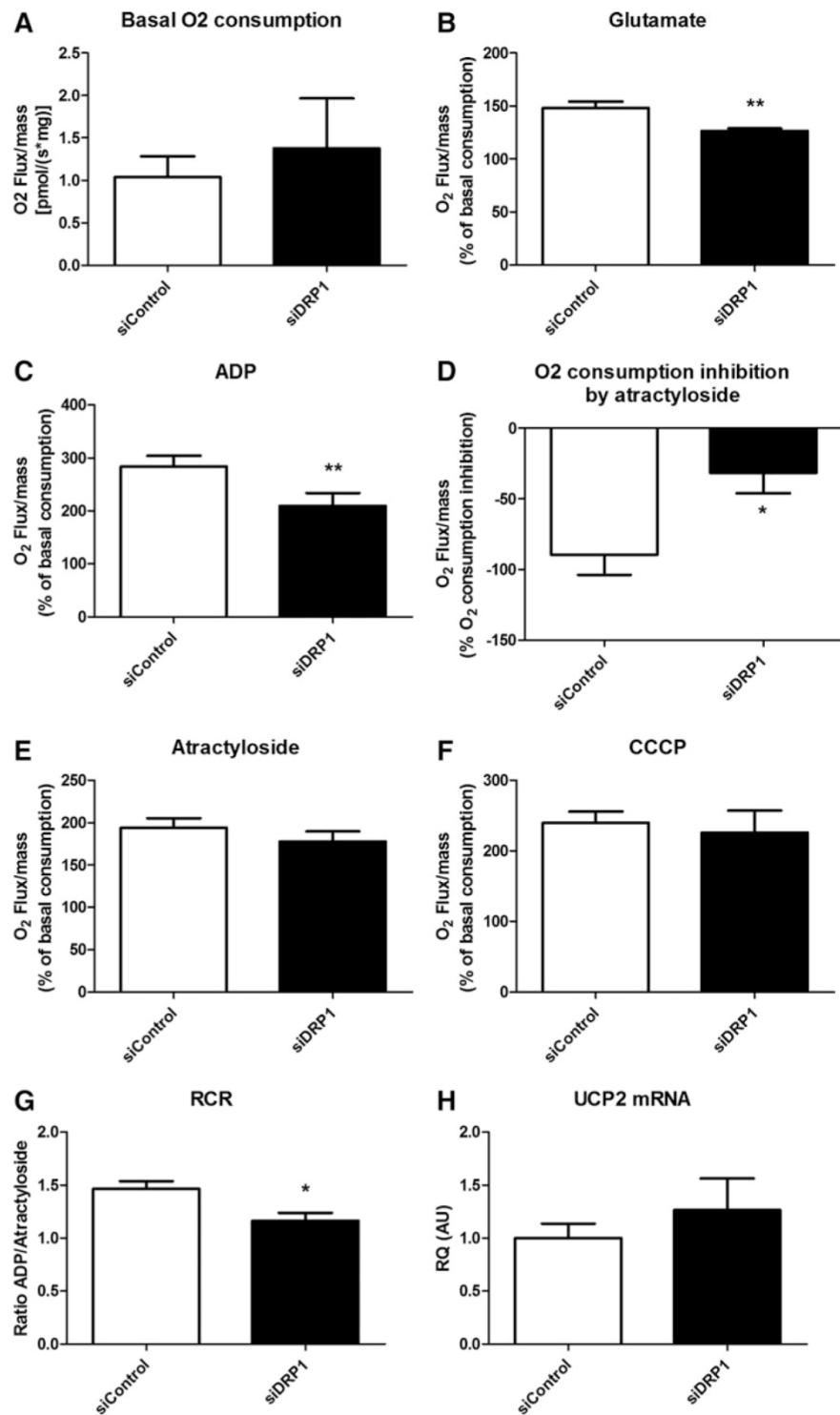


FIG. 5. Knockdown of DRP1 in the VMH alters the satiating effect of glucose and is a ROS-dependent mechanism. (A) Time course of food intake after an 18-h fast. The food consumption of glucose-injected animals was decreased compared to NaCl-injected animals. Data are mean \pm SEM; $n=10$ for both groups, two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test, $**p<0.01$. (B) The food consumption of siControl rats injected with glucose was decreased compared to siControls injected with NaCl, whereas siDRP1 animals exhibited a complete loss of glucose-induced satiation and had a similar refeeding than after NaCl injection. Data are mean \pm SEM; $n=14$, two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test, $***p<0.001$. (C) Glucose injection into the ARC induced overproduction of ROS (at 1 min) in the siControl group, which was absent in the siDRP1 group. Data are mean \pm SEM; $n=6$, one-way ANOVA followed by Bonferroni post-test, $**p<0.01$.

FIG. 6. Functional study of mitochondria in the VMH. (A) Basal respiratory capacities of mitochondria from siControl and siDRP1 rats were equivalent. (B) siDRP1 mitochondria displayed a decreased sensitivity to 10 mM glutamate, (C) to 1 mM ADP (full activation of ATP synthase), state 3, and (D) to 0.5 μ M CAtr (full inhibition of ATP synthase). (E) Percent O₂ consumption of basal state resulting from CAtr treatment, state 4. (F) No difference in maximal respiratory capacity was caused by the 0.4 μ M CCCP treatment. (G) Respiratory Control Ratio (RCR) (state 3/state 4) indicating the coupling level of mitochondria. (A–G) Data are mean \pm SEM; $n=8$ for siControls and $n=6$ for siDRP1, Mann Whitney test for (A), unpaired t -test with Welch's correction (B and C), and unpaired t -test for (D–G); * $p<0.05$; ** $p<0.01$. (H) UCP2 mRNA relative quantification. The UCP2 mRNA level was not modified in siDRP1 rats compared to siControl rats. Expression levels were measured as the ratio of UCP2 mRNA/18S mRNA (which was not modified by the treatment). Data are mean \pm SEM; $n=8$ for siControls and $n=6$ for siDRP1 groups, unpaired t -test.



(siControl: $-89.72 \pm 14.15\%$; siDRP1: $-31.62 \pm 14.26\%$) (Fig. 6D), highlighting a lower activity of Complex V, which resulted in an identical O₂ consumption in both groups after CAtr stimulation (siControls: $194.11 \pm 11.14\%$ of basal O₂ consumption; siDRP1: $177.83 \pm 11.9\%$) (Fig. 6E). Finally, the

calculated Respiratory Control Ratio (RCR, which represents the ratio of state 3/state 4) was significantly decreased in siDRP1 rats (siControls: 1.46 ± 0.07 ; siDRP1: 1.16 ± 0.07) (Fig. 6F), indicating a loss of coupling in mitochondria. The maximal respiratory capacity induced by carbonyl cyanide

m-chlorophenylhydrazone (CCCP) was not different between siControl and siDRP1 rats (siControl: $239.79 \pm 15.75\%$ of basal O_2 consumption; siDRP1: $225.71 \pm 31.49\%$) (Fig. 6G). To assess the role of mitochondrial uncoupling proteins (UCPs) on the respiratory modification, we quantified the mRNA level of uncoupling protein 2 (UCP2), which is a major rodent hypothalamic UCP (33) and did not find any difference between groups (Fig. 6H). These results reveal that siDRP1 rats present a decreased capacity of substrate-driven respiration linked to decreased coupling respiration.

Discussion

We recently highlighted that the hypothalamic glucose-sensing mechanism requires mROS production to trigger both electrical ARC activation and insulin secretion (22). Moreover, this signaling is altered in the Zucker obese, insulin-resistant rat model (11). Here, we show for the first time the importance of mitochondrial dynamic protein DRP1 in glucose-induced hypothalamic mROS production and energy metabolism regulation. We found the following: (a) DRP1-dependent mitochondrial relocation is induced by increased central glucose; (b) VMH DRP1 downregulation blocks glucose-induced mROS signaling, as well as central glucose-induced insulin secretion and central glucose-induced food intake decrease; and (c) decreased glucose-induced mROS signaling is consistently associated with altered mitochondrial respiratory activity.

The fission process is mainly dependent on DRP1, a cytoplasmic protein relocated to the mitochondrial membrane under various stimuli (36). Here, we show that increased glucose level rapidly (1 min) promotes DRP1 translocation from the cytosol to the mitochondria in the VMH *in vivo*. The ability of glucose to induce *in vivo* DRP1 translocation to the mitochondria is consistent with previous studies showing that mitochondrial fragmentation in high glucose conditions requires mitochondrial fission machinery in cell culture (27, 36, 40). In our conditions, no significant alteration of mitochondrial morphology was shown. This is consistent with the fact that only some VMH neurons are glucose sensitive (8). Moreover, up to date only *in vitro* mitochondria have been morphologically measured, suggesting that quantification on tissue remains uncertain. Altogether, our results suggest that the mitochondrial fission mechanism may be a subtle upstream actor in glucose-induced mROS signaling in the hypothalamus, thereby promoting the effects of glucose *in vivo* (11, 22).

To explore this mechanism, a downregulation of DRP1 in the VMH was performed by RNA interference. Using this strategy, we determined a maximal extinction (80%) of DRP1 expression 3 days after injection. At this time, there was no compensation through the other main mitochondrial dynamics actors (OPA1, MFN2, and FIS1). VMH mitochondrial morphology was not significantly changed. This might be due to a decreased activity of fusion mechanisms to maintain a normal morphology or to the difficulties in measuring mitochondria *in vivo* (22, 29–31). However, mitochondria per cell were decreased, suggesting the fusion process predominates. The down expression of DRP1 protein led to a defect in glucose-induced ROS production and physiological responses. This might be explained only if a lack of the DRP1 relocalization to the mitochondrial membrane occurred.

We then explored the impact of VMH DRP1 inhibition on the hypothalamic glucose-sensing mechanism. We previously showed that an intracarotid injection of a glucose load that does not alter peripheral blood glucose level induces a transient insulin secretion. In addition, we also showed that this intracarotid glucose load-induced insulin secretion is hypothalamic mROS production-dependent (22). In this study, there was no increased mROS production in siDRP1-treated animals 1 min post-glucose injection. This result suggests that the mitochondrial DRP1-dependent fission is an early and rapid event preceding mROS production. This suggestion is consistent with a study by Yu et al. (40) and previous studies on mitochondrial fission showing the ability of mitochondria to split rapidly and re-fuse (28).

As previously described, we found that intracarotid glucose injection-induced insulin secretion was altered in VMH siDRP1-treated rats. This result could be the consequence of altered β -cell function. To gain further insight into the control of insulin secretion in transient DRP1-deficient rats, their freshly isolated islets were compared to control ones for both their intrinsic response to glucose and to a classical muscarinic receptor agonist. This approach is used as a marker of parasympathetic control, as previously described (12, 25). Regarding islet response to high glucose, there was a normal response of the VMH DRP1-deficient rats, showing that direct glucose stimulation was not altered. However, the muscarinic islet activation through a cholinergic agonist triggered a hyper response. This response reflects an increased sensitivity of the muscarinic receptor and is classically observed when parasympathetic tone decreases, enhancing either the activity and/or the number of receptors on the islets (12, 25). We can conclude that parasympathetic activity was decreased. Indeed, the *in vivo* response of the islets to a central glucose load showed a drastic drop of insulin release, which is explained by this downregulated parasympathetic tone.

The satiating role of glucose in DRP1-deficient animals was completely abolished. This effect was concomitant with an absence of VMH mROS production. Together with the defective response to central glucose-induced insulin secretion, these results reinforce the role of the fission protein DRP1 in VMH glucose-induced mROS signaling as well as a role in hypothalamic glucose sensing. Finally, the exploration of mitochondrial respiration highlighted changes induced by DRP1 down-expression in the VMH. The results demonstrate that the loss of mROS production in response to glucose load is due to decreased capacity of the mitochondrial electron transfer chain (ETC) to oxidize the substrates, associated with decreased coupled respiration. Indeed, the RCR (ratio between O_2 flux of ADP-stimulated respiration to ATP synthase-inhibited respiration, which represents the coupling activity of the ETC) was decreased. These observations are consistent with others showing modifications of coupling activity when mitochondrial dynamics are altered (7, 40). ROS are produced by electron leakage during mitochondrial metabolism. The rate of ROS formation is enhanced as mitochondrial metabolism increases when mitochondria are well coupled (9, 37). Classical observations indicate that active mitochondria are more condensed and have an electron dense matrix, which favors mROS production (14). This suggests that physiological mitochondrial fragmentation upon glucose increase triggers contracted and condensed mitochondria. Dynamic changes of the internal structure (mitochondrial

cristae and the complexes' arrangement) are tightly associated with functional respiration (26, 39). These explanations are consistent with previous observations describing decreased glucose oxidation associated with mitochondrial dynamics disruption in peripheral tissues of obese patients (3, 4). Regarding hypothalamic glucose sensing, altered mROS signaling has been shown *in vivo* in obese, insulin-resistant rat model (11). These animals exhibit hypersensitivity to glucose that leads to insulin secretion in response to a lower glucose bolus injection compared to lean rats. Since DRP1 appears as a crucial element in mROS signaling in response to glucose, it suggests that deregulated mitochondrial dynamics through DRP1 might be present in this model. Further investigations will determine whether DRP1 plays a role in hypothalamic glucose sensing dysfunction of obese rats. Studies on pancreatic beta-cells show that cellular alteration seen during chronic hyperglycemia is fission dependent. Molina and colleagues found that beta-cell mitochondria become fragmented and lose their ability to undergo fusion (29). These data suggest that deregulation of hypothalamic DRP1 in response to excessive nutrients exposure might be involved in impaired nutrient sensitivity in models of obesity or Type 2 diabetes.

Collectively, this work demonstrates for the first time *in vivo* that DRP1-dependent mitochondrial fission is essential for glucose-induced mROS signaling in hypothalamic glucose sensing. Further investigations to determine which metabolic or hormonal factors trigger changes in mitochondrial dynamics and mROS production will help us to better understand the mechanisms involved in the central control of energy homeostasis.

Methods

Animals: Diet and experimental procedures

Male Wistar rats (7-weeks-old; Charles River, Lyon, France) were individually housed in a controlled environment (12 h light/dark cycle, light on at 7:00 AM, 22°C), with *ad libitum* access to food and water. Surgeries and experiments were performed under pentobarbital anesthesia (50 mg/kg, Centravet, Nancy, France). All procedures involving rats followed the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and were approved by a local committee. All experiments were performed after 4 h fasting, excepted when noted. Body weight and food intake were measured every day, 3 h after the beginning of the light cycle.

Cannula implantation and siRNA injection

In anesthetized animals, intracerebral double guide stainless-steel cannulae (26-gauge (Plastics One, Roanoke, VA) were inserted bilaterally into the VMH according to stereotaxic coordinates (anterior-posterior: -3.14 mm vs. bregma; medial-lateral: 0.25 mm; dorsal-ventral: 9.4 mm). Cannula location was confirmed by bromophenol blue injection after experimentation. The animals were allowed to recover for 6 days and were handled daily. On the day of the experiment, a double-stranded 21-nucleotide small interfering RNA (siRNA) obtained from GeneCust (Lux) was transduced using the JetSI system (OZYME, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) (15) and injected (100 pM) through the cannula guide to knockdown the expression of DRP1. The siRNA sequence

efficiently targeting rat DRP1 (Accession N° BC085843) corresponds to the coding region 258–278 relative to the first nucleotide of the start codon (siRNA, sense strand: 5'-AA CUCAGAGCAGUGGAAAGAG-UdTdT-3'). Knockdown of DRP1 in the VMH was measured 24 h, 48 h, 72 h and 96 h post-injection.

Intracarotid injection of glucose towards the brain

Experiments were performed as previously described (10). Plasma insulin level was determined using the ultrasensitive ELISA kit (Eurobio, Courtaboeuf, France).

Mitochondrial isolation

After euthanasia by cervical dislocation, brains were quickly removed and immediately immersed in ice-cold MB+ buffer (10 mM HEPES, 210 mM mannitol, 1 mM DTT, 240 mM sucrose, protease inhibitor cocktail tablet (Roche, Meylan, France). VMH, cortex, and thalami were dissected, immersed for 15 min in MB+ buffer and homogenized with a Dounce homogenizer (7.5 μ l/10 mg tissue). Homogenates were resuspended in 125 μ l/10 mg tissue of MB+ buffer and centrifuged (1000 g, 10 min, 4°C). Supernatants were centrifuged (12,000 g, 10 min, 4°C). The remaining mitochondrial pellet was resuspended for Western blot analysis.

ROS level measurement

One minute after the carotid or VMH glucose injection, rats were decapitated, VMH, thalami, and cortex were harvested and frozen and stored at -80°C. ROS were assessed as previously described (11).

Western blot analysis

Proteins were separated on 10% SDS-PAGE. Antibodies against OXPHOS, Actin, DRP1, OPA1, FIS1, or MFN2 were used. After transfer and blocking, membranes were probed in 1% nonfat milk prepared in TBS-T with 1/1,000 mouse anti-OXPHOS (Mitosciences, Euromedex, Mundolsheim, France), 1/100,000 mouse anti-Actin (Millipore, Molsheim, France), 1/10,000 mouse anti-DRP1 (BD Biosciences, Le Pont-De-Claix, France), 1/500 mouse anti-OPA1 (BD Biosciences), 1/500 rabbit anti-FIS1 (Clinisciences, Montrouge, France) or 1/500 mouse anti-MFN2 (Abnova, Montluçon, France) overnight at 4°C. Specific bands of the proteins were detected using a goat anti-mouse (1/10,000 in TBST-1X) or anti-rabbit (1/10,000 in TBST-1X) peroxidase-conjugated secondary antibody (Amersham, Saclay, France) incubated for 1 h at room temperature. Bands were revealed with a chemiluminescence kit (Amersham) and were exposed to a ChemiDoc XRS+ system (BioRad, Marnes-la-coquette, France) for densitometry analysis.

O₂ consumption measurement on permeabilized VMH

Oxygen consumption was measured using a respirometer (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) as previously described (5, 11). Mitochondrial respiration was stimulated by the addition of 10 mM glutamate to achieve the state 2. Next, 1 mM ADP was added to achieve the state 3 respiration. Then, 0.5 μ M carboxyatractylate (CAtr) was added to block ATP synthesis and achieve the state 4 respiration.

Finally, 0.4 μ M CCCP, a chemical uncoupler, was used to measure the maximal respiration.

Refeeding test in response to VMH glucose injection

After overnight fasting, glucose (0.12 M in 0.9% saline) was injected into the VMH (1 μ l). Food consumption was measured 15, 30, 45, 60, 90, 120, and 240 min post-injection. For ROS measurements, brains were removed 1 min after glucose injection as described above.

RNA extraction, reverse transcription, and quantitative real-time PCR

cDNA were synthesized from total VMH RNA and amplified by PCR with UCP2 or 18S primers using the StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France) [primer sequences: UCP2 forward 5'-3':GGC-GGT-GGT-CGG-AGA-TA, reverse 5'-3':GGC-AGA-AGT-GAA-GTG-GCA-AGG-G (19); 18S forward 5'-3':CCA-TTC-GAA-CGT-CTG-CCC-TAT, reverse 5'-3':GTC-ACC-CGT-CAC-CAT-G (19)].

Islet treatments and insulin measurement

Islets isolation and preincubation period were performed as previously described (14, 25). Over the preincubation period, islets were incubated in the different glucose concentrations (5.5 mM or 16.7 mM) for 30 min at 37°C. The acetylcholine receptor agonist acetyl-methylcholine bromide 0.1 mM (Sigma, Lyon, France) was assessed in 5.5 mM glucose. Incubation medium was harvested and stored at -20°C before insulin measurement. The release of insulin by the islets was measured using a radioimmunoassay kit (Cis-Bio International, Gif-sur-Yvette, France).

Immunohistochemistry

After either cerebral hyperglycemia or 72 h after VMH siRNA injection, brains were quickly frozen in isopentane, -40°C. 10 μ m hypothalamic cryosections were fixed, then permeabilized for 10 min and blocked in PBS/0.5% Tween20/3% normal goat serum (Mitosciences) (38). After incubation with mouse anti-OXPHOS (1/2000 in PBS/0.5% Tween 20/3% NGS, Mitosciences) overnight at 4°C and washing, sections were incubated in goat anti-mouse alexa 488 (1/4000 in PBS/0.5% Tween20) for 1 h. Sections were mounted and examined under an Apotome fluorescence microscope (Zeiss). Specificity of labeling was ascertained with omission of primary antibody. Quantification of the number of mitochondria was performed after image acquisition. Alexa 488 fluorescent objects which correspond to mitochondria were detected using ImageJ software. The number of total objects per picture was divided by the number of total nuclei (labeled by DAPI).

Electron microscopy

Brain samples were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2 at 4°C for 4 h, and post-fixed overnight with 1% osmic acid in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2. Samples were then dehydrated in acetone, stained with 2% uranyl acetate in acetone for 2 h at 4°C in a dark room, and embedded in epoxy resin (Araldite, Fluka). Ultrathin sections were contrasted with 2% lead citrate in water for 1 min, and

were observed with a Hitachi 7650 transmission electron microscope.

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using Prism 4.0. Normality has been tested with Kolmogorov-Smirnov test. According to the result, unpaired *t*-test, unpaired *t*-test with Welch's correction (when equal variance was not assume) or Mann Whitney test (when normality was not assumed), one way ANOVA or two-way ANOVA analysis (followed by Bonferroni post test) were performed as detailed in figure legend. Differences are symbolized as *, **, or *** on graphic representations for *p* values of <0.05, 0.01, and 0.001, respectively.

Author Contributions

LC and CL designed and performed the experiments, interpreted data, and wrote the manuscript. CT-C and DB performed pancreatic islets experiments; CA, LC, and CB carried out histochemistry and pictures analysis; XF, CG, and GO helped on *in vivo* experiments. LC and EN performed RT-qPCR. BS and MR performed transmission electron microscopy. PB and LP contributed to discussion and reviewed the manuscript.

Acknowledgments

LC has a fellowship from the Ministère de la Recherche et de la Technologie. CL, LP, and PB have a grant from Agence Nationale de la Recherche (ANR-06-PHYSIO-Oox, "Meta-DisMitoDyn"), and C.L has a grant from Alfediam (Prize Merck-Lipha 2009). We are indebted to A. Lefranc (CSGA, UMR 6265 CNRS, UMR 1324 INRA, Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France) for assistance with the rats.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Andrews ZB, Liu ZW, Wallingford N, Erion DM, Borok E, Friedman JM, Tschop MH, Shanabrough M, Cline G, Shulman GI, Coppola A, Gao XB, Horvath TL, and Diano S. UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* 454: 846–851, 2008.
2. Atef N, Ktorza A, and Penicaud L. CNS involvement in the glucose induced increase of islet blood flow in obese Zucker rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 19: 103–107, 1995.
3. Bach D, Naon D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Rieusset J, Laville M, Guillet C, Boirie Y, Wallberg-Henriksson H, Manco M, Calvani M, Castagneto M, Palacin M, Mingrone G, Zierath JR, Vidal H, and Zorzano A. Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: Effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Diabetes* 54: 2685–2693, 2005.
4. Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, Dugaard JR, Lloberas J, Camps M, Zierath JR, Rabasa-Lhoret R, Wallberg-Henriksson H, Laville M, Palacin M, Vidal H, Rivera F, Brand M, and Zorzano A. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem* 278: 17190–17197, 2003.

5. Benani A, Barquissau V, Carneiro L, Salin B, Colombani AL, Leloup C, Casteilla L, Rigoulet M, and Penicaud L. Method for functional study of mitochondria in rat hypothalamus. *J Neurosci Meth* 178: 301–307, 2009.
6. Benani A, Troy S, Carmona MC, Fioramonti X, Lorsignol A, Leloup C, Casteilla L, and Penicaud L. Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: Redox regulation of food intake. *Diabetes* 56: 152–160, 2007.
7. Benard G, Bellance N, James D, Parrone P, Fernandez H, Letellier T, and Rossignol R. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci* 120: 838–848, 2007.
8. Blouet C and Schwartz GJ. Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behav Brain Res* 209: 1–12, 2010.
9. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism. *Diabetes* 54: 1615–1625, 2005.
10. Chen H, Chomyn A, and Chan DC. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 280: 26185–26192, 2005.
11. Colombani AL, Carneiro L, Benani A, Galinier A, Jaillard T, Duparc T, Offer G, Lorsignol A, Magnan C, Casteilla L, Penicaud L, and Leloup C. Enhanced hypothalamic glucose sensing in obesity: Alteration of redox signaling. *Diabetes* 58: 2189–2197, 2009.
12. Cruciani-Guglielmacci C, Vincent-Lamon M, Rouch C, Orosco M, Ktorza A, and Magnan C. Early changes in insulin secretion and action induced by high-fat diet are related to a decreased sympathetic tone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E148–154, 2005.
13. Guillod-Maximin E, Lorsignol A, Alquier T, and Penicaud L. Acute intracarotid glucose injection towards the brain induces specific c-fos activation in hypothalamic nuclei: Involvement of astrocytes in cerebral glucose-sensing in rats. *J Neuroendocrinol* 16: 464–471, 2004.
14. Hackenbrock CR. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J Cell Biol* 30: 269–297, 1966.
15. Hassani Z LG, Erbacher P, Palmier K, Alfama G, Giovannangeli C, Behr JP, and Demeneix BA. Lipid-mediated siRNA delivery down-regulates exogenous gene expression in the mouse brain at picomolar levels. *J Gene Med* 7: 198–207, 2005.
16. Jansson L and Hellerstrom C. Glucose-induced changes in pancreatic islet blood flow mediated by central nervous system. *Am J Physiol* 251: E644–647, 1986.
17. Jordan SD, Konner AC, and Bruning JC. Sensing the fuels: Glucose and lipid signaling in the CNS controlling energy homeostasis. *Cell Mol Life Sci* 67: 3255–3273, 2010.
18. Karnani M and Burdakov D. Multiple hypothalamic circuits sense and regulate glucose levels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300: R47–55, 2011.
19. Kitahara T, Horii A, Kizawa K, Maekawa C, and Kubo T. Changes in mitochondrial uncoupling protein expression in the rat vestibular nerve after labyrinthectomy. *Neurosci Res* 59: 237–242, 2007.
20. Leloup C, Arluison M, Lepetit N, Cartier N, Marfaing-Jallat P, Ferre P, and Penicaud L. Glucose transporter 2 (GLUT 2): Expression in specific brain nuclei. *Brain Res* 638: 221–226, 1994.
21. Leloup C, Casteilla L, Carriere A, Galinier A, Benani A, Carneiro L, and Penicaud L. Balancing mitochondrial redox signaling: A key point in metabolic regulation. *Antioxid Redox Signal* 14: 519–30, 2011.
22. Leloup C, Magnan C, Benani A, Bonnet E, Alquier T, Offer G, Carriere A, Periquet A, Fernandez Y, Ktorza A, Casteilla L, and Penicaud L. Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing. *Diabetes* 55: 2084–2090, 2006.
23. Leloup C, Orosco M, Serradas P, Nicolaidis S, and Penicaud L. Specific inhibition of GLUT2 in arcuate nucleus by antisense oligonucleotides suppresses nervous control of insulin secretion. *Brain Res Mol Brain Res* 57: 275–280, 1998.
24. Leloup C, Tourrel-Cuzin C, Magnan C, Karaca M, Castel J, Carneiro L, Colombani AL, Ktorza A, Casteilla L, and Penicaud L. Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 58: 673–681, 2009.
25. Leon-Quinto T MC, and Portha B. Altered activity of the autonomous nervous system as a determinant of the impaired beta-cell secretory response after protein-energy restriction in the rat. *Endocrinology* 139: 3382–3389, 1998.
26. Mannella CA. Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys Acta* 1763: 542–548, 2006.
27. Men X, Wang H, Li M, Cai H, Xu S, Zhang W, Xu Y, Ye L, Yang W, Wollheim CB, and Lou J. Dynamin-related protein 1 mediates high glucose induced pancreatic beta cell apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 879–890, 2009.
28. Mitra K WC, Roysam B, Lin G, and Lippincott-Schwartz J. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 11960–11965, 2009.
29. Molina AJ, Wikstrom JD, Stiles L, Las G, Mohamed H, Elorza A, Walzer G, Twig G, Katz S, Corkey BE, and Shirihai OS. Mitochondrial networking protects beta-cells from nutrient-induced apoptosis. *Diabetes* 58: 2303–2315, 2009.
30. Oomura Y, Ono T, Ooyama H, and Wayner MJ. Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. *Nature* 222: 282–284, 1969.
31. Penicaud L, Leloup C, Fioramonti X, Lorsignol A, and Benani A. Brain glucose sensing: A subtle mechanism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9: 458–462, 2006.
32. Pi J, Bai Y, Zhang Q, Wong V, Floering LM, Daniel K, Reece JM, Deeney JT, Andersen ME, Corkey BE, and Collins S. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 56: 1783–1791, 2007.
33. Richard D, Huang Q, Sanchis D, and Ricquier D. Brain distribution of UCP2 mRNA: In situ hybridization histochemistry studies. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23: S53–55, 1999.
34. Smirnova E GL, Shurland DL, and van der Blik AM. Dynamin-related protein DRP1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 12: 2245–2256, 2001.
35. Song Z, Levin BE, McArdle JJ, Bakhos N, and Routh VH. Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucose-sensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes* 50: 2673–2681, 2001.
36. Uo T, Dworzak J, Kinoshita C, Inman DM, Kinoshita Y, Horner PJ, and Morrison RS. Drp1 levels constitutively regulate mitochondrial dynamics and cell survival in cortical neurons. *Exp Neurol* 218: 274–285, 2009.
37. Yamagishi SI ED, Du XL, and Brownlee M. Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes* 50: 1491–1494, 2001.

38. Yang XJ, Kow LM, Funabashi T, and Mobbs CV. Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms. *Diabetes* 48: 1763–1772, 1999.
39. Yoon Y, Galloway CA, Jhun BS, and Yu T. Mitochondrial dynamics in diabetes. *Antioxid Redox Signal* 14: 439–457, 2011.
40. Yu T, Robotham JL, and Yoon Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 2653–2658, 2006.
41. Zorzano A, Liesa M, and Palacin M. Role of mitochondrial dynamics proteins in the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 1846–1854, 2009.

Address correspondence to:

Prof. Corinne Leloup
Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation (CSGA)
UMR CNRS 6265 INRA 1324 uB
9E, boulevard Jeanne d'Arc
Université de Bourgogne
F-21000 Dijon
France

E-mail: lelou@cict.fr

Date of first submission to ARS Central: August 29, 2011; date of final revised submission, December 21, 2011; date of acceptance, January 8, 2012.

Abbreviations Used

ARC = arcuate nucleus
AU = arbitrary unit
CCCP = carbonyl cyanide m-chloro-phenyl hydrazine
DRP1 = dynamin-related protein 1
ETC = electron transport chain
FIS1 = fission protein 1
LH = lateral hypothalamus
MFNs = mitofusins
mROS = mitochondrial reactive oxygen species
OPA1 = optic atrophy 1
siControl = siRNA control injected animals
siDRP1 = siRNA DRP1 injected animals
UCPs = uncoupling proteins
VMH = ventromedial hypothalamus (VMN+ARC)
VMN = ventromedian nucleus

Bibliographie

- Abbott, C.R., Kennedy, A.R., Wren, A.M., Rossi, M., Murphy, K.G., Seal, L.J., Todd, J.F., Ghatei, M.A., Small, C.J., and Bloom, S.R. (2003). Identification of hypothalamic nuclei involved in the orexigenic effect of melanin-concentrating hormone. *Endocrinology* *144*, 3943–3949.
- Abbott, N.J., Rönnbäck, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews. Neuroscience* *7*, 41–53.
- Adachi, A., Shimizu, N., Oomura, Y., and Kobáshi, M. (1984). Convergence of hepatoportal glucose-sensitive afferent signals to glucose-sensitive units within the nucleus of the solitary tract. *Neuroscience Letters* *46*, 215–218.
- Ahrén, B. (2000). Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia* *43*, 393–410.
- Allaman, I., Bélanger, M., and Magistretti, P.J. (2011). Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends in Neurosciences* *34*, 76–87.
- Alon, T., and Friedman, J.M. (2006). Late-onset leanness in mice with targeted ablation of melanin concentrating hormone neurons. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* *26*, 389–397.
- Alquier, T., Leloup, C., Atef, N., Fioramonti, X., Lorsignol, A., and Pénicaud, L. (2003). Cerebral insulin increases brain response to glucose. *Journal of Neuroendocrinology* *15*, 75–79.
- Ambati, S., Duan, J., Duff, E., Choi, Y.-H., Hartzell, D.L., Della-Fera, M.A., and Baile, C.A. (2007). Gene expression in arcuate nucleus-median eminence of rats treated with leptin or ciliary neurotrophic factor. *BioFactors (Oxford, England)* *31*, 133–144.
- Anand, B.K., and Brobeck, J.R. (1951). Localization of a “feeding center” in the hypothalamus of the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* *77*, 323–324.
- Anand, B.K., Chhina, G.S., Sharma, K.N., Dua, S., and Singh, B. (1964). Activity of single neurons in the hypothalamic feeding centers: effect of glucose. *The American Journal of Physiology* *207*, 1146–1154.
- Aravich, P.F., and Scalfani, A. (1983). Paraventricular hypothalamic lesions and medial hypothalamic knife cuts produce similar hyperphagia syndromes. *Behavioral Neuroscience* *97*, 970–983.
- Ariyasu, H., Takaya, K., Tagami, T., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T., Suda, M., Koh, T., Natsui, K., Toyooka, S., et al. (2001). Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* *86*, 4753–4758.
- Arletti, R., Benelli, A., and Bertolini, A. (1990). Oxytocin inhibits food and fluid intake in rats. *Physiology & Behavior* *48*, 825–830.
- Arluison, M., Quignon, M., Nguyen, P., Thorens, B., Leloup, C., and Pénicaud, L. (2004a). Distribution and anatomical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain--an immunohistochemical study. *Journal of Chemical Neuroanatomy* *28*, 117–136.
- Arluison, M., Quignon, M., Thorens, B., Leloup, C., and Pénicaud, L. (2004b). Immunocytochemical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain. II. Electron microscopic study. *Journal of Chemical Neuroanatomy* *28*, 137–146.
- Atalayer, D., Robertson, K.L., Haskell-Luevano, C., Andreasen, A., and Rowland, N.E. (2010). Food demand and meal size in mice with single or combined disruption of melanocortin type 3 and 4 receptors. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* *298*, R1667–74.

- Atef, N., Ktorza, A., and Pénicaud, L. (1995). CNS involvement in the glucose induced increase of islet blood flow in obese Zucker rats. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders : Journal of the International Association for the Study of Obesity* 19, 103–107.
- Bachman, E.S., Dhillon, H., Zhang, C.-Y., Cinti, S., Bianco, A.C., Kobilka, B.K., and Lowell, B.B. (2002). betaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science (New York, N.Y.)* 297, 843–845.
- Bady, I., Marty, N., Dallaporta, M., Emery, M., Gyger, J., Tarussio, D., Foretz, M., and Thorens, B. (2006). Evidence from glut2-null mice that glucose is a critical physiological regulator of feeding. *Diabetes* 55, 988–995.
- Bagnol, D., Lu, X.Y., Kaelin, C.B., Day, H.E., Ollmann, M., Gantz, I., Akil, H., Barsh, G.S., and Watson, S.J. (1999). Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 19, RC26.
- Ball, K.K., Harik, L., Gandhi, G.K., Cruz, N.F., and Dienel, G. a (2011). Reduced gap junctional communication among astrocytes in experimental diabetes: contributions of altered connexin protein levels and oxidative-nitrosative modifications. *Journal of Neuroscience Research* 89, 2052–2067.
- Balmaceda-Aguilera, C., Cortés-Campos, C., Cifuentes, M., Peruzzo, B., Mack, L., Tapia, J.C., Oyarce, K., García, M.A., and Nualart, F. (2012). Glucose transporter 1 and monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 localization within the glial cells of shark blood-brain-barriers. *PloS One* 7, e32409.
- Barros, L.F., Bittner, C.X., Loaiza, A., Ruminot, I., Larenas, V., Moldenhauer, H., Oyarzún, C., and Alvarez, M. (2009). Kinetic validation of 6-NBDG as a probe for the glucose transporter GLUT1 in astrocytes. *Journal of Neurochemistry* 109 Suppl, 94–100.
- Belgardt, B.F., Okamura, T., and Brüning, J.C. (2009). Hormone and glucose signalling in POMC and AgRP neurons. *The Journal of Physiology* 587, 5305–5314.
- Benani, A., Hryhorczuk, C., Gouazé, A., Fioramonti, X., Brenachot, X., Guissard, C., Krezymon, A., Duparc, T., Colom, A., Nédélec, E., et al. (2012). Food Intake Adaptation to Dietary Fat Involves PSA-Dependent Rewiring of the Arcuate Melanocortin System in Mice. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 32, 11970–11979.
- Benani, A., Troy, S., Carmona, M.C., Fioramonti, X., Lorsignol, A., Leloup, C., Casteilla, L., and Pénicaud, L. (2007). Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: redox regulation of food intake. *Diabetes* 56, 152–160.
- Benoit, S.C., Air, E.L., Coolen, L.M., Strauss, R., Jackman, A., Clegg, D.J., Seeley, R.J., and Woods, S.C. (2002). The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 22, 9048–9052.
- Benoit, S.C., Clegg, D.J., Seeley, R.J., and Woods, S.C. (2004). Insulin and leptin as adiposity signals. *Recent Progress in Hormone Research* 59, 267–285.
- Bergersen, L., Waerhaug, O., Helm, J., Thomas, M., Laake, P., Davies, A.J., Wilson, M.C., Halestrap, A.P., and Ottersen, O.P. (2001). A novel postsynaptic density protein: the monocarboxylate transporter MCT2 is co-localized with delta-glutamate receptors in postsynaptic densities of parallel fiber-Purkinje cell synapses. *Experimental Brain Research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation Cérébrale* 136, 523–534.
- Berkich, D.A., Ola, M.S., Cole, J., Sweatt, A.J., Hutson, S.M., and LaNoue, K.F. (2007). Mitochondrial transport proteins of the brain. *Journal of Neuroscience Research* 85, 3367–3377.
- Bernardinelli, Y., Magistretti, P.J., and Chatton, J.-Y. (2004). Astrocytes generate Na⁺-mediated metabolic waves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 14937–14942.

- Berthoud, H., Fox, E.A., and Powley, T.L. (1990). Localization of vagal preganglionics that stimulate insulin and glucagon secretion. *The American Journal of Physiology* 258, R160–8.
- Berthoud, H.-R. (2002). Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 26, 393–428.
- Berthoud, H.-R. (2007). Interactions between the “cognitive” and “metabolic” brain in the control of food intake. *Physiology & Behavior* 91, 486–498.
- Berthoud, H.-R. (2008). The vagus nerve, food intake and obesity. *Regulatory Peptides* 149, 15–25.
- Berthoud, H.-R., Sutton, G.M., Townsend, R.L., Patterson, L.M., and Zheng, H. (2006). Brainstem mechanisms integrating gut-derived satiety signals and descending forebrain information in the control of meal size. *Physiology & Behavior* 89, 517–524.
- Billington, C.J., Briggs, J.E., Grace, M., and Levine, A.S. (1991). Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *The American Journal of Physiology* 260, R321–7.
- Bingham, N.C., Anderson, K.K., Reuter, A.L., Stallings, N.R., and Parker, K.L. (2008). Selective loss of leptin receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus results in increased adiposity and a metabolic syndrome. *Endocrinology* 149, 2138–2148.
- Bittar, P.G., Charnay, Y., Pellerin, L., Bouras, C., and Magistretti, P.J. (1996). Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 16, 1079–1089.
- Blevins, J.E., Eakin, T.J., Murphy, J. a, Schwartz, M.W., and Baskin, D.G. (2003). Oxytocin innervation of caudal brainstem nuclei activated by cholecystokinin. *Brain Research* 993, 30–41.
- Blomstrand, F., Venance, L., Sirén, A.-L., Ezan, P., Hanse, E., Glowinski, J., Ehrenreich, H., and Giaume, C. (2004). Endothelins regulate astrocyte gap junctions in rat hippocampal slices. *The European Journal of Neuroscience* 19, 1005–1015.
- Blouet, C., Jo, Y.-H., Li, X., and Schwartz, G.J. (2009). Mediobasal hypothalamic leucine sensing regulates food intake through activation of a hypothalamus-brainstem circuit. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 29, 8302–8311.
- Blouet, C., and Schwartz, G.J. (2010). Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behavioural Brain Research* 209, 1–12.
- Borg, M.A., Tamborlane, W. V, Shulman, G.I., and Sherwin, R.S. (2003). Local lactate perfusion of the ventromedial hypothalamus suppresses hypoglycemic counterregulation. *Diabetes* 52, 663–666.
- Borowsky, B., Durkin, M.M., Ogozalek, K., Marzabadi, M.R., DeLeon, J., Lagu, B., Heurich, R., Lichtblau, H., Shaposhnik, Z., Daniewska, I., et al. (2002). Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. *Nature Medicine* 8, 825–830.
- Bouzier-Sore, A.-K., Voisin, P., Bouchaud, V., Bezancon, E., Franconi, J.-M., and Pellerin, L. (2006). Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: a comparative NMR study. *The European Journal of Neuroscience* 24, 1687–1694.
- Boyle, P.J., Liggett, S.B., Shah, S.D., and Cryer, P.E. (1988). Direct muscarinic cholinergic inhibition of hepatic glucose production in humans. *The Journal of Clinical Investigation* 82, 445–449.
- Brix, B., Mesters, J.R., Pellerin, L., and Jöhren, O. (2012). Endothelial cell-derived nitric oxide enhances aerobic glycolysis in astrocytes via HIF-1 α -mediated target gene activation. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 32, 9727–9735.

- Broberger, C., De Lecea, L., Sutcliffe, J.G., and Hökfelt, T. (1998). Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *The Journal of Comparative Neurology* 402, 460–474.
- Buijs, R.M., Chun, S.J., Nijima, A., Romijn, H.J., and Nagai, K. (2001). Parasympathetic and sympathetic control of the pancreas: a role for the suprachiasmatic nucleus and other hypothalamic centers that are involved in the regulation of food intake. *The Journal of Comparative Neurology* 431, 405–423.
- Bultman, S.J., Michaud, E.J., and Woychik, R.P. (1992). Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell* 71, 1195–1204.
- Burcelin, R., Da Costa, A., Drucker, D., and Thorens, B. (2001). Glucose competence of the hepatoportal vein sensor requires the presence of an activated glucagon-like peptide-1 receptor. *Diabetes* 50, 1720–1728.
- Burcelin, R., Dolci, W., and Thorens, B. (2000a). Glucose sensing by the hepatoportal sensor is GLUT2-dependent: in vivo analysis in GLUT2-null mice. *Diabetes* 49, 1643–1648.
- Burcelin, R., Dolci, W., and Thorens, B. (2000b). Portal glucose infusion in the mouse induces hypoglycemia: evidence that the hepatoportal glucose sensor stimulates glucose utilization. *Diabetes* 49, 1635–1642.
- Burdakov, D., Gerasimenko, O., and Verkhratsky, A. (2005). Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentrating hormone and orexin neurons in situ. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 25, 2429–2433.
- Burdakov, D., Liss, B., and Ashcroft, F.M. (2003). Orexin excites GABAergic neurons of the arcuate nucleus by activating the sodium--calcium exchanger. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 23, 4951–4957.
- Burgos-Ramos, E., Chowen, J.A., Arilla-Ferreiro, E., Canelles, S., Argente, J., and Barrios, V. (2011). Chronic central leptin infusion modifies the response to acute central insulin injection by reducing the interaction of the insulin receptor with IRS2 and increasing its association with SOCS3. *Journal of Neurochemistry* 117, 175–185.
- Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z., and Ellisman, M.H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 22, 183–192.
- Cai, X.J., Evans, M.L., Lister, C.A., Leslie, R.A., Arch, J.R., Wilson, S., and Williams, G. (2001). Hypoglycemia activates orexin neurons and selectively increases hypothalamic orexin-B levels: responses inhibited by feeding and possibly mediated by the nucleus of the solitary tract. *Diabetes* 50, 105–112.
- Campfield, L.A., and Smith, F.J. (2003). Blood glucose dynamics and control of meal initiation: a pattern detection and recognition theory. *Physiological Reviews* 83, 25–58.
- Campfield, L.A., Smith, F.J., Guisez, Y., Devos, R., and Burn, P. (1995). Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science (New York, N.Y.)* 269, 546–549.
- Canis, M., Maurer, M.H., Kuschinsky, W., Duembgen, L., and Duelli, R. (2009). Increased densities of monocarboxylate transporter MCT1 after chronic hyperglycemia in rat brain. *Brain Research* 1257, 32–39.
- Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological Reviews* 84, 277–359.

- Carneiro, L., Allard, C., Guissard, C., Fioramonti, X., Turrel-Cuzin, C., Bailbé, D., Barreau, C., Offer, G., Nédélec, E., Salin, B., et al. (2012). Importance of mitochondrial dynamin-related protein 1 in hypothalamic glucose sensitivity in rats. *Antioxidants & Redox Signaling* *17*, 433–444.
- Carvalho, C.P.F., Oliveira, R.B., Britan, A., Santos-Silva, J.C., Boschero, A.C., Meda, P., and Collares-Buzato, C.B. (2012). Impaired β -cell- β -cell coupling mediated by Cx36 gap junctions in prediabetic mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* *303*, E144–51.
- Castan-Laurell, I., Dray, C., Attané, C., Duparc, T., Knauf, C., and Valet, P. (2011). Apelin, diabetes, and obesity. *Endocrine* *40*, 1–9.
- Castro, M.A., Angulo, C., Brauchi, S., Nualart, F., and Concha, I.I. (2008). Ascorbic acid participates in a general mechanism for concerted glucose transport inhibition and lactate transport stimulation. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology* *457*, 519–528.
- Castro, M.A., Pozo, M., Cortés, C., García, M. de L.A., Concha, I.I., and Nualart, F. (2007). Intracellular ascorbic acid inhibits transport of glucose by neurons, but not by astrocytes. *Journal of Neurochemistry* *102*, 773–782.
- Cha, S.H., and Lane, M.D. (2009). Central lactate metabolism suppresses food intake via the hypothalamic AMP kinase/malonyl-CoA signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *386*, 212–216.
- Cha, S.H., Wolfgang, M., Tokutake, Y., Chohnan, S., and Lane, M.D. (2008). Differential effects of central fructose and glucose on hypothalamic malonyl-CoA and food intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 16871–16875.
- Chakravarthy, M. V, Zhu, Y., López, M., Yin, L., Wozniak, D.F., Coleman, T., Hu, Z., Wolfgang, M., Vidal-Puig, A., Lane, M.D., et al. (2007). Brain fatty acid synthase activates PPAR α to maintain energy homeostasis. *The Journal of Clinical Investigation* *117*, 2539–2552.
- Chang, G.-Q., Karatayev, O., Davydova, Z., and Leibowitz, S.F. (2004). Circulating triglycerides impact on orexigenic peptides and neuronal activity in hypothalamus. *Endocrinology* *145*, 3904–3912.
- Chari, M., Yang, C.S., Lam, C.K.L., Lee, K., Mighiu, P., Kokorovic, A., Cheung, G.W.C., Lai, T.Y.Y., Wang, P.Y.T., and Lam, T.K.T. (2011). Glucose transporter-1 in the hypothalamic glial cells mediates glucose sensing to regulate glucose production in vivo. *Diabetes* *60*, 1901–1906.
- Chen, A.S., Marsh, D.J., Trumbauer, M.E., Frazier, E.G., Guan, X.M., Yu, H., Rosenblum, C.I., Vongs, A., Feng, Y., Cao, L., et al. (2000). Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nature Genetics* *26*, 97–102.
- Cheung, C.C., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (1997). Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* *138*, 4489–4492.
- Chiry, O., Fishbein, W.N., Merezhinskaya, N., Clarke, S., Galuske, R., Magistretti, P.J., and Pellerin, L. (2008). Distribution of the monocarboxylate transporter MCT2 in human cerebral cortex: an immunohistochemical study. *Brain Research* *1226*, 61–69.
- Chung, S., Parks, G.S., Lee, C., and Civelli, O. (2011). Recent updates on the melanin-concentrating hormone (MCH) and its receptor system: lessons from MCH1R antagonists. *Journal of Molecular Neuroscience : MN* *43*, 115–121.
- Chuquet, J., Quilichini, P., Nimchinsky, E. a, and Buzsáki, G. (2010). Predominant enhancement of glucose uptake in astrocytes versus neurons during activation of the somatosensory cortex. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* *30*, 15298–15303.
- Ciofi, P. (2011). The arcuate nucleus as a circumventricular organ in the mouse. *Neuroscience Letters* *487*, 187–190.

- Ciofi, P., Garret, M., Lapirot, O., Lafon, P., Loyens, A., Prévot, V., and Levine, J.E. (2009). Brain-endocrine interactions: a microvascular route in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* *150*, 5509–5519.
- Claret, M., Smith, M.A., Batterham, R.L., Selman, C., Choudhury, A.I., Fryer, L.G.D., Clements, M., Al-Qassab, H., Heffron, H., Xu, A.W., et al. (2007). AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *The Journal of Clinical Investigation* *117*, 2325–2336.
- Clément, L., Cruciani-Guglielmacci, C., Magnan, C., Vincent, M., Douared, L., Orosco, M., Assimacopoulos-Jeannet, F., Pénicaud, L., and Ktorza, A. (2002). Intracerebroventricular infusion of a triglyceride emulsion leads to both altered insulin secretion and hepatic glucose production in rats. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology* *445*, 375–380.
- Colombani, A.-L., Carneiro, L., Benani, A., Galinier, A., Jaillard, T., Duparc, T., Lorsignol, A., Magnan, C., Casteilla, L., and Saba, P. (2009). Enhanced Hypothalamic Glucose Sensing in Obesity: Alteration of Redox Signaling. *Diabetes* *58*, 2189–2197.
- Cone, R.D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature Neuroscience* *8*, 571–578.
- Cone, R.D., Cowley, M. a, Butler, a a, Fan, W., Marks, D.L., and Low, M.J. (2001). The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders : Journal of the International Association for the Study of Obesity* *25 Suppl 5*, S63–7.
- Contreras, R.J., Beckstead, R.M., and Norgren, R. (1982). The central projections of the trigeminal, facial, glossopharyngeal and vagus nerves: an autoradiographic study in the rat. *Journal of the Autonomic Nervous System* *6*, 303–322.
- Corssmit, E.P., Romijn, J. a, and Sauerwein, H.P. (2001). Review article: Regulation of glucose production with special attention to nonclassical regulatory mechanisms: a review. *Metabolism: Clinical and Experimental* *50*, 742–755.
- Cortés-Campos, C., Elizondo, R., Llanos, P., Uranga, R.M., Nualart, F., and García, M.A. (2011). MCT expression and lactate influx/efflux in tanycytes involved in glia-neuron metabolic interaction. *PloS One* *6*, e16411.
- Cota, D., Proulx, K., Smith, K. a B., Kozma, S.C., Thomas, G., Woods, S.C., and Seeley, R.J. (2006). Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science (New York, N.Y.)* *312*, 927–930.
- Cowley, M. a, Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdán, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., and Low, M.J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* *411*, 480–484.
- Cowley, M. a, Smith, R.G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K.L., Strasburger, C.J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M.L., et al. (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* *37*, 649–661.
- Cruciani-Guglielmacci, C., Hervalet, A., Douared, L., Sanders, N.M., Levin, B.E., Ktorza, A., and Magnan, C. (2004). Beta oxidation in the brain is required for the effects of non-esterified fatty acids on glucose-induced insulin secretion in rats. *Diabetologia* *47*, 2032–2038.
- Cruciani-Guglielmacci, C., Vincent-Lamon, M., Rouch, C., Orosco, M., Ktorza, A., and Magnan, C. (2005). Early changes in insulin secretion and action induced by high-fat diet are related to a decreased sympathetic tone. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* *288*, E148–54.

- Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., Schmidova, K., Wisse, B.E., and Weigle, D.S. (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* *50*, 1714–1719.
- Dale, N. (2011). Purinergic signaling in hypothalamic tanycytes: potential roles in chemosensing. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *22*, 237–244.
- Dallaporta, M., Himmi, T., Perrin, J., and Orsini, J.C. (1999). Solitary tract nucleus sensitivity to moderate changes in glucose level. *Neuroreport* *10*, 2657–2660.
- Davis, J.D., Wirtshafter, D., Asin, K.E., and Brief, D. (1981). Sustained intracerebroventricular infusion of brain fuels reduces body weight and food intake in rats. *Science (New York, N.Y.)* *212*, 81–83.
- Delaere, F., Magnan, C., and Mithieux, G. (2010). Hypothalamic integration of portal glucose signals and control of food intake and insulin sensitivity. *Diabetes & Metabolism* *36*, 257–262.
- Dennis, P.B., Jaeschke, A., Saitoh, M., Fowler, B., Kozma, S.C., and Thomas, G. (2001). Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science (New York, N.Y.)* *294*, 1102–1105.
- Dhillon, H., Zigman, J.M., Ye, C., Lee, C.E., McGovern, R. a, Tang, V., Kenny, C.D., Christiansen, L.M., White, R.D., Edelstein, E. a, et al. (2006). Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron* *49*, 191–203.
- Diano, S., and Horvath, T.L. (2012). Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in glucose and lipid metabolism. *Trends in Molecular Medicine* *18*, 52–58.
- Diano, S., Liu, Z.-W., Jeong, J.K., Dietrich, M.O., Ruan, H.-B., Kim, E., Suyama, S., Kelly, K., Gyengesi, E., Arbiser, J.L., et al. (2011). Peroxisome proliferation-associated control of reactive oxygen species sets melanocortin tone and feeding in diet-induced obesity. *Nature Medicine* *17*, 1121–1127.
- Dringen, R., Pfeiffer, B., and Hamprecht, B. (1999). Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* *19*, 562–569.
- Dunn-Meynell, A.A., Rawson, N.E., and Levin, B.E. (1998). Distribution and phenotype of neurons containing the ATP-sensitive K⁺ channel in rat brain. *Brain Research* *814*, 41–54.
- Dunn-Meynell, A.A., Routh, V.H., Kang, L., Gaspers, L., and Levin, B.E. (2002). Glucokinase is the likely mediator of glucosensing in both glucose-excited and glucose-inhibited central neurons. *Diabetes* *51*, 2056–2065.
- Dunn-Meynell, A.A., Sanders, N.M., Compton, D., Becker, T.C., Eiki, J., Zhang, B.B., and Levin, B.E. (2009). Relationship among brain and blood glucose levels and spontaneous and glucoprivic feeding. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* *29*, 7015–7022.
- Duraffourd, C., De Vadder, F., Goncalves, D., Delaere, F., Penhoat, A., Brusset, B., Rajas, F., Chassard, D., Duchampt, A., Stefanutti, A., et al. (2012). Mu-opioid receptors and dietary protein stimulate a gut-brain neural circuitry limiting food intake. *Cell* *150*, 377–388.
- Ebihara, K., Ogawa, Y., Katsuura, G., Numata, Y., Masuzaki, H., Satoh, N., Tamaki, M., Yoshioka, T., Hayase, M., Matsuoka, N., et al. (1999). Involvement of agouti-related protein, an endogenous antagonist of hypothalamic melanocortin receptor, in leptin action. *Diabetes* *48*, 2028–2033.
- Elias, C.F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R.S., Couceyro, P.R., Kuhar, M.J., Saper, C.B., and Elmquist, J.K. (1998a). Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* *21*, 1375–1385.
- Elias, C.F., Saper, C.B., Maratos-Flier, E., Tritos, N.A., Lee, C., Kelly, J., Tatro, J.B., Hoffman, G.E., Ollmann, M.M., Barsh, G.S., et al. (1998b). Chemically defined projections linking the mediobasal

hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *The Journal of Comparative Neurology* 402, 442–459.

Elias, L.A.B., Wang, D.D., and Kriegstein, A.R. (2007). Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature* 448, 901–907.

Elmqvist, J.K., Bjørbaek, C., Ahima, R.S., Flier, J.S., and Saper, C.B. (1998). Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *The Journal of Comparative Neurology* 395, 535–547.

Emond, M., Schwartz, G.J., Ladenheim, E.E., and Moran, T.H. (1999). Central leptin modulates behavioral and neural responsivity to CCK. *The American Journal of Physiology* 276, R1545–9.

Erickson, J.C., Clegg, K.E., and Palmiter, R.D. (1996). Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature* 381, 415–421.

Ewart, J.L., Cohen, M.F., Meyer, R.A., Huang, G.Y., Wessels, A., Gourdie, R.G., Chin, A.J., Park, S.M., Lazatin, B.O., Villabon, S., et al. (1997). Heart and neural tube defects in transgenic mice overexpressing the Cx43 gap junction gene. *Development (Cambridge, England)* 124, 1281–1292.

Fan, W., Boston, B.A., Kesterson, R.A., Hruby, V.J., and Cone, R.D. (1997). Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385, 165–168.

Fekete, C., Légrádi, G., Mihály, E., Huang, Q.H., Tatro, J.B., Rand, W.M., Emerson, C.H., and Lechan, R.M. (2000a). alpha-Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 20, 1550–1558.

Fekete, C., Légrádi, G., Mihály, E., Tatro, J.B., Rand, W.M., and Lechan, R.M. (2000b). alpha-Melanocyte stimulating hormone prevents fasting-induced suppression of corticotropin-releasing hormone gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroscience Letters* 289, 152–156.

Fekete, C., Mihály, E., Luo, L.G., Kelly, J., Clausen, J.T., Mao, Q., Rand, W.M., Moss, L.G., Kuhar, M., Emerson, C.H., et al. (2000c). Association of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive elements with thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and its role in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 20, 9224–9234.

Le Feuvre, R.A., Woods, A.J., Stock, M.J., and Rothwell, N.J. (1991). Effects of central injection of glucose on thermogenesis in normal, VMH-lesioned and genetically obese rats. *Brain Research* 547, 110–114.

Fioramonti, X., Contié, S., Song, Z., Routh, V.H., Lorsignol, A., and Pénicaud, L. (2007). Characterization of glucosensing neuron subpopulations in the arcuate nucleus: integration in neuropeptide Y and pro-opio melanocortin networks? *Diabetes* 56, 1219–1227.

Fioramonti, X., Lorsignol, A., Taupignon, A., and Pénicaud, L. (2004). A new ATP-sensitive K⁺ channel-independent mechanism is involved in glucose-excited neurons of mouse arcuate nucleus. *Diabetes* 53, 2767–2775.

Fioramonti, X., Marsollier, N., Song, Z., Fakira, K.A., Patel, R.M., Brown, S., Duparc, T., Pica-Mendez, A., Sanders, N.M., Knauf, C., et al. (2010). Ventromedial hypothalamic nitric oxide production is necessary for hypoglycemia detection and counterregulation. *Diabetes* 59, 519–528.

La Fleur, S.E. (2006). The effects of glucocorticoids on feeding behavior in rats. *Physiology & Behavior* 89, 110–114.

- Fox, P.T., and Raichle, M.E. (1986). Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *83*, 1140–1144.
- Fox, P.T., Raichle, M.E., Mintun, M.A., and Dence, C. (1988). Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity. *Science (New York, N.Y.)* *241*, 462–464.
- Frayling, C., Britton, R., and Dale, N. (2011). ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanycytes. *The Journal of Physiology* *589*, 2275–2286.
- Freedman, M.R., Horwitz, B.A., and Stern, J.S. (1986). Effect of adrenalectomy and glucocorticoid replacement on development of obesity. *The American Journal of Physiology* *250*, R595–607.
- Fukaya, M., Mizuno, A., Arai, H., Muto, K., Uebanso, T., Matsuo, K., Yamamoto, H., Taketani, Y., Doi, T., and Takeda, E. (2007). Mechanism of rapid-phase insulin response to elevation of portal glucose concentration. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* *293*, E515–22.
- Fukuda, H., Hirakawa, T., and Iritani, N. (2007). Nutritional and hormonal regulation of uncoupling protein gene expression in rat adipocytes. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* *53*, 426–431.
- Gaietta, G., Deerinck, T.J., Adams, S.R., Bouwer, J., Tour, O., Laird, D.W., Sosinsky, G.E., Tsien, R.Y., and Ellisman, M.H. (2002). Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science (New York, N.Y.)* *296*, 503–507.
- Gandhi, G.K., Ball, K.K., Cruz, N.F., and Dienel, G. a (2010). Hyperglycaemia and diabetes impair gap junctional communication among astrocytes. *ASN Neuro* *2*, e00030.
- García, M.A., Millán, C., Balmaceda-Aguilera, C., Castro, T., Pastor, P., Montecinos, H., Reinicke, K., Zúñiga, F., Vera, J.C., Oñate, S.A., et al. (2003). Hypothalamic ependymal-glia cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *Journal of Neurochemistry* *86*, 709–724.
- García-Cáceres, C., Fuente-Martín, E., Burgos-Ramos, E., Granado, M., Frago, L.M., Barrios, V., Horvath, T.L., Argente, J., and Chowen, J. a (2011). Differential acute and chronic effects of leptin on hypothalamic astrocyte morphology and synaptic protein levels. *Endocrinology* *152*, 1809–1818.
- García-Fernández, M., Ortega-Sáenz, P., Castellano, A., and López-Barneo, J. (2007). Mechanisms of low-glucose sensitivity in carotid body glomus cells. *Diabetes* *56*, 2893–2900.
- German, J., Kim, F., Schwartz, G.J., Havel, P.J., Rhodes, C.J., Schwartz, M.W., and Morton, G.J. (2009). Hypothalamic leptin signaling regulates hepatic insulin sensitivity via a neurocircuit involving the vagus nerve. *Endocrinology* *150*, 4502–4511.
- Ghamari-Langroudi, M. (2012). *Electrophysiological Analysis of Circuits Controlling Energy Homeostasis*. *Molecular Neurobiology*.
- Ghamari-Langroudi, M., Vella, K.R., Srisai, D., Sugrue, M.L., Hollenberg, A.N., and Cone, R.D. (2010). Regulation of thyrotropin-releasing hormone-expressing neurons in paraventricular nucleus of the hypothalamus by signals of adiposity. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* *24*, 2366–2381.
- Giaume, C., Koulakoff, A., Roux, L., Holcman, D., and Rouach, N. (2010). Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nature Reviews. Neuroscience* *11*, 87–99.
- Gibson, E.L., Wainwright, C.J., and Booth, D.A. (1995). Disguised protein in lunch after low-protein breakfast conditions food-flavor preferences dependent on recent lack of protein intake. *Physiology & Behavior* *58*, 363–371.

- Gietzen, D.W. (1993). Neural mechanisms in the responses to amino acid deficiency. *The Journal of Nutrition* *123*, 610–625.
- Del Giudice, E.M., Santoro, N., Cirillo, G., D'Urso, L., Di Toro, R., and Perrone, L. (2001). Mutational screening of the CART gene in obese children: identifying a mutation (Leu34Phe) associated with reduced resting energy expenditure and cosegregating with obesity phenotype in a large family. *Diabetes* *50*, 2157–2160.
- Godar, R., Dai, Y., Bainter, H., Billington, C., Kotz, C.M., and Wang, C.F. (2011). Reduction of high-fat diet-induced obesity after chronic administration of brain-derived neurotrophic factor in the hypothalamic ventromedial nucleus. *Neuroscience* *194*, 36–52.
- González, J.A., Reimann, F., and Burdakov, D. (2009). Dissociation between sensing and metabolism of glucose in sugar sensing neurones. *The Journal of Physiology* *587*, 41–48.
- González, D., Gómez-Hernández, J.M., and Barrio, L.C. (2007). Molecular basis of voltage dependence of connexin channels: an integrative appraisal. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* *94*, 66–106.
- González, J.A., Jensen, L.T., Fugger, L., and Burdakov, D. (2008). Metabolism-independent sugar sensing in central orexin neurons. *Diabetes* *57*, 2569–2576.
- González-Sánchez, J.L., and Serrano-Ríos, M. (2007). Molecular basis of insulin action. *Drug News & Perspectives* *20*, 527–531.
- Goodman, R.L., Lehman, M.N., Smith, J.T., Coolen, L.M., De Oliveira, C.V.R., Jafarzadehshirazi, M.R., Pereira, A., Iqbal, J., Caraty, A., Ciofi, P., et al. (2007). Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* *148*, 5752–5760.
- Gordon, G.R.J., Choi, H.B., Rungta, R.L., Ellis-Davies, G.C.R., and MacVicar, B.A. (2008). Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature* *456*, 745–749.
- Gosnell, B.A., Morley, J.E., and Levine, A.S. (1983). A comparison of the effects of corticotropin releasing factor and sauvagine on food intake. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* *19*, 771–775.
- Granata, R., Baragli, A., Settanni, F., Scarlatti, F., and Ghigo, E. (2010). Unraveling the role of the ghrelin gene peptides in the endocrine pancreas. *Journal of Molecular Endocrinology* *45*, 107–118.
- Grill, H.J., Ginsberg, A.B., Seeley, R.J., and Kaplan, J.M. (1998). Brainstem application of melanocortin receptor ligands produces long-lasting effects on feeding and body weight. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* *18*, 10128–10135.
- Grill, H.J., and Hayes, M.R. (2009). The nucleus tractus solitarius: a portal for visceral afferent signal processing, energy status assessment and integration of their combined effects on food intake. *International Journal of Obesity (2005)* *33 Suppl 1*, S11–5.
- Grill, H.J., Schwartz, M.W., Kaplan, J.M., Foxhall, J.S., Breininger, J., and Baskin, D.G. (2002). Evidence that the caudal brainstem is a target for the inhibitory effect of leptin on food intake. *Endocrinology* *143*, 239–246.
- Gross, P.M., Wall, K.M., Pang, J.J., Shaver, S.W., and Wainman, D.S. (1990). Microvascular specializations promoting rapid interstitial solute dispersion in nucleus tractus solitarius. *The American Journal of Physiology* *259*, R1131–8.
- Guillaume-Gentil, C., Rohner-Jeanrenaud, F., Abramo, F., Bestetti, G.E., Rossi, G.L., and Jeanrenaud, B. (1990). Abnormal regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the genetically obese fa/fa rat. *Endocrinology* *126*, 1873–1879.

- Guillod-Maximin, E., Lorsignol, A., Alquier, T., and Pénicaud, L. (2004). Acute intracarotid glucose injection towards the brain induces specific c-fos activation in hypothalamic nuclei: involvement of astrocytes in cerebral glucose-sensing in rats. *Journal of Neuroendocrinology* *16*, 464–471.
- Guthrie, P.B., Knappenberger, J., Segal, M., Bennett, M. V, Charles, a C., and Kater, S.B. (1999). ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* *19*, 520–528.
- Hahn, T.M., Breininger, J.F., Baskin, D.G., and Schwartz, M.W. (1998). Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature Neuroscience* *1*, 271–272.
- Halaas, J.L., Boozer, C., Blair-West, J., Fidahusein, N., Denton, D. a, and Friedman, J.M. (1997). Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 8878–8883.
- Hara, J., Beuckmann, C.T., Nambu, T., Willie, J.T., Chemelli, R.M., Sinton, C.M., Sugiyama, F., Yagami, K., Goto, K., Yanagisawa, M., et al. (2001). Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* *30*, 345–354.
- Hardie, D.G., and Carling, D. (1997). The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *European Journal of Biochemistry / FEBS* *246*, 259–273.
- Harris, A.L. (2007). Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* *94*, 120–143.
- Harrold, J. a, Dovey, T.M., Blundell, J.E., and Halford, J.C.G. (2012). CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology* *63*,
- Hassouna, R., Zizzari, P., and Tolle, V. (2010). The ghrelin/obestatin balance in the physiological and pathological control of growth hormone secretion, body composition and food intake. *Journal of Neuroendocrinology* *22*, 793–804.
- He, W., Lam, T.K.T., Obici, S., and Rossetti, L. (2006). Molecular disruption of hypothalamic nutrient sensing induces obesity. *Nature Neuroscience* *9*, 227–233.
- Head, W.S., Orseth, M.L., Nunemaker, C.S., Satin, L.S., Piston, D.W., and Benninger, R.K.P. (2012). Connexin-36 gap junctions regulate in vivo first- and second-phase insulin secretion dynamics and glucose tolerance in the conscious mouse. *Diabetes* *61*, 1700–1707.
- Heinrichs, S.C., Menzaghi, F., Pich, E.M., Hauger, R.L., and Koob, G.F. (1993). Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuropeptide Y. *Brain Research* *611*, 18–24.
- Herrero-Mendez, A., Almeida, A., Fernández, E., Maestre, C., Moncada, S., and Bolaños, J.P. (2009). The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nature Cell Biology* *11*, 747–752.
- Hetherington, A.W., and Ranson, S.W. (1940). Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *The Anatomical Record* *78*, 149–172.
- Hevener, A.L., Bergman, R.N., and Donovan, C.M. (2001). Hypoglycemic detection does not occur in the hepatic artery or liver: findings consistent with a portal vein glucosensor locus. *Diabetes* *50*, 399–403.
- Hill, J.W., Williams, K.W., Ye, C., Luo, J., Balthasar, N., Coppari, R., Cowley, M.A., Cantley, L.C., Lowell, B.B., and Elmquist, J.K. (2008). Acute effects of leptin require PI3K signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons in mice. *The Journal of Clinical Investigation* *118*, 1796–1805.
- Horvath, T.L. (2006). Synaptic plasticity in energy balance regulation. *Obesity (Silver Spring, Md.)* *14 Suppl 5*, 228S–233S.

- Horvath, T.L., Andrews, Z.B., and Diano, S. (2009). Fuel utilization by hypothalamic neurons: roles for ROS. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 20, 78–87.
- Horvath, T.L., Sarman, B., García-Cáceres, C., Enriori, P.J., Sotonyi, P., Shanabrough, M., Borok, E., Argente, J., Chowen, J. a, Perez-Tilve, D., et al. (2010). Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 14875–14880.
- Huszar, D., Lynch, C.A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Berkemeier, L.R., Gu, W., Kesterson, R.A., Boston, B.A., Cone, R.D., et al. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88, 131–141.
- Hyde, T.M., and Miselis, R.R. (1983). Effects of area postrema/caudal medial nucleus of solitary tract lesions on food intake and body weight. *The American Journal of Physiology* 244, R577–87.
- Ibrahim, N. (2003). Hypothalamic Proopiomelanocortin Neurons Are Glucose Responsive and Express KATP Channels. *Endocrinology* 144, 1331–1340.
- Inoguchi, T., Yu, H.Y., Imamura, M., Kakimoto, M., Kuroki, T., Maruyama, T., and Nawata, H. (2001). Altered gap junction activity in cardiovascular tissues of diabetes. *Medical Electron Microscopy : Official Journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan* 34, 86–91.
- Itoh, Y., Esaki, T., Shimoji, K., Cook, M., Law, M.J., Kaufman, E., and Sokoloff, L. (2003). Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4879–4884.
- Ivanov, A., Mukhtarov, M., Bregestovski, P., and Zilberter, Y. (2011). Lactate Effectively Covers Energy Demands during Neuronal Network Activity in Neonatal Hippocampal Slices. *Frontiers in Neuroenergetics* 3, 2.
- Jansen, A.S., Hoffman, J.L., and Loewy, A.D. (1997). CNS sites involved in sympathetic and parasympathetic control of the pancreas: a viral tracing study. *Brain Research* 766, 29–38.
- Jeanneteau, F.D., Lambert, W.M., Ismaili, N., Bath, K.G., Lee, F.S., Garabedian, M.J., and Chao, M. V (2012). BDNF and glucocorticoids regulate corticotrophin-releasing hormone (CRH) homeostasis in the hypothalamus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 1305–1310.
- Jetton, T.L., Liang, Y., Pettepher, C.C., Zimmerman, E.C., Cox, F.G., Horvath, K., Matschinsky, F.M., and Magnuson, M.A. (1994). Analysis of upstream glucokinase promoter activity in transgenic mice and identification of glucokinase in rare neuroendocrine cells in the brain and gut. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 3641–3654.
- Jo, Y., Su, Y., Gutierrez-Juarez, R., and Chua, S. (2009). Oleic acid directly regulates POMC neuron excitability in the hypothalamus. *Journal of Neurophysiology* 101, 2305–2316.
- Jobst, E.E., Enriori, P.J., and Cowley, M. a (2004). The electrophysiology of feeding circuits. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 15, 488–499.
- Jordan, K., Chodock, R., Hand, A.R., and Laird, D.W. (2001). The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization. *Journal of Cell Science* 114, 763–773.
- Kardami, E., Dang, X., Iacobas, D.A., Nickel, B.E., Jeyaraman, M., Srisakuldee, W., Makazan, J., Tanguy, S., and Spray, D.C. (2007). The role of connexins in controlling cell growth and gene expression. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 94, 245–264.
- Karnani, M., and Burdakov, D. (2011). Multiple hypothalamic circuits sense and regulate glucose levels. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 300, R47–55.

- Karnani, M.M., Apergis-Schoute, J., Adamantidis, A., Jensen, L.T., De Lecea, L., Fugger, L., and Burdakov, D. (2011). Activation of Central Orexin/Hypocretin Neurons by Dietary Amino Acids. *Neuron* 72, 616–629.
- Kim, E.-K., Miller, I., Aja, S., Landree, L.E., Pinn, M., McFadden, J., Kuhajda, F.P., Moran, T.H., and Ronnett, G. V (2004). C75, a fatty acid synthase inhibitor, reduces food intake via hypothalamic AMP-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 19970–19976.
- De Kloet, E.R., Joëls, M., and Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews. Neuroscience* 6, 463–475.
- Klößener, T., Hess, S., Belgardt, B.F., Paeger, L., Verhagen, L. a W., Husch, A., Sohn, J.-W., Hampel, B., Dhillon, H., Zigman, J.M., et al. (2011). High-fat feeding promotes obesity via insulin receptor/PI3K-dependent inhibition of SF-1 VMH neurons. *Nature Neuroscience* 14, 911–918.
- Knot, H.J., Zimmermann, P.A., and Nelson, M.T. (1996). Extracellular K(+)-induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K(+) channels. *The Journal of Physiology* 492 (Pt 2, 419–430.
- Koch, C., Augustine, R.A., Steger, J., Ganjam, G.K., Benzler, J., Pracht, C., Lowe, C., Schwartz, M.W., Shepherd, P.R., Anderson, G.M., et al. (2010). Leptin rapidly improves glucose homeostasis in obese mice by increasing hypothalamic insulin sensitivity. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 30, 16180–16187.
- Kohno, D., Sone, H., Tanaka, S., Kurita, H., Gantulga, D., and Yada, T. (2011). AMP-activated protein kinase activates neuropeptide Y neurons in the hypothalamic arcuate nucleus to increase food intake in rats. *Neuroscience Letters* 499, 194–198.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656–660.
- Kokorovic, A., Cheung, G.W.C., Rossetti, L., and Lam, T.K.T. (2009). Hypothalamic sensing of circulating lactate regulates glucose production. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13, 4403–4408.
- Kong, D., Vong, L., Parton, L.E., Ye, C., Tong, Q., Hu, X., Choi, B., Brüning, J.C., and Lowell, B.B. (2010). Glucose stimulation of hypothalamic MCH neurons involves K(ATP) channels, is modulated by UCP2, and regulates peripheral glucose homeostasis. *Cell Metabolism* 12, 545–552.
- Koulakoff, A., Ezan, P., and Giaume, C. (2008). Neurons control the expression of connexin 30 and connexin 43 in mouse cortical astrocytes. *Glia* 56, 1299–1311.
- Koyama, Y., Coker, R.H., Stone, E.E., Lacy, D.B., Jabbour, K., Williams, P.E., and Wasserman, D.H. (2000). Evidence that carotid bodies play an important role in glucoregulation in vivo. *Diabetes* 49, 1434–1442.
- Koylu, E.O., Couceyro, P.R., Lambert, P.D., and Kuhar, M.J. (1998). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain. *The Journal of Comparative Neurology* 391, 115–132.
- Koylu, E.O., Couceyro, P.R., Lambert, P.D., Ling, N.C., DeSouza, E.B., and Kuhar, M.J. (1997). Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. *Journal of Neuroendocrinology* 9, 823–833.
- Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K.N., Wulff, B.S., Clausen, J.T., Jensen, P.B., Madsen, O.D., Vrang, N., et al. (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393, 72–76.
- Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G., and Grüters, A. (1998). Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nature Genetics* 19, 155–157.

- Kunze, A., Congreso, M.R., Hartmann, C., Wallraff-Beck, A., Hüttmann, K., Bedner, P., Requardt, R., Seifert, G., Redecker, C., Willecke, K., et al. (2009). Connexin expression by radial glia-like cells is required for neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 11336–11341.
- Kurata, K., Fujimoto, K., Sakata, T., Etou, H., and Fukagawa, K. (1986). D-glucose suppression of eating after intra-third ventricle infusion in rat. *Physiology & Behavior* *37*, 615–620.
- Könner, a C., Janoschek, R., Plum, L., Jordan, S.D., Rother, E., Ma, X., Xu, C., Enriori, P., Hampel, B., Barsh, G.S., et al. (2007). Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell Metabolism* *5*, 438–449.
- Laird, D.W. (2005). Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. *Biochimica Et Biophysica Acta* *1711*, 172–182.
- Laird, D.W. (2006). Life cycle of connexins in health and disease. *The Biochemical Journal* *394*, 527–543.
- Lam, C.K.L., Chari, M., Wang, P.Y.T., and Lam, T.K.T. (2008). Central lactate metabolism regulates food intake. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* *295*, E491–6.
- Lam, T.K.T., Gutierrez-Juarez, R., Pocai, A., and Rossetti, L. (2005a). Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. *Science (New York, N.Y.)* *309*, 943–947.
- Lam, T.K.T., Pocai, A., Gutierrez-Juarez, R., Obici, S., Bryan, J., Aguilar-Bryan, L., Schwartz, G.J., and Rossetti, L. (2005b). Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis. *Nature Medicine* *11*, 320–327.
- Lam, T.K.T., Schwartz, G.J., and Rossetti, L. (2005c). Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nature Neuroscience* *8*, 579–584.
- Lauf, U., Giepmans, B.N.G., Lopez, P., Braconnot, S., Chen, S.-C., and Falk, M.M. (2002). Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 10446–10451.
- Laughton, J.D., Bittar, P., Charnay, Y., Pellerin, L., Kovari, E., Magistretti, P.J., and Bouras, C. (2007). Metabolic compartmentalization in the human cortex and hippocampus: evidence for a cell- and region-specific localization of lactate dehydrogenase 5 and pyruvate dehydrogenase. *BMC Neuroscience* *8*, 35.
- De Lecea, L., Kilduff, T.S., Peyron, C., Gao, X., Foye, P.E., Danielson, P.E., Fukuhara, C., Battenberg, E.L., Gautvik, V.T., Bartlett, F.S., et al. (1998). The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 322–327.
- Lee, K., Dixon, A.K., Richardson, P.J., and Pinnock, R.D. (1999). Glucose-receptive neurones in the rat ventromedial hypothalamus express KATP channels composed of Kir6.1 and SUR1 subunits. *The Journal of Physiology* *515 (Pt 2)*, 439–452.
- Leloup, C., Arluison, M., Kassis, N., Lepetit, N., Cartier, N., Ferré, P., and Pénicaud, L. (1996). Discrete brain areas express the insulin-responsive glucose transporter GLUT4. *Brain Research. Molecular Brain Research* *38*, 45–53.
- Leloup, C., Arluison, M., Lepetit, N., Cartier, N., Marfaing-Jallat, P., Ferré, P., and Pénicaud, L. (1994). Glucose transporter 2 (GLUT 2): expression in specific brain nuclei. *Brain Research* *638*, 221–226.
- Leloup, C., Casteilla, L., Carrière, A., Galinier, A., Benani, A., Carneiro, L., and Pénicaud, L. (2011). Balancing mitochondrial redox signaling: a key point in metabolic regulation. *Antioxidants & Redox Signaling* *14*, 519–530.

- Leloup, C., Magnan, C., Benani, A., Bonnet, E., Alquier, T., Offer, G., Carriere, A., Périquet, A., Fernandez, Y., Ktorza, A., et al. (2006). Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing. *Diabetes* 55, 2084–2090.
- Leloup, C., Orosco, M., Serradas, P., Nicolaidis, S., and Pénicaud, L. (1998). Specific inhibition of GLUT2 in arcuate nucleus by antisense oligonucleotides suppresses nervous control of insulin secretion. *Brain Research. Molecular Brain Research* 57, 275–280.
- Levin, B.E., and Sullivan, A.C. (1987). Glucose, insulin and sympathoadrenal activation. *Journal of the Autonomic Nervous System* 20, 233–242.
- Liddell, J.R., Zwingmann, C., Schmidt, M.M., Thiessen, A., Leibfritz, D., Robinson, S.R., and Dringen, R. (2009). Sustained hydrogen peroxide stress decreases lactate production by cultured astrocytes. *Journal of Neuroscience Research* 87, 2696–2708.
- Lin, S., Boey, D., and Herzog, H. (2004). NPY and Y receptors: lessons from transgenic and knockout models. *Neuropeptides* 38, 189–200.
- Lind, R.W., Van Hoesen, G.W., and Johnson, A.K. (1982). An HRP study of the connections of the subfornical organ of the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 210, 265–277.
- Liu, M., Seino, S., and Kirchgessner, A.L. (1999). Identification and characterization of glucoresponsive neurons in the enteric nervous system. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 19, 10305–10317.
- Loaiza, A., Porrás, O.H., and Barros, L.F. (2003). Glutamate triggers rapid glucose transport stimulation in astrocytes as evidenced by real-time confocal microscopy. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 23, 7337–7342.
- Loftus, T.M., Jaworsky, D.E., Frehywot, G.L., Townsend, C.A., Ronnett, G. V, Lane, M.D., and Kuhajda, F.P. (2000). Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science (New York, N.Y.)* 288, 2379–2381.
- Louis-Sylvestre, J., and Le Magnen, J. (1980). Fall in blood glucose level precedes meal onset in free-feeding rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 4 *Suppl 1*, 13–15.
- Lu, D., Willard, D., Patel, I.R., Kadwell, S., Overton, L., Kost, T., Luther, M., Chen, W., Woychik, R.P., and Wilkison, W.O. (1994). Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 371, 799–802.
- Lu, X.-Y., Barsh, G.S., Akil, H., and Watson, S.J. (2003). Interaction between alpha-melanocyte-stimulating hormone and corticotropin-releasing hormone in the regulation of feeding and hypothalamo-pituitary-adrenal responses. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 23, 7863–7872.
- Luckman, S.M., and Lawrence, C.B. (2003). Anorectic brainstem peptides: more pieces to the puzzle. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 14, 60–65.
- Luiten, P.G., Ter Horst, G.J., and Steffens, A.B. (1987). The hypothalamus, intrinsic connections and outflow pathways to the endocrine system in relation to the control of feeding and metabolism. *Progress in Neurobiology* 28, 1–54.
- Luquet, S., Perez, F. a, Hnasko, T.S., and Palmiter, R.D. (2005). NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science (New York, N.Y.)* 310, 683–685.
- Lynch, R.M., Tompkins, L.S., Brooks, H.L., Dunn-Meynell, A.A., and Levin, B.E. (2000). Localization of glucokinase gene expression in the rat brain. *Diabetes* 49, 693–700.
- Lynn, B.D., Tress, O., May, D., Willecke, K., and Nagy, J.I. (2011). Ablation of connexin30 in transgenic mice alters expression patterns of connexin26 and connexin32 in glial cells and leptomeninges. *The European Journal of Neuroscience* 34, 1783–1793.

- Légrádi, G., and Lechan, R.M. (1999). Agouti-related protein containing nerve terminals innervate thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* *140*, 3643–3652.
- López, M., Lage, R., Saha, A.K., Pérez-Tilve, D., Vázquez, M.J., Varela, L., Sangiao-Alvarellos, S., Tovar, S., Raghay, K., Rodríguez-Cuenca, S., et al. (2008). Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metabolism* *7*, 389–399.
- López-Barneo, J. (2003). Oxygen and glucose sensing by carotid body glomus cells. *Current Opinion in Neurobiology* *13*, 493–499.
- Ma, X., Zubcevic, L., Brüning, J.C., Ashcroft, F.M., and Burdakov, D. (2007). Electrical inhibition of identified anorexigenic POMC neurons by orexin/hypocretin. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* *27*, 1529–1533.
- MacKenzie, R.G. (2006). Obesity-associated mutations in the human melanocortin-4 receptor gene. *Peptides* *27*, 395–403.
- Magistretti, P.J., Morrison, J.H., Shoemaker, W.J., Sapin, V., and Bloom, F.E. (1981). Vasoactive intestinal polypeptide induces glycogenolysis in mouse cortical slices: a possible regulatory mechanism for the local control of energy metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *78*, 6535–6539.
- Magnan, C., Collins, S., Berthault, M.F., Kassis, N., Vincent, M., Gilbert, M., Pénicaud, L., Ktorza, A., and Assimacopoulos-Jeannet, F. (1999). Lipid infusion lowers sympathetic nervous activity and leads to increased beta-cell responsiveness to glucose. *The Journal of Clinical Investigation* *103*, 413–419.
- Majdic, G., Young, M., Gomez-Sanchez, E., Anderson, P., Szczepaniak, L.S., Dobbins, R.L., McGarry, J.D., and Parker, K.L. (2002). Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology* *143*, 607–614.
- Maniam, J., and Morris, M.J. (2012). The link between stress and feeding behaviour. *Neuropharmacology* *63*, 97–110.
- Marino, J.S., Xu, Y., and Hill, J.W. (2011). Central insulin and leptin-mediated autonomic control of glucose homeostasis. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* *22*, 275–285.
- Markowitz, C.E., Berkowitz, K.M., Jaffe, S.B., and Wardlaw, S.L. (1992). Effect of opioid receptor antagonism on proopiomelanocortin peptide levels and gene expression in the hypothalamus. *Molecular and Cellular Neurosciences* *3*, 184–190.
- Marks, J.L., Porte, D., Stahl, W.L., and Baskin, D.G. (1990). Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* *127*, 3234–3236.
- Marty, N., Dallaporta, M., Foretz, M., Emery, M., Tarussio, D., Bady, I., Binnert, C., Beermann, F., and Thorens, B. (2005). Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors. *The Journal of Clinical Investigation* *115*, 3545–3553.
- Marty, N., Dallaporta, M., and Thorens, B. (2007). Brain glucose sensing, counterregulation, and energy homeostasis. *Physiology (Bethesda, Md.)* *22*, 241–251.
- Matsuhisa, M., Yamasaki, Y., Shiba, Y., Nakahara, I., Kuroda, A., Tomita, T., Iida, M., Ikeda, M., Kajimoto, Y., Kubota, M., et al. (2000). Important role of the hepatic vagus nerve in glucose uptake and production by the liver. *Metabolism: Clinical and Experimental* *49*, 11–16.
- Maurin, A.-C., Jousse, C., Averous, J., Parry, L., Bruhat, A., Cherasse, Y., Zeng, H., Zhang, Y., Harding, H.P., Ron, D., et al. (2005). The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores. *Cell Metabolism* *1*, 273–277.
- Mayer, J. (1953). Glucostatic mechanism of regulation of food intake. *The New England Journal of Medicine* *249*, 13–16.

- McCrimmon, R.J., Fan, X., Ding, Y., Zhu, W., Jacob, R.J., and Sherwin, R.S. (2004). Potential role for AMP-activated protein kinase in hypoglycemia sensing in the ventromedial hypothalamus. *Diabetes* 53, 1953–1958.
- McGowan, M.K., Andrews, K.M., and Grossman, S.P. (1992). Chronic intrahypothalamic infusions of insulin or insulin antibodies alter body weight and food intake in the rat. *Physiology & Behavior* 51, 753–766.
- McGowan, M.K., Andrews, K.M., Kelly, J., and Grossman, S.P. (1990). Effects of chronic intrahypothalamic infusion of insulin on food intake and diurnal meal patterning in the rat. *Behavioral Neuroscience* 104, 373–385.
- Medeiros, N., Dai, L., and Ferguson, a V (2012). Glucose-responsive neurons in the subfornical organ of the rat—a novel site for direct CNS monitoring of circulating glucose. *Neuroscience* 201, 157–165.
- Melanson, K.J., Westerterp-Plantenga, M.S., Saris, W.H., Smith, F.J., and Campfield, L.A. (1999). Blood glucose patterns and appetite in time-blinded humans: carbohydrate versus fat. *The American Journal of Physiology* 277, R337–45.
- Mellinkoff, S.M., Frankland, M., Boyle, D., and Greipel, M. (1956). Relationship between serum amino acid concentration and fluctuations in appetite. *Journal of Applied Physiology* 8, 535–538.
- Mercier, F., and Hatton, G.I. (2001). Connexin 26 and basic fibroblast growth factor are expressed primarily in the subpial and subependymal layers in adult brain parenchyma: roles in stem cell proliferation and morphological plasticity? *The Journal of Comparative Neurology* 431, 88–104.
- El Messari, S., Aït-Ikhlef, A., Ambroise, D.H., Pénicaud, L., and Arluison, M. (2002). Expression of insulin-responsive glucose transporter GLUT4 mRNA in the rat brain and spinal cord: an in situ hybridization study. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 24, 225–242.
- Metea, M.R., and Newman, E.A. (2006). Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 26, 2862–2870.
- Migrenne, S., Marsollier, N., Cruciani-Guglielmacci, C., and Magnan, C. (2006). Importance of the gut-brain axis in the control of glucose homeostasis. *Current Opinion in Pharmacology* 6, 592–597.
- Miki, T., Liss, B., Minami, K., Shiuchi, T., Saraya, A., Kashima, Y., Horiuchi, M., Ashcroft, F., Minokoshi, Y., Roeper, J., et al. (2001). ATP-sensitive K⁺ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nature Neuroscience* 4, 507–512.
- Miller, M.W., Duhl, D.M., Vrieling, H., Cordes, S.P., Ollmann, M.M., Winkes, B.M., and Barsh, G.S. (1993). Cloning of the mouse agouti gene predicts a secreted protein ubiquitously expressed in mice carrying the lethal yellow mutation. *Genes & Development* 7, 454–467.
- Millán, C., Martínez, F., Cortés-Campos, C., Lizama, I., Yañez, M.J., Llanos, P., Reinicke, K., Rodríguez, F., Peruzzo, B., Nualart, F., et al. (2010). Glial glucokinase expression in adult and post-natal development of the hypothalamic region. *ASN Neuro* 2, e00035.
- Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y.-B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Fougelle, F., Ferré, P., Birnbaum, M.J., et al. (2004). AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428, 569–574.
- Miselis, R.R., and Epstein, A.N. (1975). Feeding induced by intracerebroventricular 2-deoxy-D-glucose in the rat. *The American Journal of Physiology* 229, 1438–1447.
- Mithieux, G. (2009). A novel function of intestinal gluconeogenesis: central signaling in glucose and energy homeostasis. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 25, 881–884.

- Mithieux, G., Misery, P., Magnan, C., Pillot, B., Gautier-Stein, A., Bernard, C., Rajas, F., and Zitoun, C. (2005). Portal sensing of intestinal gluconeogenesis is a mechanistic link in the diminution of food intake induced by diet protein. *Cell Metabolism* 2, 321–329.
- Morgan, K., Obici, S., and Rossetti, L. (2004). Hypothalamic responses to long-chain fatty acids are nutritionally regulated. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 31139–31148.
- Moriguchi, T., Sakurai, T., Nambu, T., Yanagisawa, M., and Goto, K. (1999). Neurons containing orexin in the lateral hypothalamic area of the adult rat brain are activated by insulin-induced acute hypoglycemia. *Neuroscience Letters* 264, 101–104.
- Morrison, C.D., Morton, G.J., Niswender, K.D., Gelling, R.W., and Schwartz, M.W. (2005). Leptin inhibits hypothalamic Npy and Agrp gene expression via a mechanism that requires phosphatidylinositol 3-OH-kinase signaling. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 289, E1051–7.
- Morrison, C.D., Xi, X., White, C.L., Ye, J., and Martin, R.J. (2007). Amino acids inhibit Agrp gene expression via an mTOR-dependent mechanism. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 293, E165–71.
- Morton, G.J., Gelling, R.W., Niswender, K.D., Morrison, C.D., Rhodes, C.J., and Schwartz, M.W. (2005). Leptin regulates insulin sensitivity via phosphatidylinositol-3-OH kinase signaling in mediobasal hypothalamic neurons. *Cell Metabolism* 2, 411–420.
- Morton, G.J., and Schwartz, M.W. (2011). Leptin and the central nervous system control of glucose metabolism. *Physiological Reviews* 91, 389–411.
- Mounien, L., Bizet, P., Boutelet, I., Vaudry, H., and Jégou, S. (2005). Expression of melanocortin MC3 and MC4 receptor mRNAs by neuropeptide Y neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* 82, 164–170.
- Mountjoy, K.G., Mortrud, M.T., Low, M.J., Simerly, R.B., and Cone, R.D. (1994). Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 8, 1298–1308.
- Mountjoy, P.D., Bailey, S.J., and Rutter, G.A. (2007). Inhibition by glucose or leptin of hypothalamic neurons expressing neuropeptide Y requires changes in AMP-activated protein kinase activity. *Diabetologia* 50, 168–177.
- Mullier, A., Bouret, S.G., Prevot, V., and Dehouck, B. (2010). Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *The Journal of Comparative Neurology* 518, 943–962.
- Mulligan, S.J., and MacVicar, B.A. (2004). Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* 431, 195–199.
- Muroya, S., Yada, T., Shioda, S., and Takigawa, M. (1999). Glucose-sensitive neurons in the rat arcuate nucleus contain neuropeptide Y. *Neuroscience Letters* 264, 113–116.
- Musil, L.S., and Goodenough, D.A. (1991). Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *The Journal of Cell Biology* 115, 1357–1374.
- Márquez-Rosado, L., Solan, J.L., Dunn, C. a, Norris, R.P., and Lampe, P.D. (2011). Connexin43 phosphorylation in brain, cardiac, endothelial and epithelial tissues. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1818, 1–8.
- Nacht, C.A., Christin, L., Temler, E., Chioléro, R., Jéquier, E., and Acheson, K.J. (1987). Thermic effect of food: possible implication of parasympathetic nervous system. *The American Journal of Physiology* 253, E481–8.

- Nagy, J.I., Dudek, F.E., and Rash, J.E. (2004). Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Research. Brain Research Reviews* 47, 191–215.
- Nagy, J.I., Patel, D., Ochalski, P. a, and Stelmack, G.L. (1999). Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance. *Neuroscience* 88, 447–468.
- Naus, C.C., and Laird, D.W. (2010). Implications and challenges of connexin connections to cancer. *Nature Reviews. Cancer* 10, 435–441.
- Newman, L. a, Korol, D.L., and Gold, P.E. (2011). Lactate produced by glycogenolysis in astrocytes regulates memory processing. *PloS One* 6, e28427.
- Ngarmukos, C., Baur, E.L., and Kumagai, A.K. (2001). Co-localization of GLUT1 and GLUT4 in the blood-brain barrier of the rat ventromedial hypothalamus. *Brain Research* 900, 1–8.
- Nguyen, A.D., Mitchell, N.F., Lin, S., Macia, L., Yulyaningsih, E., Baldock, P.A., Enriquez, R.F., Zhang, L., Shi, Y.-C., Zolotukhin, S., et al. (2012). Y1 and y5 receptors are both required for the regulation of food intake and energy homeostasis in mice. *PloS One* 7, e40191.
- Nichols, C.G. (2006). KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* 440, 470–476.
- Nieuwenhuizen, A.G., and Rutters, F. (2008). The hypothalamic-pituitary-adrenal-axis in the regulation of energy balance. *Physiology & Behavior* 94, 169–177.
- Niiijima, A. (1982). Glucose-sensitive afferent nerve fibres in the hepatic branch of the vagus nerve in the guinea-pig. *The Journal of Physiology* 332, 315–323.
- Niiijima, A., and Meguid, M.M. (1995). An electrophysiological study on amino acid sensors in the hepato-portal system in the rat. *Obesity Research* 3 *Suppl* 5, 741S–745S.
- N’Guyen, J.M., Magnan, C., Laury, M.C., Thibault, C., Leveteau, J., Gilbert, M., Pénicaud, L., and Ktorza, A. (1994). Involvement of the autonomic nervous system in the in vivo memory to glucose of pancreatic beta cell in rats. *The Journal of Clinical Investigation* 94, 1456–1462.
- Oberheim, N.A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J.H.C., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J.D., Pilcher, W., Ojemann, J.G., et al. (2009). Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 29, 3276–3287.
- Obici, S., Feng, Z., Arduini, A., Conti, R., and Rossetti, L. (2003). Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. *Nature Medicine* 9, 756–761.
- Obici, S., Feng, Z., Morgan, K., Stein, D., Karkanias, G., and Rossetti, L. (2002a). Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* 51, 271–275.
- Obici, S., Zhang, B.B., Karkanias, G., and Rossetti, L. (2002b). Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nature Medicine* 8, 1376–1382.
- Ollmann, M.M., Wilson, B.D., Yang, Y.K., Kerns, J.A., Chen, Y., Gantz, I., and Barsh, G.S. (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science (New York, N.Y.)* 278, 135–138.
- Oomura, Y., Nakamura, T., Sugimori, M., and Yamada, Y. (1975). Effect of free fatty acid on the rat lateral hypothalamic neurons. *Physiology & Behavior* 14, 483–486.
- Oomura, Y., Ono, T., Ooyama, H., and Wayner, M.J. (1969). Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. *Nature* 222, 282–284.
- Orthmann-Murphy, J.L., Freidin, M., Fischer, E., Scherer, S.S., and Abrams, C.K. (2007). Two distinct heterotypic channels mediate gap junction coupling between astrocyte and

oligodendrocyte connexins. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 27, 13949–13957.

O'Brien, J., Kla, K.M., Hopkins, I.B., Malecki, E. a, and McKenna, M.C. (2007). Kinetic parameters and lactate dehydrogenase isozyme activities support possible lactate utilization by neurons. *Neurochemical Research* 32, 597–607.

O'Malley, D., Reimann, F., Simpson, A.K., and Gribble, F.M. (2006). Sodium-coupled glucose cotransporters contribute to hypothalamic glucose sensing. *Diabetes* 55, 3381–3386.

Paes, A.M.A., Carniatto, S.R., Francisco, F.A., Brito, N.A., and Mathias, P.C.F. (2006). Acetylcholinesterase activity changes on visceral organs of VMH lesion-induced obese rats. *The International Journal of Neuroscience* 116, 1295–1302.

Palkovits, M., Mezey, E., and Eskay, R.L. (1987). Pro-opiomelanocortin-derived peptides (ACTH/beta-endorphin/alpha-MSH) in brainstem baroreceptor areas of the rat. *Brain Research* 436, 323–338.

Pannasch, U., Vargová, L., Reingruber, J., Ezan, P., Holcman, D., Giaume, C., Syková, E., and Rouach, N. (2011). Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 8467–8472.

Pardridge, W.M. (1999). Blood-brain barrier biology and methodology. *Journal of Neurovirology* 5, 556–569.

Parker, R.M., and Herzog, H. (1999). Regional distribution of Y-receptor subtype mRNAs in rat brain. *The European Journal of Neuroscience* 11, 1431–1448.

Parton, L.E., Ye, C.P., Coppari, R., Enriori, P.J., Choi, B., Zhang, C.-Y., Xu, C., Vianna, C.R., Balthasar, N., Lee, C.E., et al. (2007). Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 449, 228–232.

Pellerin, L., Bouzier-Sore, A.-K., Aubert, A., Serres, S., Merle, M., Costalat, R., and Magistretti, P.J. (2007). Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 55, 1251–1262.

Pellerin, L., and Magistretti, P.J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 10625–10629.

Penhoat, A., Mutel, E., Amigo-Correig, M., Pillot, B., Stefanutti, A., Rajas, F., and Mithieux, G. (2011). Protein-induced satiety is abolished in the absence of intestinal gluconeogenesis. *Physiology & Behavior* 105, 89–93.

Peracchia, C. (2004). Chemical gating of gap junction channels; roles of calcium, pH and calmodulin. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1662, 61–80.

Perello, M., Cakir, I., Cyr, N.E., Romero, A., Stuart, R.C., Chiappini, F., Hollenberg, A.N., and Nilni, E.A. (2010). Maintenance of the thyroid axis during diet-induced obesity in rodents is controlled at the central level. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 299, E976–89.

Peruzzo, B., Pastor, F.E., Blázquez, J.L., Schöbitz, K., Peláez, B., Amat, P., and Rodríguez, E.M. (2000). A second look at the barriers of the medial basal hypothalamus. *Experimental Brain Research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation Cérébrale* 132, 10–26.

Pierre, K., Parent, A., Jayet, P.-Y., Halestrap, A.P., Scherrer, U., and Pellerin, L. (2007). Enhanced expression of three monocarboxylate transporter isoforms in the brain of obese mice. *The Journal of Physiology* 583, 469–486.

Pierre, K., and Pellerin, L. (2005). Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *Journal of Neurochemistry* 94, 1–14.

- De Pina-Benabou, M.H., Srinivas, M., Spray, D.C., and Scemes, E. (2001). Calmodulin kinase pathway mediates the K⁺-induced increase in Gap junctional communication between mouse spinal cord astrocytes. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* *21*, 6635–6643.
- Pinto, S., Roseberry, A.G., Liu, H., Diano, S., Shanabrough, M., Cai, X., Friedman, J.M., and Horvath, T.L. (2004). Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science (New York, N.Y.)* *304*, 110–115.
- Pocai, A., Lam, T.K.T., Gutierrez-Juarez, R., Obici, S., Schwartz, G.J., Bryan, J., Aguilar-Bryan, L., and Rossetti, L. (2005a). Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature* *434*, 1026–1031.
- Pocai, A., Lam, T.K.T., Obici, S., Gutierrez-Juarez, R., Muse, E.D., Arduini, A., and Rossetti, L. (2006). Restoration of hypothalamic lipid sensing normalizes energy and glucose homeostasis in overfed rats. *The Journal of Clinical Investigation* *116*, 1081–1091.
- Pocai, A., Obici, S., Schwartz, G.J., and Rossetti, L. (2005b). A brain-liver circuit regulates glucose homeostasis. *Cell Metabolism* *1*, 53–61.
- Porras, O.H., Loaiza, A., and Barros, L.F. (2004). Glutamate mediates acute glucose transport inhibition in hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* *24*, 9669–9673.
- Porras, O.H., Ruminot, I., Loaiza, A., and Barros, L.F. (2008). Na(+)-Ca(2+) cosignaling in the stimulation of the glucose transporter GLUT1 in cultured astrocytes. *Glia* *56*, 59–68.
- Porrini, M., Santangelo, A., Crovetti, R., Riso, P., Testolin, G., and Blundell, J.E. (1997). Weight, protein, fat, and timing of preloads affect food intake. *Physiology & Behavior* *62*, 563–570.
- Prebil, M., Chowdhury, H.H., Zorec, R., and Kreft, M. (2011). Changes in cytosolic glucose level in ATP stimulated live astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *405*, 308–313.
- Pénicaud, L., Leloup, C., Fioramonti, X., Lorsignol, A., and Benani, A. (2006). Brain glucose sensing: a subtle mechanism. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* *9*, 458–462.
- Qu, D., Ludwig, D.S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Mathes, W.F., Przypek, R., Kanarek, R., and Maratos-Flier, E. (1996). A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* *380*, 243–247.
- Rackauskas, M., Neverauskas, V., and Skeberdis, V.A. (2010). Diversity and properties of connexin gap junction channels. *Medicina (Kaunas, Lithuania)* *46*, 1–12.
- Rafiki, A., Boulland, J.L., Halestrap, A.P., Ottersen, O.P., and Bergersen, L. (2003). Highly differential expression of the monocarboxylate transporters MCT2 and MCT4 in the developing rat brain. *Neuroscience* *122*, 677–688.
- Ramos, M., Del Arco, A., Pardo, B., Martínez-Serrano, A., Martínez-Morales, J.R., Kobayashi, K., Yasuda, T., Bogóñez, E., Bovolenta, P., Saheki, T., et al. (2003). Developmental changes in the Ca²⁺-regulated mitochondrial aspartate-glutamate carrier aralar1 in brain and prominent expression in the spinal cord. *Brain Research. Developmental Brain Research* *143*, 33–46.
- Rana, S., and Dringen, R. (2007). Gap junction hemichannel-mediated release of glutathione from cultured rat astrocytes. *Neuroscience Letters* *415*, 45–48.
- Raposinho, P.D., Pierroz, D.D., Broqua, P., White, R.B., Pedrazzini, T., and Aubert, M.L. (2001). Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle of C57BL/6J male mice produces an obesity syndrome including hyperphagia, hyperleptinemia, insulin resistance, and hypogonadism. *Molecular and Cellular Endocrinology* *185*, 195–204.

- Reaux-Le Goazigo, A., Bodineau, L., De Mota, N., Jeandel, L., Chartrel, N., Knauf, C., Raad, C., Valet, P., and Llorens-Cortes, C. (2011). Apelin and the proopiomelanocortin system: a new regulatory pathway of hypothalamic α -MSH release. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* *301*, E955–66.
- Reaven, G.M., Hollenbeck, C., Jeng, C.Y., Wu, M.S., and Chen, Y.D. (1988). Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM. *Diabetes* *37*, 1020–1024.
- Reimann, F., Habib, A.M., Tolhurst, G., Parker, H.E., Rogers, G.J., and Gribble, F.M. (2008). Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell Metabolism* *8*, 532–539.
- Retamal, M. a, Cortés, C.J., Reuss, L., Bennett, M.V.L., and Sáez, J.C. (2006). S-nitrosylation and permeation through connexin 43 hemichannels in astrocytes: induction by oxidant stress and reversal by reducing agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 4475–4480.
- Revel, J.P., and Karnovsky, M.J. (1967). Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *The Journal of Cell Biology* *33*, C7–C12.
- Richardson, R.D., Omachi, K., Kermani, R., and Woods, S.C. (2002). Intraventricular insulin potentiates the anorexic effect of corticotropin releasing hormone in rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* *283*, R1321–6.
- Riedy, C.A., Chavez, M., Figlewicz, D.P., and Woods, S.C. (1995). Central insulin enhances sensitivity to cholecystokinin. *Physiology & Behavior* *58*, 755–760.
- Rios, M., Fan, G., Fekete, C., Kelly, J., Bates, B., Kuehn, R., Lechan, R.M., and Jaenisch, R. (2001). Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Molecular Endocrinology* *15*, 1748–1757.
- Ritter, S., Li, A.-J., Wang, Q., and Dinh, T.T. (2011). Minireview: The value of looking backward: the essential role of the hindbrain in counterregulatory responses to glucose deficit. *Endocrinology* *152*, 4019–4032.
- Rodgers, R.J., Ishii, Y., Halford, J.C.G., and Blundell, J.E. (2002). Orexins and appetite regulation. *Neuropeptides* *36*, 303–325.
- Roman, E.A.F.R., Reis, D., Romanatto, T., Maimoni, D., Ferreira, E.A., Santos, G.A., Torsoni, A.S., Velloso, L.A., and Torsoni, M.A. (2010). Central leptin action improves skeletal muscle AKT, AMPK, and PGC1 alpha activation by hypothalamic PI3K-dependent mechanism. *Molecular and Cellular Endocrinology* *314*, 62–69.
- Roseberry, A.G., Liu, H., Jackson, A.C., Cai, X., and Friedman, J.M. (2004). Neuropeptide Y-mediated inhibition of proopiomelanocortin neurons in the arcuate nucleus shows enhanced desensitization in ob/ob mice. *Neuron* *41*, 711–722.
- Rouach, N., Avignone, E., Mème, W., Koulakoff, A., Venance, L., Blomstrand, F., and Giaume, C. (2002a). Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization* *94*, 457–475.
- Rouach, N., Calvo, C.-F., Duquennoy, H., Glowinski, J., and Giaume, C. (2004). Hydrogen peroxide increases gap junctional communication and induces astrocyte toxicity: regulation by brain macrophages. *Glia* *45*, 28–38.
- Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K., and Giaume, C. (2008). Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science (New York, N.Y.)* *322*, 1551–1555.
- Rouach, N., Tencé, M., Glowinski, J., and Giaume, C. (2002b). Costimulation of N-methyl-D-aspartate and muscarinic neuronal receptors modulates gap junctional communication in

striatal astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 1023–1028.

Saberi, M., Bohland, M., and Donovan, C.M. (2008). The locus for hypoglycemic detection shifts with the rate of fall in glycemia: the role of portal-superior mesenteric vein glucose sensing. *Diabetes* 57, 1380–1386.

Sakaguchi, T., and Bray, G. a (1987). The effect of intrahypothalamic injections of glucose on sympathetic efferent firing rate. *Brain Research Bulletin* 18, 591–595.

Sakaguchi, T., and Bray, G.A. (1990). Ventromedial hypothalamic lesions attenuate responses of sympathetic nerves to carotid arterial infusions of glucose and insulin. *International Journal of Obesity* 14, 127–133.

Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R.M., Tanaka, H., Williams, S.C., Richardson, J.A., Kozłowski, G.P., Wilson, S., et al. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92, 573–585.

Sanders, N.M., Dunn-Meynell, A.A., and Levin, B.E. (2004). Third ventricular alloxan reversibly impairs glucose counterregulatory responses. *Diabetes* 53, 1230–1236.

Sato, I., Arima, H., Ozaki, N., Watanabe, M., Goto, M., Hayashi, M., Banno, R., Nagasaki, H., and Oiso, Y. (2005). Insulin inhibits neuropeptide Y gene expression in the arcuate nucleus through GABAergic systems. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 25, 8657–8664.

Scarpace, P.J., Matheny, M., Pollock, B.H., and Tümer, N. (1997). Leptin increases uncoupling protein expression and energy expenditure. *The American Journal of Physiology* 273, E226–30.

Scemes, E., and Giaume, C. (2006). *Astrocyte Calcium Waves : What They Are and What They Do*. *Glia* 54, 716–725.

Scemes, E., Spray, D.C., and Meda, P. (2009). Connexins, pannexins, innexins: novel roles of “hemi-channels”. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology* 457, 1207–1226.

Scheurink, A.J., and Nolan, L.J. (1996). Food intake, fuel homeostasis, and the autonomic nervous system. *Appetite* 26, 304.

Schuit, F.C., Huypens, P., Heimberg, H., and Pipeleers, D.G. (2001). Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. *Diabetes* 50, 1–11.

Schwartz, G.J. (2000). The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 16, 866–873.

Schwartz, G.J., and Moran, T.H. (2002). Leptin and neuropeptide y have opposing modulatory effects on nucleus of the solitary tract neurophysiological responses to gastric loads: implications for the control of food intake. *Endocrinology* 143, 3779–3784.

Schwartz, M.W., Baskin, D.G., Bukowski, T.R., Kuijper, J.L., Foster, D., Lasser, G., Prunkard, D.E., Porte, D., Woods, S.C., Seeley, R.J., et al. (1996a). Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes* 45, 531–535.

Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Campfield, L.A., Burn, P., and Baskin, D.G. (1996b). Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *The Journal of Clinical Investigation* 98, 1101–1106.

Schwartz, M.W., Sipols, A.J., Marks, J.L., Sanacora, G., White, J.D., Scheurink, A., Kahn, S.E., Baskin, D.G., Woods, S.C., and Figlewicz, D.P. (1992). Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology* 130, 3608–3616.

- Seeley, R.J., Van Dijk, G., Campfield, L.A., Smith, F.J., Burn, P., Nelligan, J.A., Bell, S.M., Baskin, D.G., Woods, S.C., and Schwartz, M.W. (1996). Intraventricular leptin reduces food intake and body weight of lean rats but not obese Zucker rats. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Métabolisme* 28, 664–668.
- Shapiro, R.E., and Miselis, R.R. (1985). The central neural connections of the area postrema of the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 234, 344–364.
- Shibata, H., and Bukowiecki, L.J. (1987). Regulatory alterations of daily energy expenditure induced by fasting or overfeeding in unrestrained rats. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 63, 465–470.
- Shimada, M., Tritos, N.A., Lowell, B.B., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (1998). Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* 396, 670–674.
- Shimizu, N., Oomura, Y., Novin, D., Grijalva, C. V, and Cooper, P.H. (1983). Functional correlations between lateral hypothalamic glucose-sensitive neurons and hepatic portal glucose-sensitive units in rat. *Brain Research* 265, 49–54.
- Shor-Posner, G., Azar, A.P., Insinga, S., and Leibowitz, S.F. (1985). Deficits in the control of food intake after hypothalamic paraventricular nucleus lesions. *Physiology & Behavior* 35, 883–890.
- Shulman, R.G., Rothman, D.L., Behar, K.L., and Hyder, F. (2004). Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging. *Trends in Neurosciences* 27, 489–495.
- Silva, L.E.C.M., Castro, M., Amaral, F.C., Antunes-Rodrigues, J., and Elias, L.L.K. (2010). Estradiol-induced hypophagia is associated with the differential mRNA expression of hypothalamic neuropeptides. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas e Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et Al.]* 43, 759–766.
- Silver, I. a, and Erecińska, M. (1994). Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 14, 5068–5076.
- Silvestri, E., Schiavo, L., Lombardi, A., and Goglia, F. (2005). Thyroid hormones as molecular determinants of thermogenesis. *Acta Physiologica Scandinavica* 184, 265–283.
- Simard, M., Arcuino, G., Takano, T., Liu, Q.S., and Nedergaard, M. (2003). Signaling at the gliovascular interface. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 23, 9254–9262.
- Simpson, I. a, Carruthers, A., and Vannucci, S.J. (2007). Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 27, 1766–1791.
- Sindelar, D.K., Ste Marie, L., Miura, G.I., Palmiter, R.D., McMinn, J.E., Morton, G.J., and Schwartz, M.W. (2004). Neuropeptide Y is required for hyperphagic feeding in response to neuroglucopenia. *Endocrinology* 145, 3363–3368.
- Smith, J.T. (2008). Kisspeptin signalling in the brain: steroid regulation in the rodent and ewe. *Brain Research Reviews* 57, 288–298.
- Smith, S.M., Vaughan, J.M., Donaldson, C.J., Rivier, J., Li, C., Chen, A., and Vale, W.W. (2004). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis through a corticotropin-releasing factor receptor-dependent mechanism. *Endocrinology* 145, 5202–5209.
- Solan, J.L., and Lampe, P.D. (2009). Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *The Biochemical Journal* 419, 261–272.

- Solomon, J., and Mayer, J. (1973). The effect of adrenalectomy on the development of the obese-hyperglycemic syndrome in ob-ob mice. *Endocrinology* 93, 510–512.
- Song, Z., Levin, B.E., McArdle, J.J., Bakhos, N., and Routh, V.H. (2001). Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes* 50, 2673–2681.
- Song, Z., and Routh, V.H. (2005). Differential effects of glucose and lactate on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes* 54, 15–22.
- Sorensen, A., Travers, M.T., Vernon, R.G., Price, N.T., and Barber, M.C. (2002). Localization of messenger RNAs encoding enzymes associated with malonyl-CoA metabolism in mouse brain. *Brain Research. Gene Expression Patterns* 1, 167–173.
- Sorg, O., Pellerin, L., Stolz, M., Beggah, S., and Magistretti, P.J. (1995). Adenosine triphosphate and arachidonic acid stimulate glycogenolysis in primary cultures of mouse cerebral cortical astrocytes. *Neuroscience Letters* 188, 109–112.
- Sosinsky, G.E., and Nicholson, B.J. (2005). Structural organization of gap junction channels. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1711, 99–125.
- Spanswick, D., Smith, M. a, Mirshamsi, S., Routh, V.H., and Ashford, M.L. (2000). Insulin activates ATP-sensitive K⁺ channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. *Nature Neuroscience* 3, 757–758.
- Spanswick, D., Smith, M.A., Groppi, V.E., Logan, S.D., and Ashford, M.L. (1997). Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Nature* 390, 521–525.
- Stanley, B.G., Kyrkouli, S.E., Lampert, S., and Leibowitz, S.F. (1986). Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 7, 1189–1192.
- Stanley, B.G., and Leibowitz, S.F. (1984). Neuropeptide Y: stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. *Life Sciences* 35, 2635–2642.
- Stanley, S., Pinto, S., Segal, J., Pérez, C. a, Viale, A., DeFalco, J., Cai, X., Heisler, L.K., and Friedman, J.M. (2010). Identification of neuronal subpopulations that project from hypothalamus to both liver and adipose tissue polysynaptically. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 7024–7029.
- Stanley, S.A., Small, C.J., Murphy, K.G., Rayes, E., Abbott, C.R., Seal, L.J., Morgan, D.G., Sunter, D., Dakin, C.L., Kim, M.S., et al. (2001). Actions of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide on regulation of appetite and hypothalamo-pituitary axes in vitro and in vivo in male rats. *Brain Research* 893, 186–194.
- Stark, R., Ashley, S.E., and Andrews, Z.B. (2012). AMPK and the neuroendocrine regulation of appetite and energy expenditure. *Molecular and Cellular Endocrinology*.
- Sternson, S.M., Shepherd, G.M.G., and Friedman, J.M. (2005). Topographic mapping of VMH --> arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nature Neuroscience* 8, 1356–1363.
- Stolarczyk, E., Guissard, C., Michau, A., Even, P.C., Grosfeld, A., Serradas, P., Lorsignol, A., Pénicaud, L., Brot-Laroche, E., Leturque, A., et al. (2010). Detection of extracellular glucose by GLUT2 contributes to hypothalamic control of food intake. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 298, E1078–87.
- Stout, C.E., Costantin, J.L., Naus, C.C.G., and Charles, A.C. (2002). Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 10482–10488.

- Suzuki, A., Stern, S. a, Bozdagi, O., Huntley, G.W., Walker, R.H., Magistretti, P.J., and Alberini, C.M. (2011). Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* 144, 810–823.
- Suzuki, T., Kohno, H., Sakurada, T., Tadano, T., and Kisara, K. (1982). Intracranial injection of thyrotropin releasing hormone (TRH) suppresses starvation-induced feeding and drinking in rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 17, 249–253.
- Sáez, J.C., Schalper, K. a, Retamal, M. a, Orellana, J. a, Shoji, K.F., and Bennett, M.V.L. (2010). Cell membrane permeabilization via connexin hemichannels in living and dying cells. *Experimental Cell Research* 316, 2377–2389.
- Söhl, G., Maxeiner, S., and Willecke, K. (2005a). Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nature Reviews. Neuroscience* 6, 191–200.
- Söhl, G., Maxeiner, S., and Willecke, K. (2005b). Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nature Reviews. Neuroscience* 6, 191–200.
- Söhl, G., and Willecke, K. (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research* 62, 228–232.
- Taberero, A., Giaume, C., and Medina, J.M. (1996). Endothelin-1 regulates glucose utilization in cultured astrocytes by controlling intercellular communication through gap junctions. *Glia* 16, 187–195.
- Taberero, A., Medina, J.M., and Giaume, C. (2006). Glucose metabolism and proliferation in glia: role of astrocytic gap junctions. *Journal of Neurochemistry* 99, 1049–1061.
- Takahashi, A., Ishimaru, H., Ikarashi, Y., and Maruyama, Y. (1995). Decrease of norepinephrine and preservation of acetylcholine in the hypothalamus of VMH obese rats. *Brain Research Bulletin* 36, 97–99.
- Takano, T., Tian, G.-F., Peng, W., Lou, N., Libionka, W., Han, X., and Nedergaard, M. (2006). Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nature Neuroscience* 9, 260–267.
- Takenaka, T., Inoue, T., Okada, H., Ohno, Y., Miyazaki, T., Chaston, D.J., Hill, C.E., and Suzuki, H. (2011). Altered gap junctional communication and renal haemodynamics in Zucker fatty rat model of type 2 diabetes. *Diabetologia* 54, 2192–2201.
- Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., Deeds, J., et al. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83, 1263–1271.
- Teff, K.L. (2007). Visceral nerves: vagal and sympathetic innervation. *JPEN. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 32, 569–571.
- Teff, K.L. (2011). How neural mediation of anticipatory and compensatory insulin release helps us tolerate food. *Physiology & Behavior* 103, 44–50.
- Teff, K.L., and Engelman, K. (1996). Oral sensory stimulation improves glucose tolerance in humans: effects on insulin, C-peptide, and glucagon. *The American Journal of Physiology* 270, R1371–9.
- Teff, K.L., Levin, B.E., and Engelman, K. (1993). Oral sensory stimulation in men: effects on insulin, C-peptide, and catecholamines. *The American Journal of Physiology* 265, R1223–30.
- Tekkök, S.B., Brown, A.M., Westenbroek, R., Pellerin, L., and Ransom, B.R. (2005). Transfer of glycogen-derived lactate from astrocytes to axons via specific monocarboxylate transporters supports mouse optic nerve activity. *Journal of Neuroscience Research* 81, 644–652.
- Tempel, D.L., and Leibowitz, S.F. (1989). PVN steroid implants: effect on feeding patterns and macronutrient selection. *Brain Research Bulletin* 23, 553–560.

- Tong, Q., Ye, C., McCrimmon, R.J., Dhillon, H., Choi, B., Kramer, M.D., Yu, J., Yang, Z., Christiansen, L.M., Lee, C.E., et al. (2007). Synaptic glutamate release by ventromedial hypothalamic neurons is part of the neurocircuitry that prevents hypoglycemia. *Cell Metabolism* 5, 383–393.
- Tong, Q., Ye, C.-P., Jones, J.E., Elmquist, J.K., and Lowell, B.B. (2008). Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. *Nature Neuroscience* 11, 998–1000.
- Van den Top, M., Lee, K., Whyment, A.D., Blanks, A.M., and Spanswick, D. (2004). Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nature Neuroscience* 7, 493–494.
- Tordoff, M.G., and Friedman, M.I. (1986). Hepatic portal glucose infusions decrease food intake and increase food preference. *The American Journal of Physiology* 251, R192–6.
- Toriya, M., Maekawa, F., Maejima, Y., Onaka, T., Fujiwara, K., Nakagawa, T., Nakata, M., and Yada, T. (2010). Long-term infusion of brain-derived neurotrophic factor reduces food intake and body weight via a corticotrophin-releasing hormone pathway in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology* 22, 987–995.
- Tschöp, M., Smiley, D.L., and Heiman, M.L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407, 908–913.
- Tschöp, M., Weyer, C., Tataranni, P.A., Devanarayan, V., Ravussin, E., and Heiman, M.L. (2001). Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 50, 707–709.
- Tsubone, T., Masaki, T., Katsuragi, I., Tanaka, K., Kakuma, T., and Yoshimatsu, H. (2005). Ghrelin regulates adiposity in white adipose tissue and UCP1 mRNA expression in brown adipose tissue in mice. *Regulatory Peptides* 130, 97–103.
- Tsujino, N., and Sakurai, T. (2009). Orexin/hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system. *Pharmacological Reviews* 61, 162–176.
- Uchoa, E.T., Silva, L.E.C.M., De Castro, M., Antunes-Rodrigues, J., and Elias, L.L.K. (2012). Glucocorticoids are required for meal-induced changes in the expression of hypothalamic neuropeptides. *Neuropeptides* 46, 119–124.
- Vaisse, C., Halaas, J.L., Horvath, C.M., Darnell, J.E., Stoffel, M., and Friedman, J.M. (1996). Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nature Genetics* 14, 95–97.
- Vannucci, S.J., Maher, F., and Simpson, I. a (1997). Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* 21, 2–21.
- Vella, K.R., Ramadoss, P., Lam, F.S., Harris, J.C., Ye, F.D., Same, P.D., O'Neill, N.F., Maratos-Flier, E., and Hollenberg, A.N. (2011). NPY and MC4R signaling regulate thyroid hormone levels during fasting through both central and peripheral pathways. *Cell Metabolism* 14, 780–790.
- Venner, A., Karnani, M.M., Gonzalez, J.A., Jensen, L.T., Fugger, L., and Burdakov, D. (2011). Orexin neurons as conditional glucosensors: paradoxical regulation of sugar sensing by intracellular fuels. *The Journal of Physiology* 589, 5701–5708.
- Verret, L., Goutagny, R., Fort, P., Cagnon, L., Salvat, D., Léger, L., Boissard, R., Salin, P., Peyron, C., and Luppi, P.-H. (2003). A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. *BMC Neuroscience* 4, 19.
- Vincent, K.M., Sharp, J.W., and Raybould, H.E. (2011). Intestinal glucose-induced calcium-calmodulin kinase signaling in the gut-brain axis in awake rats. *Neurogastroenterology and Motility : the Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 23, e282–93.

- Vrang, N., Larsen, P.J., Clausen, J.T., and Kristensen, P. (1999). Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine- amphetamine-regulated transcript neurons. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 19, RC5.
- De Vries, M.G., Arseneau, L.M., Lawson, M.E., and Beverly, J.L. (2003). Extracellular glucose in rat ventromedial hypothalamus during acute and recurrent hypoglycemia. *Diabetes* 52, 2767–2773.
- Wallraff, A., Köhling, R., Heinemann, U., Theis, M., Willecke, K., and Steinhäuser, C. (2006). The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 26, 5438–5447.
- Walls, A.B., Sickmann, H.M., Brown, A., Bouman, S.D., Ransom, B., Schousboe, A., and Waagepetersen, H.S. (2008). Characterization of 1,4-dideoxy-1,4-imino-d-arabinitol (DAB) as an inhibitor of brain glycogen shunt activity. *Journal of Neurochemistry* 105, 1462–1470.
- Wang, C., Bomberg, E., Billington, C.J., Levine, A.S., and Kotz, C.M. (2010a). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the hypothalamic ventromedial nucleus increases energy expenditure. *Brain Research* 1336, 66–77.
- Wang, C., Godar, R.J., Billington, C.J., and Kotz, C.M. (2010b). Chronic administration of brain-derived neurotrophic factor in the hypothalamic paraventricular nucleus reverses obesity induced by high-fat diet. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 298, R1320–32.
- Wang, R., Cruciani-Guglielmacci, C., Migrenne, S., Magnan, C., Cotoero, V.E., and Routh, V.H. (2006). Effects of oleic acid on distinct populations of neurons in the hypothalamic arcuate nucleus are dependent on extracellular glucose levels. *Journal of Neurophysiology* 95, 1491–1498.
- Wang, R., Liu, X., Hentges, S.T., Dunn-Meynell, A.A., Levin, B.E., Wang, W., and Routh, V.H. (2004). The regulation of glucose-excited neurons in the hypothalamic arcuate nucleus by glucose and feeding-relevant peptides. *Diabetes* 53, 1959–1965.
- Wender, R., Brown, A.M., Fern, R., Swanson, R.A., Farrell, K., and Ransom, B.R. (2000). Astrocytic glycogen influences axon function and survival during glucose deprivation in central white matter. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 20, 6804–6810.
- Willesen, M.G., Kristensen, P., and Rømer, J. (1999). Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 70, 306–316.
- Williams, D.L., Kaplan, J.M., and Grill, H.J. (2000). The role of the dorsal vagal complex and the vagus nerve in feeding effects of melanocortin-3/4 receptor stimulation. *Endocrinology* 141, 1332–1337.
- Williams, R.H., Alexopoulos, H., Jensen, L.T., Fugger, L., and Burdakov, D. (2008). Adaptive sugar sensors in hypothalamic feeding circuits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 11975–11980.
- Woods, S.C., Vasselli, J.R., Kaestner, E., Szakmary, G.A., Milburn, P., and Vitiello, M. V (1977). Conditioned insulin secretion and meal feeding in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 91, 128–133.
- Wortley, K.E., Chang, G.-Q., Davydova, Z., Fried, S.K., and Leibowitz, S.F. (2004). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the arcuate nucleus stimulates lipid metabolism to control body fat accrual on a high-fat diet. *Regulatory Peptides* 117, 89–99.
- Wren, A.M., Small, C.J., Ward, H.L., Murphy, K.G., Dakin, C.L., Taheri, S., Kennedy, A.R., Roberts, G.H., Morgan, D.G., Ghatei, M.A., et al. (2000). The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 141, 4325–4328.

- Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M.N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471–484.
- Xia, T., Cheng, Y., Zhang, Q., Xiao, F., Liu, B., Chen, S., and Guo, F. (2012). S6K1 in the Central Nervous System Regulates Energy Expenditure via MC4R/Corticotropin-Releasing Hormone Pathways in Response to Deprivation of an Essential Amino Acid. *Diabetes*.
- Xu, B., Goulding, E.H., Zang, K., Cepoi, D., Cone, R.D., Jones, K.R., Tecott, L.H., and Reichardt, L.F. (2003). Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nature Neuroscience* 6, 736–742.
- Yang, C.S., Lam, C.K.L., Chari, M., Cheung, G.W.C., Kokorovic, A., Gao, S., Leclerc, I., Rutter, G.A., and Lam, T.K.T. (2010). Hypothalamic AMP-activated protein kinase regulates glucose production. *Diabetes* 59, 2435–2443.
- Yang, X.-J., Kow, L.-M., Pfaff, D.W., and Mobbs, C. V (2004). Metabolic pathways that mediate inhibition of hypothalamic neurons by glucose. *Diabetes* 53, 67–73.
- Yang, X.-J., Kow, L.M., Funabashi, T., and Mobbs, C. V (1999). Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms. *Diabetes* 48, 1763–1772.
- Ye, Z.-C., Wyeth, M.S., Baltan-Tekkok, S., and Ransom, B.R. (2003). Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* 23, 3588–3596.
- Yettefti, K., Orsini, J.C., and Perrin, J. (1997). Characteristics of glycemia-sensitive neurons in the nucleus tractus solitarii: possible involvement in nutritional regulation. *Physiology & Behavior* 61, 93–100.
- Yi, C.-X., Foppen, E., Abplanalp, W., Gao, Y., Alkemade, A., La Fleur, S.E., Serlie, M.J., Fliers, E., Buijs, R.M., Tschöp, M.H., et al. (2012). Glucocorticoid Signaling in the Arcuate Nucleus Modulates Hepatic Insulin Sensitivity. *Diabetes* 61, 339–345.
- Zawalich, W.S., Zawalich, K.C., and Rasmussen, H. (1989). Cholinergic agonists prime the beta-cell to glucose stimulation. *Endocrinology* 125, 2400–2406.
- Zellner, D.A., Loaiza, S., Gonzalez, Z., Pita, J., Morales, J., Pecora, D., and Wolf, A. (2006). Food selection changes under stress. *Physiology & Behavior* 87, 789–793.
- Zhang, H., Zhang, G., Gonzalez, F.J., Park, S.-M., and Cai, D. (2011). Hypoxia-inducible factor directs POMC gene to mediate hypothalamic glucose sensing and energy balance regulation. *PLoS Biology* 9, e1001112.
- 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.
- Zheng, H., Patterson, L.M., Phifer, C.B., and Berthoud, H. (2005). Brain stem melanocortinergic modulation of meal size and identification of hypothalamic POMC projections. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 289, R247–58.
- Zhou, D., Shen, Z., Strack, A.M., Marsh, D.J., and Shearman, L.P. (2005). Enhanced running wheel activity of both Mch1r- and Pmch-deficient mice. *Regulatory Peptides* 124, 53–63.
- Zonta, M., Angulo, M.C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K.-A., Pozzan, T., and Carmignoto, G. (2003). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nature Neuroscience* 6, 43–50.