



HAL
open science

**Rôle de l'apeline dans le contrôle de l'axe
"intestin-hypothalamus-périphérie" : conséquences sur le
métabolisme glucidique chez la souris normale et
obèse/diabétique**

Audren Fournel

► **To cite this version:**

Audren Fournel. Rôle de l'apeline dans le contrôle de l'axe "intestin-hypothalamus-périphérie" : conséquences sur le métabolisme glucidique chez la souris normale et obèse/diabétique. Pharmacologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2016. Français. NNT : 2016TOU30073 . tel-01498705

HAL Id: tel-01498705

<https://theses.hal.science/tel-01498705>

Submitted on 30 Mar 2017

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.



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Audren FOURNEL

le mercredi 29 juin 2016

Titre :

Rôle de l'apeline dans le contrôle de l'axe "intestin-hypothalamus-périphérie":
conséquences sur le métabolisme glucidique chez la souris normale
et obèse/diabétique.

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Pharmacologie

Unité de recherche :

Institut de Recherche en Santé Digestive (IRSD) - INSERM U1220 - Équipe 3

Directeur/trice(s) de Thèse :

Pr. Claude KNAUF

Jury :

Pr. Bernard FRANCES - Président

Pr. Denis ARDID - Rapporteur

Dr. André BADO - Rapporteur

Dr. Michel NEUNLIST - Examineur

Pr. Claude KNAUF - Directeur de thèse

Résumé

Au début de ce doctorat, plusieurs études avaient identifié l'intestin grêle, siège de l'absorption du glucose, en tant que premier organe impliqué dans le contrôle de l'homéostasie glucidique lors d'un repas. En particulier, il a été démontré que la détection entérique de glucose permettait d'impacter son utilisation par le muscle et le foie, *via* un relai central impliquant une libération hypothalamique de monoxyde d'azote (NO). De plus, notre groupe a également démontré qu'une altération de la détection entérique du glucose, associée à une réponse neuronale hypothalamique anormale, participait à la mise en place d'un Diabète de Type 2 (DT2).

En plus de ces problèmes de détection de nutriments, les patients obèses et diabétiques souffrent de troubles de la motilité intestinale (en particulier d'une hypercontractilité intestinale), liés à une atteinte du Système Nerveux Entérique (SNE). En effet, ce dernier est constitué d'environ 600 millions de neurones interconnectés chez l'Homme, contrôlant les contractions des muscles lisses intestinaux. D'un point de vue régulation, le SNE communique en permanence avec le Système Nerveux Central (SNC) *via* des voies nerveuses afférentes et efférentes. L'équipe s'intéresse au rôle de l'apeline en tant que nouvelle cible thérapeutique potentielle pour traiter le DT2. En particulier, notre équipe a récemment montré que l'apeline était libérée par les entérocytes dans la partie proximale de l'intestin, et qu'à ce niveau elle contrôlait l'absorption intestinale du glucose. Cependant, le fait que l'apeline puisse également cibler les neurones du SNE, et donc moduler la contractilité intestinale, n'était pas encore démontré.

Lors de ce travail de thèse, nous avons ainsi pu montrer qu'en fonction de sa concentration, l'apeline activait des populations neuronales entériques différentes provoquant une stimulation ou, au contraire, une inhibition des contractions duodénales. La stimulation de cette contractilité duodénale par de faibles concentrations d'apeline entraîne une augmentation de l'absorption intestinale de glucose, mais également une diminution de la libération de NO hypothalamique, aboutissant à une moindre utilisation de ce dernier par le muscle squelettique. A l'inverse, de fortes concentrations d'apeline sont associées à une diminution de cette activité duodénale, entraînant un retour de l'ensemble de ces paramètres à des niveaux contrôlés. Dans un second temps, nous avons voulu tester si cette motilité duodénale pouvait être considérée comme une cible thérapeutique pour traiter le DT2. Pour cela, nous avons effectué un traitement oral quotidien, pendant une semaine, avec la concentration d'apeline capable de diminuer l'activité duodénale, chez des souris obèses-diabétiques. Cette stimulation chronique par l'apeline permet de restaurer la contractilité duodénale de ces souris diabétiques au même niveau que celle de souris saines. De plus, cet effet est associé à une amélioration de leur tolérance au glucose ainsi que leur index de résistance à l'insuline.

Ainsi, ce doctorat a permis de décrire un nouveau mode de communication entre l'intestin et le cerveau dans le contrôle de l'homéostasie glucidique. En effet, moduler les contractions duodénales en modifiant l'activité du SNE permettrait non seulement d'impacter l'absorption intestinale de glucose, mais également d'activer un axe duodénum-hypothalamus aboutissant au contrôle de l'utilisation périphérique de glucose. Dès lors, ce couplage « SNE-contraction duodénale » représenterait une cible thérapeutique prometteuse dans le traitement de maladies métaboliques telles que le DT2.

Abstract

Prior to this PhD, several studies had determined that the small intestine, the site of glucose absorption, is the first organ involved in the control of glucose homeostasis during food intake. In particular, enteric glucose detection has been demonstrated to impact its utilization by muscles and liver, *via* a central relay involving hypothalamic nitric oxide (NO) release. Moreover, our group has also demonstrated that an alteration of enteric glucose detection, associated with an abnormal hypothalamic neuronal response, participates in type 2 diabetes (T2D) development.

In addition to these defaults of nutrients detection, obese and diabetic patients suffer from intestinal motility disorders (in particular intestinal hypercontractility), linked to an alteration of the Enteric Nervous System (ENS). The ENS is composed of 600 million interconnected neurons in humans, known to control intestinal smooth muscles. The ENS permanently communicates with the Central Nervous System (CNS) *via* afferent and efferent nervous messages. Our team studies the role of apelin as a new potential therapeutic target to treat T2D. In this context, our group has recently demonstrated that apelin is released by the enterocytes in the proximal part of the intestine. At this site, apelin controls intestinal absorption of glucose. However, it hadn't been addressed yet whether apelin is also able to target enteric neurons, and consequently modulate intestinal contractility.

During this PhD, we have highlighted that, depending of its concentration, apelin activates different enteric neuronal populations, leading to stimulation or, on the contrary, inhibition of duodenal contractions. Stimulation of this duodenal contractility by low concentrations of apelin causes an increase in intestinal glucose absorption, but also a decrease in hypothalamic NO release, leading to a reduced utilization of glucose by skeletal muscle. Conversely, high concentrations of apelin are associated with a decrease in the duodenal activity, leading to the restoration of all these parameters at basal levels. Then, we wanted to test whether duodenal motility could be considered as a therapeutic target to treat T2D. We performed a daily oral treatment, during one week, with the concentration of apelin able to decrease duodenal activity in obese and diabetic mice. We have shown that this chronic apelin treatment restores duodenal contractility in diabetic mice, at a similar level to that observed in normal mice. Moreover, this effect is associated with an improved glucose tolerance and insulin resistance index.

Thus, this PhD describes a new mode of communication between the intestine and the brain, in the control of glucose homeostasis. Indeed, the modulation of duodenal contraction by targeting ENS activity could not only impact intestinal glucose absorption, but also activate a duodenum-hypothalamus axis, leading to the control of peripheral glucose utilization. Consequently, the “ENS-duodenal contraction” coupling could represent a promising therapeutic target to treat metabolic diseases such as T2D.

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	1
TABLE DES ILLUSTRATIONS	3
AVANT-PROPOS	5
INTRODUCTION	7
<u>Partie 1 : Régulation de la balance glycémique</u>	7
I- L'homéostasie glucidique	7
1) Définition	7
2) Organes et mécanismes impliqués	8
a) <i>Mécanismes de transport du glucose</i>	9
b) <i>Mécanismes impliqués dans l'utilisation intracellulaire du glucose</i>	11
c) <i>Mécanismes de production du glucose</i>	13
II- Régulation endocrine du métabolisme glucidique	14
1) Hormones pancréatiques	14
a) <i>Insuline</i>	14
b) <i>Glucagon</i>	16
2) Hormones gastro-intestinales	17
III- Régulation nerveuse du métabolisme glucidique	21
1) Généralités	21
2) Système nerveux autonome (SNA)	23
3) Neuroendocrinologie	24
4) Types cellulaires et acteurs moléculaires principaux impliqués dans la détection centrale du glucose	26
a) <i>Les types cellulaires</i>	27
b) <i>Les acteurs moléculaires</i>	31
IV- Le cas du Diabète de Type 2	36
1) Généralités	36
2) Stratégies thérapeutiques	37

a) <i>Pharmacologie classique</i>	38
b) <i>Nouvelles stratégies thérapeutiques</i>	39
<u>Partie 2 : L'intestin grêle</u>	42
I- Du simple tube au deuxième cerveau	42
II- Anatomie de l'intestin grêle	42
1) Généralités	42
2) La muqueuse	43
a) <i>Les entérocytes</i>	45
b) <i>Les cellules à mucus</i>	45
c) <i>Les cellules Entéro-Endocrines (EEs)</i>	45
d) <i>Les cellules souches et les cellules de Paneth</i>	46
3) Les autres couches de la paroi digestive	46
III- Innervation de l'intestin grêle	47
1) Le Système Nerveux Entérique (SNE)	47
a) <i>Morphologie du SNE</i>	48
b) <i>Les neurones entériques</i>	48
c) <i>Les autres populations cellulaires du SNE</i>	51
2) Innervation extrinsèque	52
a) <i>Innervation extrinsèque afférente</i>	53
b) <i>Innervation extrinsèque efférente</i>	53
IV- Fonctions physiologiques de l'intestin grêle	55
1) Digestion des carbohydrates	56
2) Absorption des carbohydrates	57
3) Motricité intestinale	58
a) <i>Période inter-digestive</i>	59
b) <i>Période postprandiale</i>	60
c) <i>Régulation de l'activité motrice</i>	62
<u>Partie 3 : Axe « intestin-cerveau » : manger, détecter/informer et métaboliser</u>	64
I- L'axe intestin-cerveau	64

II-	Communication intestin - cerveau dans le contrôle de la prise alimentaire	64
	1) Distension gastrique	65
	2) Hormones gastro-intestinales	65
a)	<i>Ghréline</i>	65
b)	<i>Cholécystokinine (CCK)</i>	67
c)	<i>Glucagon Like Peptide-1 (GLP-1)</i>	67
d)	<i>Peptide YY (PYY)</i>	68
	3) Frein iléal	69
	4) Néoglucogenèse intestinale	70
III-	« Glucosensing » intestinal	71
	1) Généralités	71
	2) Types cellulaires impliqués	72
a)	<i>Entérocytes</i>	72
b)	<i>Brush cells</i>	73
c)	<i>Cellules entéro-endocrines</i>	74
d)	<i>Neurones entériques</i>	76
IV-	Communication intestin - cerveau dans le contrôle du métabolisme glucidique	79
	1) Axe intestin-cerveau et utilisation périphérique de glucose	79
	2) Axe intestin-cerveau et inflammation : cas du Diabète de Type 2	80
	3) Axe intestin-cerveau et néoglucogenèse intestinale	82
	4) Axe intestin-cerveau et néoglucogenèse hépatique	83
	<u>Partie 4 : Le système Apeline-APJ dans le contrôle du métabolisme glucidique</u>	86
I-	Généralités	86
	1) Le récepteur APJ	86
	2) L'apeline	86
a)	<i>Maturation de l'apeline</i>	87
b)	<i>Distribution tissulaire de l'apeline</i>	88
c)	<i>Régulation de la production de l'apeline</i>	88
	3) La signalisation apeline-APJ	89
a)	<i>Protéines G impliquées dans les effets de l'apeline</i>	89
b)	<i>Voies de signalisation</i>	89

II-	Rôle de l'apeline dans le contrôle du métabolisme glucidique	91
1)	Rôle de l'apeline périphérique dans le contrôle du métabolisme glucidique	91
2)	Rôle de l'apeline centrale dans le contrôle du métabolisme glucidique	92
III-	L'apeline dans le tractus gastro-intestinal	93
1)	Expression du couple apeline-APJ dans le tractus gastro-intestinal	93
2)	Fonctions du système apeline-APJ dans le tractus gastro-intestinal	93
OBJECTIFS ET TRAVAUX DE THESE		95
I-	Objectifs	95
II-	Résultats	98
ARTICLE : L'apeline cible les contractions intestinales pour contrôler le métabolisme glucidique via un relai central		
III-	Discussion et perspectives	101
1)	Apeline et SNE	101
2)	Contractions duodénales et homéostasie glucidique	103
a)	<i>Absorption intestinale de glucose</i>	103
b)	<i>Axe intestin-hypothalamus-utilisation périphérique de glucose</i>	104
c)	<i>Physiologie intégrée</i>	106
3)	Diabète de Type 2	109
4)	Perspectives	111
IV-	Conclusion générale	114
ANNEXES		115
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		117

Liste des abréviations

ACTH: AdrenoCorticoTrophic Hormone	HFD: Hight-Fat Diet
AGCL : Acides Gras à Chaînes Longues	icv : intracérébroventriculaire
AgRP : Agouti-Related Protein	IFN- γ : InterFéroN- γ
AMPc : AMP cyclique	IL-6: InterLeukine 6
AMPK: AMP-activated Protein Kinase	iNOS: NO Synthase inductible
ARC: noyau arqué	ip : intra-péritonéale
BHE: Barrière Hémato-Encéphalique	IPANs : Neurones Intrinsèques Primaires
CamKK β : Calcium/calmoduline Kinase Kinase β	Afférents
Canaux K _{ATP} : Canaux potassiques ATP-dépendants	iv : intraveineuse
CCK: CholécystoKinine	LH : aire Hypothalamique Latérale
CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator	LPS : LipoPolySaccharide
cGMP: Guanosine 3',5'-MonoPhosphate cyclic	LNMMA: L-NG- MonoMethylarginine Acetate salt
ChAT : Choline Acetyl Transferase	MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
CIC : Cellules Interstitielles de Cajal	MEF2: Myocyte Enhancer Factor 2
CMM : Complexe Moteur Migrant	MEN: Mechanosensitive Enteric Neurons
CRH: Corticotrophin Releasing Hormone	MORs: Récepteurs Mu-Opioïdes
DMN : Noyau Dorso-Médian	MPGF: Major ProGlucagon Fragment
DPP-IV: DiPeptidyl-Peptidase IV	mTOR: mammalian Target Of Rapamycin
DT2 : Diabète de Type 2	nNOS: NO Synthase neuronale
EAOs : Espèces Actives de l'Oxygène	NO: monoxyde d'azote
EEs : Entéro-Endocrines	NOX: NADPH OXydases
eNOS: NO Synthase endothéliale	NPY : NeuroPeptide Y
GDNF: Glial-Derived Neurotrophic Factor	NTS : Noyau du Tractus Solitaire
GHSR: Récepteur Sécrétagogue de l'Hormone de Croissance	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
GI: Gastro-Intestinal	PI3K: Phospholsnositol-3-Kinase
GIP: Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide	PKC: Protéine Kinase C
GLP-1: Glucagon Like Peptide-1	POMC : Pro-OpioMelanoCortin
GLUTs: GLUcose Transporters	PVN : Noyau Para-Ventriculaire
	pyr-Ape13 : apeline 13 pyroglutaminée
	PYY : Peptide YY
	RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G

REB : Rythme Electrique de Base
SGLTs: Sodium GLucose co-Transporters
SNA : Système Nerveux Autonome
SNC : Système Nerveux Central
SNE : Système Nerveux Entérique
SNP : Système Nerveux Parasymphatique
SNS : Système Nerveux Sympathique
SON : Noyau SupraOptique
TAS1R2 : TAsTe 1 Receptor 2
TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α
TRH: Thyrotrophin Releasing Hormone
TRPM5: Transient Receptor Potential cation channel subfamily M member 5
TSH: Thyroide Stimulating Hormone
UDP: Uridine DiPhosphate
VIP: Vasoactive Intestinal Peptide
VMN : Noyau Ventro-Médian
2-DG : 2-deoxy glucose

Table des illustrations

Figure 1:	Balance glycémique	9
Figure 2:	Sécrétion d'insuline par la cellule β pancréatique	15
Figure 3:	Effets des incrétines sur le métabolisme glucidique	20
Figure 4:	Localisation de l'hypothalamus et des différents noyaux hypothalamiques	22
Figure 5:	Système Nerveux Autonome (SNA) et métabolisme glucidique	24
Figure 6:	L'axe hypothalamo-hypophysaire	26
Figure 7:	Les neurones glucosensibles	29
Figure 8:	Contribution des cellules gliales dans l'activation des neurones gluco-excités	31
Figure 9:	Coupe transversale de l'intestin grêle	43
Figure 10:	Valvules, villosités et microvillosités intestinales	44
Figure 11:	Principaux neuromédiateurs classés selon leur action physiologique sur la motricité intestinale	49
Figure 12:	Innervation entérique intrinsèque	51
Figure 13:	Innervation entérique extrinsèque	55
Figure 14:	Absorption intestinale des carbohydrates	58
Figure 15:	Péristaltisme	61
Figure 16:	Activité segmentaire	62
Figure 17:	Schéma récapitulatif de la néoglucogenèse intestinale	71
Figure 18:	Détection du glucose par les entérocytes	73
Figure 19:	Détection du glucose par les Brush cells	74
Figure 20:	Détection du glucose par les cellules entéro-endocrines	76
Figure 21:	Détection du glucose par les neurones entériques	78
Figure 22:	Axe intestin-cerveau et utilisation périphérique de glucose	80
Figure 23:	Axe intestin-cerveau et inflammation: cas du Diabète de Type 2	81

Figure 24:	Axe intestin-cerveau et néoglucogenèse hépatique	84
Figure 25:	Maturation de l'apeline	87
Figure 26:	Signalisation apeline-APJ	90
Figure 27 :	Schéma récapitulatif de l'effet de l'apeline sur l'axe intestin-cerveau-périphérie	108
Figure 28 :	Schéma récapitulatif des altérations observées sur l'axe intestin-cerveau-périphérie dans le cadre d'un Diabète de Type 2	109
Figure 29 :	Schéma récapitulatif des effets thérapeutiques d'un traitement oral par l'apeline 1 μM sur l'axe intestin-cerveau-périphérie lors d'un Diabète de Type 2	111

Avant-Propos

Le diabète de type 2 est un désordre métabolique dont la prévalence est en constante augmentation. En effet, l'Organisation Mondiale de la Santé indique qu'en 2014, la prévalence mondiale du diabète était estimée à 9% chez les adultes. Cette pathologie est caractérisée par une résistance tissulaire à l'insuline conduisant à l'établissement d'une hyperglycémie chronique. L'augmentation supra-physiologique de la concentration de glucose dans le sang n'est pas sans conséquences. A long terme, elle peut conduire à une altération des micro-vaisseaux à l'origine de rétinopathies, de neuropathies périphériques ou de néphropathies diabétiques. Les causes de cette pathologie sont multifactorielles et l'adoption d'un style de vie sédentaire ainsi qu'une alimentation trop riche en calories sont souvent responsables de son développement. En effet, l'augmentation vertigineuse de l'obésité à travers le monde est associée à un accroissement parallèle du diabète de type 2. Face à l'expansion de cette maladie métabolique, les traitements proposés aujourd'hui sont insuffisants, et leur administration est souvent accompagnée d'effets indésirables. Ainsi, malgré les avancées technologiques et médicales, l'étiologie du diabète reste encore peu comprise, et des thérapeutiques efficaces restent à être identifiées.

La plupart des antidiabétiques actuellement sur le marché ciblent les organes directement impliqués dans le métabolisme glucidique (tels que le pancréas, le foie, le muscle et le tissu adipeux). Cependant, depuis une dizaine d'années l'intestin s'est imposé comme une cible thérapeutique novatrice et prometteuse dans le traitement de cette pathologie. En effet, le succès des chirurgies bariatriques (ensemble de techniques modifiant l'anatomie du tractus digestif) et des nouveaux traitements antidiabétiques ciblant les hormones gastro-intestinales ont permis de mettre en lumière le rôle crucial de l'intestin dans l'homéostasie glucidique. Dès lors, il paraît nécessaire de mieux comprendre les fonctions qu'occupent l'intestin dans la régulation de la glycémie. C'est dans cette optique que s'est inscrit mon travail de thèse.

Introduction

Partie 1 : Régulation de la balance glycémique

I- L'homéostasie glucidique

1) Définition

Dès 1865, Claude Bernard (1813-1878), médecin et physiologiste français, décrit dans son « Introduction à la médecine expérimentale », que « chez les animaux à sang chaud, il paraît y avoir une indépendance entre les conditions de l'organisme et celles du milieu ambiant » et « qu'il semble qu'une force intérieure vienne lutter contre ces influences [extérieures] et maintenir malgré elles l'équilibre des fonctions vitales ». Il faudra attendre 1926 pour que le physiologiste américain Walter Bradford Cannon (1871-1945) forge le terme « homéostasie » à partir de deux mots grecs: *stasis* (« état, position ») et *homoios* (« égal, semblable à »). Ainsi l'homéostasie est la capacité d'un système à maintenir l'équilibre de son milieu intérieur quelles que soient les contraintes externes. A l'échelle de l'organisme, il s'agit de maintenir constant un ensemble de paramètres biologiques (température corporelle, glycémie, pression artérielle) malgré les variations du milieu extérieur.

Parmi ces paramètres biologiques, l'homéostasie glucidique est essentielle au fonctionnement de l'organisme. En effet, le glucose représente l'une des principales sources d'énergie pour toutes les cellules vivantes, et notamment pour les neurones centraux. Le cerveau, consommant quasi-exclusivement du glucose et ne pouvant stocker ce dernier, a donc besoin d'une perfusion glucidique constante [1]. Ainsi, dans le cadre d'une hypoglycémie, un défaut de glucose pour le cerveau entraînera des effets plus ou moins graves en fonction de la durée et de la sévérité de celle-ci, allant de la perte de connaissance jusqu'au décès. A l'inverse, dans nos sociétés modernes actuelles, où les apports glucidiques excèdent les besoins énergétiques réels, des phénomènes d'hyperglycémies chroniques sont de plus en plus observés. Ceux-ci entraînent la glycation de protéines et l'activation de protéines kinases toxiques, responsables de nombreuses pathologies comme les rétinopathies, les néphropathies, et comme nous le verrons dans ce manuscrit, le Diabète de Type 2. Or, au cours de la journée les apports glucidiques sont discontinus alors que les dépenses en glucose sont permanentes. L'existence de systèmes de régulation permettant d'assurer un retour rapide de la glycémie à une valeur physiologique en dépit de ces variations est donc nécessaire. Ainsi,

chez une personne saine, la glycémie oscille autour d'une valeur moyenne de 1g/L (5,5mM). Cette régulation fine repose sur une communication constante, orchestrée par les systèmes nerveux centraux et endocriniens, entre les différents organes impliqués dans l'utilisation et/ou la production de glucose.

2) Organes et mécanismes impliqués

L'équilibre glycémique est le résultat d'une balance entre les apports alimentaires et la production endogène de glucose (glycogénolyse et néoglucogenèse) d'une part, et la consommation de celui-ci par les organes (glycolyse) ou son stockage sous forme de glycogène (glycogénogenèse) et de triglycéride (lipogenèse) d'autre part (**Figure 1**).

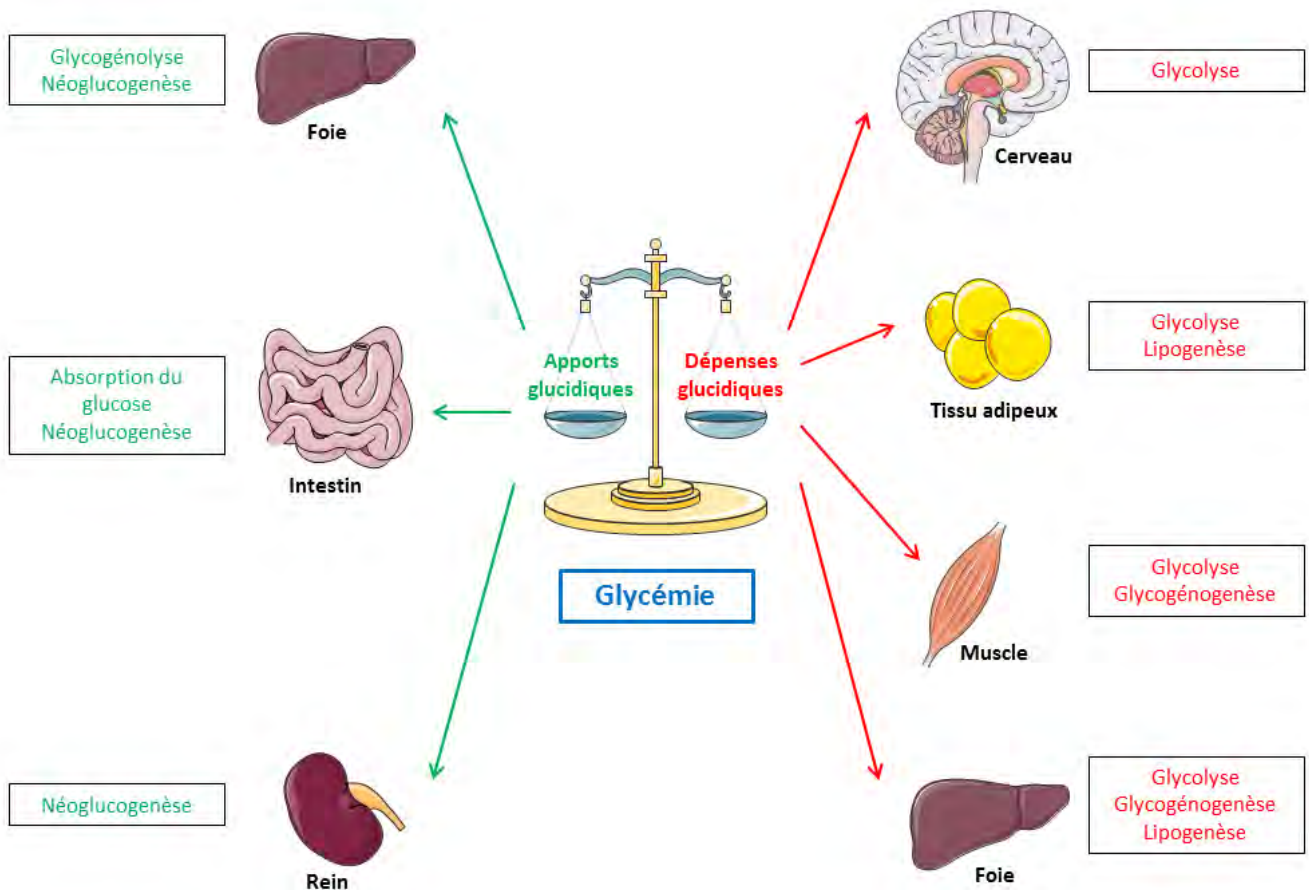


Figure 1: Balance glycémique.

De manière schématique le maintien constant de la glycémie est le résultat d'un équilibre entre l'entrée du glucose dans le sang et sa sortie. Lors de la prise alimentaire, les apports glucidiques proviennent de l'absorption intestinale de glucose. En revanche, lors d'une période de jeûne ou lors d'un effort physique, certains organes tels que le foie, l'intestin et le rein sont capables de produire du glucose via la glycogénolyse et/ou la néoglucogénèse. Après son absorption intestinale, le glucose sanguin va être transporté dans les tissus afin d'y être utilisé via la glycolyse. Parmi eux, le cerveau, le tissu adipeux, le muscle et le foie sont de forts consommateurs de glucose. Enfin, lorsque l'entrée de glucose est supérieure aux besoins cellulaires, 2 voies métaboliques de stockage vont être mises en jeu. Il va en effet pouvoir être stocké sous forme de glycogène via la glycogénogénèse par le muscle et le foie. Le glucose va également être converti en acides gras lors de la lipogénèse au niveau du tissu adipeux et du foie, ces lipides seront majoritairement stockés dans le tissu adipeux.

a) Mécanismes de transport du glucose

Parmi les organes impliqués dans le contrôle de l'homéostasie glucidique, l'intestin tient une place primordiale. En effet, ce dernier joue le rôle d'une véritable interface entre les nutriments ingérés lors d'une prise alimentaire et le reste de l'organisme. C'est donc à ce niveau que le glucose

ingéré sera absorbé (voir Partie 2, point IV-2)) pour ensuite se retrouver dans la circulation sanguine, et ainsi pouvoir être utilisé par l'organisme. En plus de son rôle dans l'absorption du glucose, l'intestin est également capable de détecter spécifiquement le glucose *via* des senseurs glucidiques disposés tout le long de la paroi intestinale. Nous verrons dans la partie suivante de ce manuscrit, comment la détection intestinale de glucose par ces senseurs va entraîner l'activation de réponses endocriniennes et nerveuses permettant de signaler l'arrivée de glucose aux autres organes.

Après son absorption intestinale, le glucose sanguin doit être transporté dans les cellules afin d'y être utilisé. Cependant, les membranes plasmiques étant imperméables aux molécules polaires telles que le glucose, son passage vers l'intérieur de la cellule nécessite la présence de protéines de transport spécialisées. Chez les mammifères, deux classes de protéines de transport du glucose ont été identifiées : les Sodium GLucose co-Transporters (SGLTs) assurant son transport actif, et les GLucose Transporters (GLUTs) assurant sa diffusion facilitée [2]. Parmi les SGLTs, SGLT-1 et -2 co-transportent le glucose et le sodium vers l'intérieur de la cellule. En effet, le sodium étant expulsé vers l'extérieur de la cellule par une pompe ATPase, un gradient électrochimique se crée en faveur de son entrée dans la cellule. Ces transporteurs s'appuient donc sur ce gradient électrochimique pour co-transporter le glucose avec le sodium, et permettre l'entrée du glucose dans la cellule [3]. SGLT-1 est retrouvé à la membrane apicale des entérocytes de l'intestin grêle, et SGLT-2 est quant à lui exprimé à la membrane apicale des cellules épithéliales du tubule proximal rénal. Ainsi, ces deux transporteurs jouent un rôle majeur dans l'absorption intestinale et la réabsorption tubulaire rénale de glucose. Cependant, de par leur localisation restreinte, les SGLTs ne possèdent qu'une action limitée dans le transport du glucose à l'échelle de l'organisme. En revanche, la famille des protéines de transport par diffusion facilitée comprend 14 isoformes largement distribués, dont les plus caractérisés sont les GLUT-1 à -4 [3]. A l'état basal, les GLUTs possèdent un site de liaison au glucose faisant face à l'extérieur de la cellule. Lorsque le glucose se lie sur ce site, le transporteur change de conformation. Ceci entraîne l'exposition d'un deuxième site de liaison au glucose tourné vers l'intérieur de la cellule permettant ainsi le transfert de cette molécule selon son gradient de concentration. GLUT-1 est exprimé dans pratiquement tous les tissus de l'organisme, et est responsable du transport basal de glucose nécessaire à la survie des cellules. GLUT-2 est exprimé principalement dans les hépatocytes, les cellules β -pancréatiques et les entérocytes. Ce transporteur présentant une faible affinité pour le glucose, l'entrée de celui-ci dans ces cellules se fera proportionnellement à sa concentration plasmatique. A l'inverse, GLUT-3 présente une forte affinité pour le glucose et permet donc son entrée massive dans des tissus ayant une forte dépendance vis-à-vis de cette molécule, comme par exemple le cerveau. Enfin, GLUT-4 est également un transporteur ayant une forte affinité pour le glucose, et est exprimé dans les tissus sensibles à l'insuline tels que

les muscles squelettiques et le tissu adipeux. Ainsi, nous verrons plus tard que l'insuline va stimuler la translocation de GLUT-4 à la membrane plasmique de ces tissus, entraînant une augmentation de leur capacité à transporter le glucose d'un facteur 15 à 20 [4].

b) Mécanismes impliqués dans l'utilisation intracellulaire du glucose

Directement après son entrée dans la cellule, le glucose va subir une étape de phosphorylation par une hexokinase donnant ainsi du glucose-6-phosphate. Il s'agit d'une étape clef dans la régulation de la balance glucidique puisque cette phosphorylation va, premièrement empêcher le glucose de ressortir de la cellule, et deuxièmement permettre de maintenir sa concentration intracellulaire basse dans le but de favoriser son entrée. Le glucose-6-phosphate ainsi formé va servir de précurseur commun à différentes voies métaboliques, en fonction du statut énergétique de la cellule. La glycolyse va permettre la dégradation du glucose et la production d'énergie. La voie des pentoses phosphates va générer du ribose (permettant la synthèse d'acides nucléiques) et des coenzymes réduits (impliqués dans la biosynthèse de certains acides gras et d'acides aminés aromatiques). Lorsque l'entrée de glucose est supérieure aux besoins cellulaires, 2 voies métaboliques de stockage vont être mises en jeu. Il va en effet pouvoir être stocké sous forme de glycogène *via* la glycogénogenèse ou sous forme de lipide *via* la lipogenèse.

b.1) La voie des pentoses phosphates et la glycolyse

Tout d'abord, la cellule peut utiliser le glucose à des fins anaboliques *via* la voie des pentoses phosphates. En effet, cette voie va permettre la production de ribose entrant dans la composition des bases azotées des acides nucléiques. De plus, cette voie va également permettre la production de coenzymes réduits impliqués dans les réactions réductrices de synthèses de certains acides gras, d'acides aminés aromatiques et de cholestérol.

La glycolyse est une voie métabolique permettant la production d'énergie à partir du glucose. Elle se déroule entièrement dans le cytosol de la cellule. La glycolyse consiste en l'oxydation progressive d'une molécule de glucose à 6 carbones en deux molécules de pyruvate à 3 carbones. Ce processus biochimique a pour but d'entraîner directement la production d'énergie sous forme de 2 molécules d'ATP. En condition anaérobie stricte, le pyruvate va être converti en lactate et relargué dans le sang par la cellule. En condition aérobie, le pyruvate sera converti en acétyl-coA et entièrement oxydé dans le cycle de Krebs au niveau de la mitochondrie, permettant ainsi la

génération de coenzymes réduits (NADH, H⁺). Ces derniers permettront ultérieurement la production de molécules d'ATP supplémentaires au niveau de la chaîne respiratoire. Le stock d'ATP ainsi formé va permettre de fournir l'énergie nécessaire à l'ensemble des réactions biochimiques cellulaires. En effet, la totalité des cellules consomme du glucose afin d'assurer leur survie et leurs fonctions. Cependant, la dépendance vis-à-vis de ce substrat énergétique varie d'un type cellulaire à l'autre. Ainsi, les muscles squelettiques consomment la majorité du glucose circulant et ceci notamment au cours d'un exercice physique. Ces derniers sont toutefois capables d'utiliser d'autres substrats énergétiques, tels que les lipides, pour fonctionner. En revanche, comme nous l'avons mentionné précédemment, le cerveau est presque strictement dépendant du glucose pour sa survie et son bon fonctionnement. Le foie et le tissu adipeux sont aussi de forts consommateurs de glucose.

b.2) Glycogénogenèse et lipogenèse

En période postprandiale, lorsque le glucose se retrouve en excès dans la cellule, deux voies de stockage de celui-ci vont être possibles. Il va en effet pouvoir être stocké sous forme de glycogène *via* la glycogénogenèse ou sous forme de lipide *via* la lipogenèse.

Le glycogène formé lors de la glycogénogenèse est un polymère de molécules de glucose unies par des liaisons O-glycosidiques intra-chaîne (α 1-4) et inter-chaîne (α 1-6). Dans un premier temps, cette voie métabolique entraîne la transformation du glucose-6-phosphate en glucose-1-phosphate. Par la suite, le glucose-1-phosphate sera greffé à un groupement Uridine DiPhosphate (UDP) permettant son transfert sur une molécule de glycogène en cours de formation. Les seuls organes capables d'accumuler le glycogène, qui représente donc la forme de stockage du glucose dans les cellules animales, sont les muscles et le foie.

La capacité de stockage énergétique sous forme de glycogène étant restreinte à ces deux tissus, le glucose en excès va aussi pouvoir être stocké sous forme de triglycérides *via* la lipogenèse. Cette voie métabolique va utiliser le pyruvate produit par la glycolyse pour le transformer en citrate à l'intérieur de la mitochondrie puis en acétyl-CoA dans le cytosol. Ce dernier va permettre la synthèse d'acides gras à chaînes longues. Dans le tissu adipeux, ces acides gras vont se fixer à un squelette de glycérol et constituer les triglycérides intracellulaires. En condition physiologique, le stockage du glucose sous forme de lipide se fait uniquement dans le tissu adipeux. Le foie, est lui aussi capable de produire des acides gras à chaînes longue *via* la lipogenèse, cependant, ceux-ci vont rejoindre la circulation sanguine pour atteindre le tissu adipeux où ils seront stockés sous forme de triglycérides.

Le stockage intra-hépatique de lipides n'est observé qu'en condition pathologique chez l'Homme, conduisant ainsi à une stéatose hépatique [5].

c) *Mécanismes de production du glucose*

Enfin, lors d'une période de jeûne ou lors d'un effort physique, une production de glucose est nécessaire pour le maintien de la glycémie à sa valeur physiologique. Dans un premier temps les stocks de glycogène vont pouvoir être dégradés lors de la glycogénolyse afin de fournir du glucose-6-phosphate. Nous venons de voir que seuls deux tissus sont capables de stocker le glucose sous forme de glycogène : le foie et les muscles. Cependant, ces deux tissus ne vont pas utiliser le glycogène de la même façon. En effet, du fait de la présence de la glucose-6-phosphatase dans le foie, le glucose-6-phosphate formé va être transformé en glucose. Ce dernier va pouvoir regagner la circulation sanguine et participer au contrôle de la glycémie. En revanche dans le muscle, non seulement cette glucose-6-phosphate n'est retrouvée qu'en très faible quantité mais en plus cette dernière possède une faible activité catalytique [6]. Ainsi, dans le muscle, le glucose-6-phosphate formé lors de la glycogénolyse ne sera utilisé que par lui-même *via* la glycolyse.

Dans un second temps, lorsque les stocks de glycogène sont épuisés, l'organisme est capable d'une production endogène de glucose à partir de substrats non glucidiques, il s'agit de la néoglucogenèse. Les substrats de base sont principalement le lactate produit lors de la glycolyse, le glycérol obtenu lors de l'hydrolyse des triglycérides, et les acides aminés libérés lors de la protéolyse musculaire. La plupart des réactions de la néoglucogenèse sont des réactions inverses à celles de la glycolyse et vont aboutir à la formation de glucose-6-phosphate. Comme vu précédemment, la présence de glucose-6-phosphatase permet la transformation de ce dernier en glucose. Or, la présence de cette enzyme est restreinte à trois organes : le foie, les reins et l'intestin. Ces organes n'ont cependant pas la même importance ni les mêmes rôles dans le maintien de l'homéostasie glucidique. En effet, le foie est généralement considéré comme le principal producteur de glucose à jeun. Il est le seul organe capable de mobiliser du glucose à la fois *via* la glycogénolyse et *via* la néoglucogenèse. Ainsi, au bout de 5-6h de jeûne, il est responsable de près de 80% de la production endogène de glucose contre 5 à 20% pour le rein. Enfin, depuis une quinzaine d'année, l'intestin a également été identifié comme un organe producteur de glucose [7]. La part de celui-ci dans les périodes post-absorptives (5 à 6h de jeun) est faible mais peut monter jusqu'à 35% lors de jeûnes prolongés chez le rat [7, 8]. Alors que la néoglucogenèse hépatique et rénale vont permettre l'approvisionnement en glucose au reste de l'organisme, la néoglucogenèse intestinale va surtout

avoir un rôle de voie de signalisation. En effet, cette néoglucogénèse va aboutir à la libération de glucose dans la veine porte qui collecte le sang provenant de l'intestin. A ce niveau, le glucose va être détecté par des cellules spécialisées qui vont transmettre le signal au cerveau et donc permettre d'informer l'organisme de l'état nutritionnel (voir Partie 3, point II-4)).

II- Régulation endocrine du métabolisme glucidique

L'équilibre entre toutes les voies que nous venons de décrire est nécessaire au maintien de la glycémie à des valeurs physiologiques. Cet équilibre est possible grâce à l'existence de régulations fines impliquant différents signaux, dont les signaux endocriniens.

1) Hormones pancréatiques

Les 2 hormones impliquées dans le contrôle du métabolisme glucidique les plus connues sont l'insuline et le glucagon. Ces 2 hormones sont produites par le pancréas, et plus précisément par les cellules α et β des îlots de Langerhans. L'insuline et le glucagon ont des effets totalement opposés sur la glycémie. En effet, l'insuline est la principale hormone hypoglycémisante synthétisée par l'organisme, et joue un rôle anabolique majeur dans la mise en réserve des substrats glucidiques. A l'inverse, le glucagon va permettre la libération de glucose en réponse à une baisse de la glycémie.

a) *Insuline*

L'insuline est sécrétée par les cellules β pancréatiques, qui représentent environ 55% des cellules des îlots de Langerhans. Ces cellules possèdent la particularité de pouvoir détecter une augmentation des taux de glucose sanguin, et d'y répondre par l'exocytose de vésicules d'insuline. Le glucose pénètre dans la cellule β selon son gradient de concentration *via* GLUT-2. Par la suite, ce glucose va être phosphorylé en glucose-6-phosphate par l'hexokinase IV. Cette glucokinase joue un rôle clef de gluco-senseur, étant donné qu'elle permet aux cellules β d'ajuster leur production de glucose-6-phosphate en fonction des taux de glucose. En effet, le gène de l'hexokinase IV est constitutivement transcrit dans les cellules β . Cependant, son activité est régulée par une accélération du transport du glucose dans les cellules β [9, 10]. Ainsi, il en résulte une augmentation des taux de glucose-6-phosphate en période postprandiale, lorsque la glycémie est élevée. Ce

glucose-6-phosphate est ensuite utilisé dans la voie de la glycolyse et de la respiration mitochondriale, générant une production accrue d'ATP, et conduisant à la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants (canaux K_{ATP}). Cette fermeture des canaux K_{ATP} va dépolariser la membrane des cellules β , ouvrir les canaux calciques voltage dépendants, et provoquer l'exocytose des vésicules d'insuline (**Figure 12**).

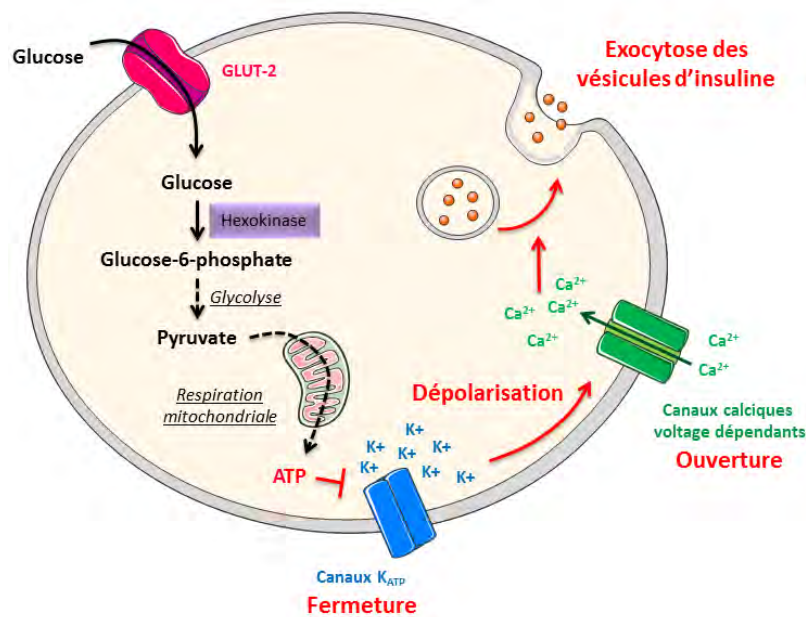


Figure 2: Sécrétion d'insuline par la cellule β pancréatique.

L'entrée de glucose dans la cellule β pancréatique est immédiatement suivie de sa phosphorylation par une hexokinase spécifique. Le métabolisme du glucose-6-phosphate ainsi formé va aboutir à une augmentation du taux intracellulaire d'ATP. Ceci provoque la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants (canaux K_{ATP}) entraînant une accumulation des ions potassiques (K^+) dans la cellule, et donc, une dépolarisation de cette dernière. Il en résulte une ouverture des canaux calciques voltage dépendants: les ions calcium (Ca^{2+}) entrent massivement dans la cellule et déclenchent l'exocytose des vésicules contenant l'insuline.

Une fois sécrétée, l'insuline va jouer un rôle anabolique majeur dans la mise en réserve et l'utilisation du glucose. Ces effets résultent de sa liaison à un récepteur transmembranaire à activité tyrosine-kinase, principalement exprimé par les tissus dits insulino-sensibles, à savoir le foie, les muscles et le tissu adipeux [11]. Tout d'abord, l'un des effets les plus étudié de l'insuline, est sa capacité à augmenter le transport de glucose dans le muscle et le tissu adipeux en stimulant la translocation de GLUT-4 à la membrane plasmique [12]. En effet, dans ces tissus, GLUT-4 est présent dans des vésicules intracellulaires qui fusionnent avec la membrane plasmique en réponse à l'insuline [13]. En plus d'augmenter l'entrée du glucose dans ces tissus, l'insuline va également stimuler son utilisation en amplifiant l'activité d'enzymes limitantes de la glycolyse (telles que la

glucokinase) [12]. L'insuline va également augmenter le stockage de glucose dans le foie, les muscles et le tissu adipeux, en stimulant la glycogénogenèse et la lipogenèse, et en inhibant la glycogénolyse. Enfin, l'insuline va inhiber la néoglucogenèse dans le foie. Cette action directe de l'insuline sur les organes spécialisés dans le métabolisme glucidique est renforcée par son action centrale. En effet, l'insuline circulante est capable de traverser la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE) *via* un système de transporteurs saturables [14, 15]. Elle va donc pouvoir atteindre le Système Nerveux Central (SNC) où son récepteur est fortement exprimé, en particulier dans l'hypothalamus, une structure centrale clef impliquée dans le contrôle de l'homéostasie glucidique (voir point III-1)) [16]. Une infusion d'insuline dans le troisième ventricule cérébral entraîne une forte diminution de la production hépatique de glucose [17], ainsi qu'une augmentation de la synthèse de glycogène musculaire [18]. De plus, les souris invalidées pour le récepteur à l'insuline dans tous les neurones du SNC (souris NIRKO) développent une obésité et une insulino-résistance [19]. Les mêmes conséquences ont été observées chez des souris uniquement invalidées pour ce récepteur dans l'hypothalamus, démontrant ainsi le rôle primordial de cette structure dans les effets centraux de l'insuline [20]. Afin d'identifier les neurones impliqués, des souris invalidées pour son récepteur spécifiquement dans les neurones exprimant la Pro-OpiomélanoCortin (POMC) ou l'Agouti-Related Protein (AgRP) dans l'hypothalamus, ont été générées. Il a été mis en évidence que la suppression de la production hépatique de glucose engendrée par l'insuline était perdue chez les animaux n'exprimant pas son récepteur dans les neurones à AgRP, alors que sa présence dans les neurones à POMC ne semble pas requise dans cet effet de l'insuline [21].

b) Glucagon

En réponse à une baisse de la glycémie, le pancréas est capable de sécréter une seconde hormone dont les effets sont opposés à ceux de l'insuline, il s'agit du glucagon. Celui-ci est sécrété par les cellules α pancréatiques, qui représentent 35% des cellules des îlots de Langerhans. Une fois dans la circulation sanguine, le glucagon va activer les voies productrices de glucose afin d'élever la glycémie. Bien que son récepteur, qui fait parti de la famille des Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG), soit présent sur un grand nombre de tissus, le glucagon va principalement cibler le foie. Ainsi, cette hormone hyperglycémisante va stimuler la libération de glucose par le foie, en activant la glycogénolyse et la néoglucogenèse. A l'inverse, le glucagon va inhiber toutes les voies consommatrices de glucose, telles que la glycolyse et la glycogénogenèse [22]. Tout comme l'insuline, le glucagon est capable de passer la BHE et son récepteur est présent dans l'hypothalamus

[22, 23]. Concernant son effet, une injection intracérébroventriculaire (icv) de glucagon provoque une hyperglycémie dose dépendante chez le rongeur [24].

D'un point de vue régulation, il existe une balance étroite entre la sécrétion d'insuline et de glucagon par le pancréas. Tout d'abord, chacune de ces 2 hormones est capable d'inhiber la production de l'autre, *via* des mécanismes paracrines [25]. Ainsi, dans des conditions d'hyperglycémie, l'insuline va inhiber la libération de glucagon par les cellules α . A l'inverse, en réponse à une baisse de la glycémie, le glucagon va inhiber la production d'insuline par les cellules β . En parallèle, la libération de ces 2 hormones est très finement contrôlée par l'hypothalamus, sous contrôle du Système Nerveux Autonome (SNA). Ces mécanismes seront abordés dans la suite de ce manuscrit (voir point III-2)). Ainsi, l'insuline et le glucagon, en agissant directement sur les tissus impliqués dans le contrôle du métabolisme glucidique, ou indirectement *via* l'activation du SNC, permettent l'adaptation rapide de l'organisme aux fluctuations du glucose.

2) Hormones gastro-intestinales

Le tractus Gastro-Intestinal (GI) constitue le plus grand organe endocrine de l'organisme. Il libère une vingtaine d'hormones différentes qui influencent un bon nombre de processus physiologiques, dont l'homéostasie glucidique. En effet, dès 1964, il a été observé que chez des sujets sains, l'administration orale de glucose induit une sécrétion d'insuline 3 à 4 fois plus importante que celle administrée par voie veineuse, définissant ainsi l'effet incrétine [26]. Parmi les hormones GI, il est maintenant bien établi que le Glucagon Like Peptide-1 (GLP-1) et le Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP) constituent les 2 principales incrétines responsables de cet effet.

Le GLP-1 est produit suite au clivage du proglucagon présent au niveau du pancréas, de l'intestin et des neurones [27]. Selon les tissus considérés, les proconvertases clivent le proglucagon en différents peptides. Cela explique la présence de GLP-1 dans l'intestin et le cerveau, et son absence dans le pancréas, où l'on retrouvera un grand peptide nommé Major ProGlucagon Fragment (MPGF) dont la fonction reste encore inconnue [27, 28]. Plus précisément, au niveau intestinal, le GLP-1 est produit par les cellules L. La distribution de ces cellules varie selon les espèces, chez l'Homme elles sont essentiellement distales (iléon, côlon proximal), alors que chez la souris elles sont plus proximales et distribuées dans le jéjunum et le côlon [29]. Au niveau central, le GLP-1 est produit par le Noyau du Tractus Solitaire (NTS), et est donc secrété par les terminaisons nerveuses se

projetant sur les noyaux de l'hypothalamus. Le GIP quant à lui, est produit au niveau duodénal par les cellules K, et au niveau central dans l'hippocampe [30].

Pendant les périodes de jeûne, les taux d'incrétines sont faibles. En revanche, dès les premières minutes après l'absorption des nutriments, leurs taux circulants augmentent rapidement [31]. Ainsi le stimulus majeur responsable de la sécrétion de GLP-1 et GIP semble être l'arrivée de nutriments dans la lumière intestinale [32, 33]. Dans ce manuscrit, nous aborderons uniquement l'implication du « glucosensing » intestinal dans la libération de ces incrétines (voir Partie 3, point III.). A côté de cette détection intestinale de glucose, il existerait des relais nerveux et endocriniens, de la partie proximale de l'intestin vers la partie distale, pour stimuler la sécrétion de GLP-1. En effet, une fois sécrété suite à l'arrivée de nutriments dans l'intestin, le GIP est capable de stimuler la production de GLP-1 par les cellules L [34]. De la même façon, les souris invalidées pour le récepteur au GIP, présentent une sécrétion de GLP-1 diminuée [35]. D'autre part, il a également été démontré une baisse de la sécrétion de GLP-1 chez des souris déficientes pour le récepteur au GLP-1 [35]. Ainsi, ces résultats confirment que les incrétines sont capables de contrôler leur propre sécrétion. Concernant la partie nerveuse de cette régulation, la stimulation électrique du nerf vague, qui innerve le tractus GI, entraîne la sécrétion de GLP-1 [36]. A l'inverse, dans la même étude, les animaux ayant subi une vagotomie ne sécrètent plus de GLP-1, que ce soit en réponse à des nutriments ou à une infusion de GIP. Ainsi, l'hypothèse suivante a été émise : une fois sécrété dans le duodénum en réponse aux nutriments, le GIP activerait le nerf vague *via* des mécanismes encore peu décrits. Cette information nerveuse serait alors transmise au cerveau. Celui-ci enverrait à son tour une réponse nerveuse aux cellules L intestinales *via* le nerf vague, provoquant ainsi la sécrétion de GLP-1 [37].

Une fois libérés par les cellules intestinales, le GLP-1 et le GIP vont d'abord se retrouver dans la circulation portale, puis rapidement dans la circulation sanguine générale. Toutefois, ces incrétines sont très vite dégradées par une enzyme, la DiPeptidyl-Peptidase IV (DPP-IV), qui va générer des peptides inactifs, diminuant ainsi les activités de ces hormones [38]. Bien que leur demi-vie dans la circulation sanguine soit courte (environ 3 minutes), le GLP-1 et le GIP vont tout de même pouvoir lier leurs récepteurs respectifs afin d'exercer leurs effets physiologiques. Leurs récepteurs appartiennent à la famille des RCPG et sont retrouvés dans un grand nombre d'organes, tels que le pancréas, l'intestin, l'estomac, le tissu adipeux, ainsi que dans plusieurs régions centrales comme l'hypothalamus et le tronc cérébral [27, 30].

Comme nous l'avons mentionné plus haut, le GLP-1 et le GIP sont responsables de l'effet incrétine. Il s'agit de la capacité de ces hormones GI, libérées dans la circulation sanguine, à

augmenter la sécrétion d'insuline par le pancréas en réponse au glucose. En effet, des expériences chez l'Homme, où ces 2 hormones GI sont infusées en même temps avec une perfusion intraveineuse (iv) de glucose, ont permis de mettre en évidence que celles-ci étaient capables de provoquer une sécrétion d'insuline au point d'expliquer entièrement la réponse insulinémique [39, 40]. En revanche, cette réponse est abolie suite à l'utilisation d'antagonistes des récepteurs au GLP-1 et au GIP [29, 41]. Concernant les mécanismes moléculaires impliqués, les incrétines agissent directement sur les cellules β pancréatiques [29]. En se fixant sur leurs récepteurs respectifs, le GLP-1 et le GIP entraînent une augmentation des taux d'AMP cyclique (AMPC) intracellulaires, la fermeture des canaux K_{ATP} , provoquant la dépolarisation de la cellule, suivie d'une entrée massive de calcium et donc de l'exocytose des vésicules d'insuline. En revanche, lorsque la glycémie baisse, le GLP-1 inhibe fortement la sécrétion de glucagon par les cellules α pancréatiques [29]. Concernant ce dernier point, les mécanismes restent encore peu connus. Bien que les incrétines aient pour effet majeur de favoriser la tolérance au glucose *via* leur action sur le pancréas, ces 2 hormones ont également des effets extra-pancréatiques (**Figure 3**). Tout d'abord, il a été montré que ces facteurs pouvaient agir directement sur la sphère GI. En effet, le GLP-1 est un puissant inhibiteur de la vidange gastrique, mesurée chez des volontaires sains normoglycémiques [42]. Cette diminution de la vidange gastrique entraîne un ralentissement du transit des nutriments de l'estomac à l'intestin, permettant ainsi de limiter l'hyperglycémie postprandiale, et donc de contribuer à la normalisation de la glycémie. Au-delà du système digestif, les incrétines peuvent également cibler le foie. Lors d'un clamp hyperglycémique avec du glucose radiomarqué, les souris traitées avec du GLP-1 présentent une diminution de la production hépatique de glucose [43]. Chez ces souris, cet effet est associé à une augmentation du marquage du glucose radioactif dans le foie, ainsi que de la synthèse de glycogène hépatique. Toutes ces constatations indiquent que le GLP-1 dans le foie est capable d'inhiber la production de glucose, au profit de son stockage. Un autre tissu dit insulino-sensible ciblé par les incrétines est le tissu adipeux. En effet, la co-stimulation d'adipocytes, *in vitro*, avec de l'insuline et du GIP provoque la translocation de GLUT-4 à la membrane plasmique, démontrant ainsi que le GIP peut augmenter la sensibilité à l'insuline du tissu adipeux [44]. Concernant le GLP-1, il induit une augmentation de l'entrée de glucose stimulée par l'insuline dans ce tissu, et est également capable d'y favoriser la synthèse de glycogène ainsi que l'oxydation du glucose [45].

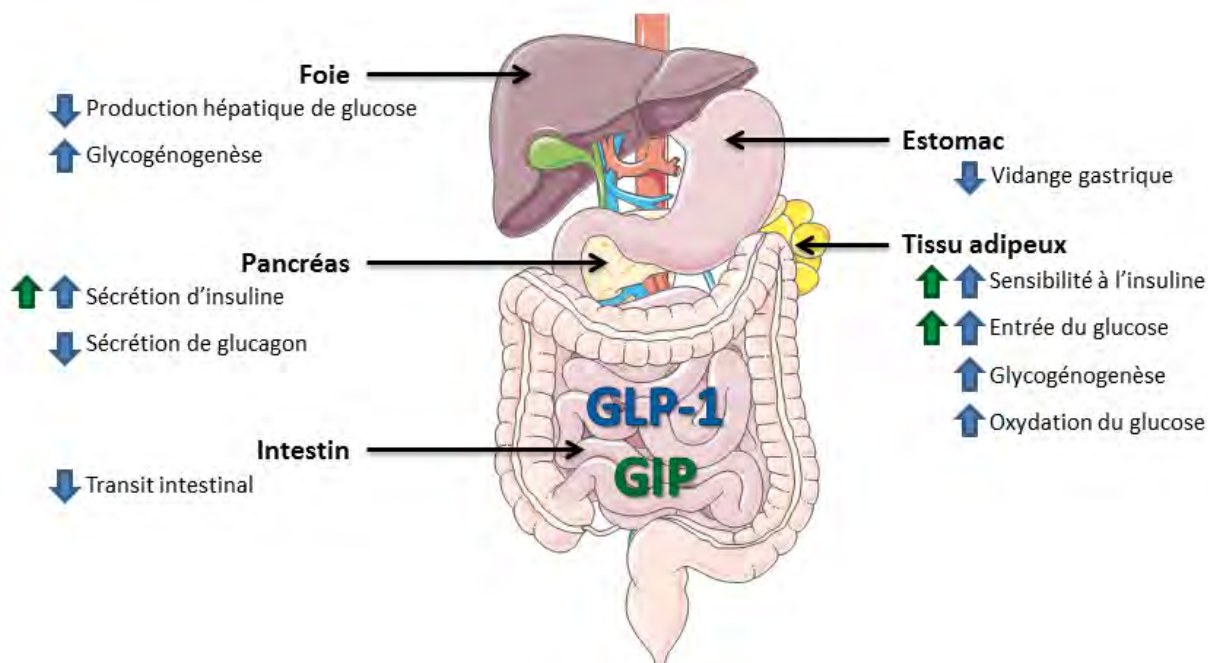


Figure 3: Effets des incrétines sur le métabolisme glucidique.

Sécrétés en réponse à l'arrivée des nutriments dans l'intestin, le GLP-1 et le GIP vont activement participer au maintien de la glycémie. Ces 2 hormones GI sont notamment responsables de l'effet incrétine, c'est-à-dire de l'augmentation de la sécrétion d'insuline par le pancréas en réponse au glucose ingéré. De plus, ces 2 peptides vont également augmenter la sensibilité à cette hormone des tissus dits insulino-sensibles. Par ailleurs, le GLP-1 va inhiber la production du glucose par le foie au profit de son stockage, et va ralentir la vidange gastrique et le transit intestinal. Tous ces effets vont ainsi permettre de limiter l'hyperglycémie postprandiale, et donc de contribuer à la normalisation de la glycémie.

Ainsi, les incrétines libérées dans la veine porte peuvent directement cibler les tissus pour contrôler le métabolisme du glucose. Cependant, comme nous l'avons déjà mentionné, celles-ci vont rapidement être dégradées dans la veine porte en peptides non actifs. Il est donc peu probable que l'ensemble des effets de ces incrétines sur la glycémie s'expliquent uniquement par une action directe sur les organes impliqués dans le métabolisme glucidique. Et effectivement, comme nous l'expliquerons en détail dans la suite de ce manuscrit (voir Partie 3), les incrétines vont aussi pouvoir activer les neurones entériques et les terminaisons nerveuses afférentes innervant le tractus GI. De cette manière, ces hormones vont recruter l'axe « intestin-cerveau » afin d'exercer leur rôle crucial dans l'homéostasie glucidique.

III- Régulation nerveuse du métabolisme glucidique

1) Généralités

Une fois de plus, Claude Bernard sera le premier à mettre en évidence le rôle du cerveau dans le contrôle de l'homéostasie glucidique. En 1849, il va réaliser une expérience consistant à stimuler à l'aide d'une aiguille, le plancher du quatrième ventricule où le nerf vague a son origine. Il va en résulter une élévation très importante de la glycémie [46]. Il faudra attendre quelques années de plus pour préciser la zone centrale impliquée dans cet effet, à savoir l'hypothalamus. Il est maintenant clairement établi que l'hypothalamus, en recevant en permanence des signaux provenant de la périphérie et en y répondant de façon adaptée, est une structure clef impliquée dans le contrôle de l'homéostasie glucidique.

L'hypothalamus est une petite structure (quelques centimètres cubes chez l'Homme) située sur la face ventrale de l'encéphale. Anatomiquement, il se trouve au centre du cerveau, au-dessus du tronc cérébral et à la base du diencephale, formant ainsi les parois latérales et le plancher du troisième ventricule (**Figure 4**). Il est délimité à l'avant par les chiasmas optiques et à l'arrière par le mésencéphale. Comme son nom l'indique, il se trouve en dessous du thalamus dont il est séparé par le sillon hypothalamique. Il se termine ventralement par l'éminence médiane, une zone où la BHE est physiologiquement « perméable ». La BHE est une structure complexe, formée par des cellules endothéliales spécialisées, empêchant ainsi l'exposition directe des tissus nerveux à la circulation sanguine. Cette protection du « milieu central » vis-à-vis du « milieu périphérique » permet ainsi au cerveau d'être maintenu dans un environnement stable, nécessaire à son développement et à son fonctionnement. L'éminence médiane hypothalamique constitue une véritable fenêtre du cerveau, autorisant le passage de molécules provenant de la circulation sanguine, et conférant ainsi à l'hypothalamus un rôle clef dans la détection des informations périphériques [47]. Enfin, l'hypothalamus entretient une relation étroite avec l'hypophyse *via* la tige pituitaire, formant ainsi l'axe hypothalamo-hypophysaire. Cet axe de communication est à la base de la neuroendocrinologie de l'organisme. De par sa localisation stratégique, l'hypothalamus est donc au centre du dialogue entre la périphérie et le SNC. D'une part, l'hypothalamus détecte en permanence des informations provenant de la périphérie. D'autre part, l'intégration de ces informations par cette structure va déclencher l'activation du SNA et du système endocrinien, entraînant des modifications de l'activité des organes périphériques ciblés.

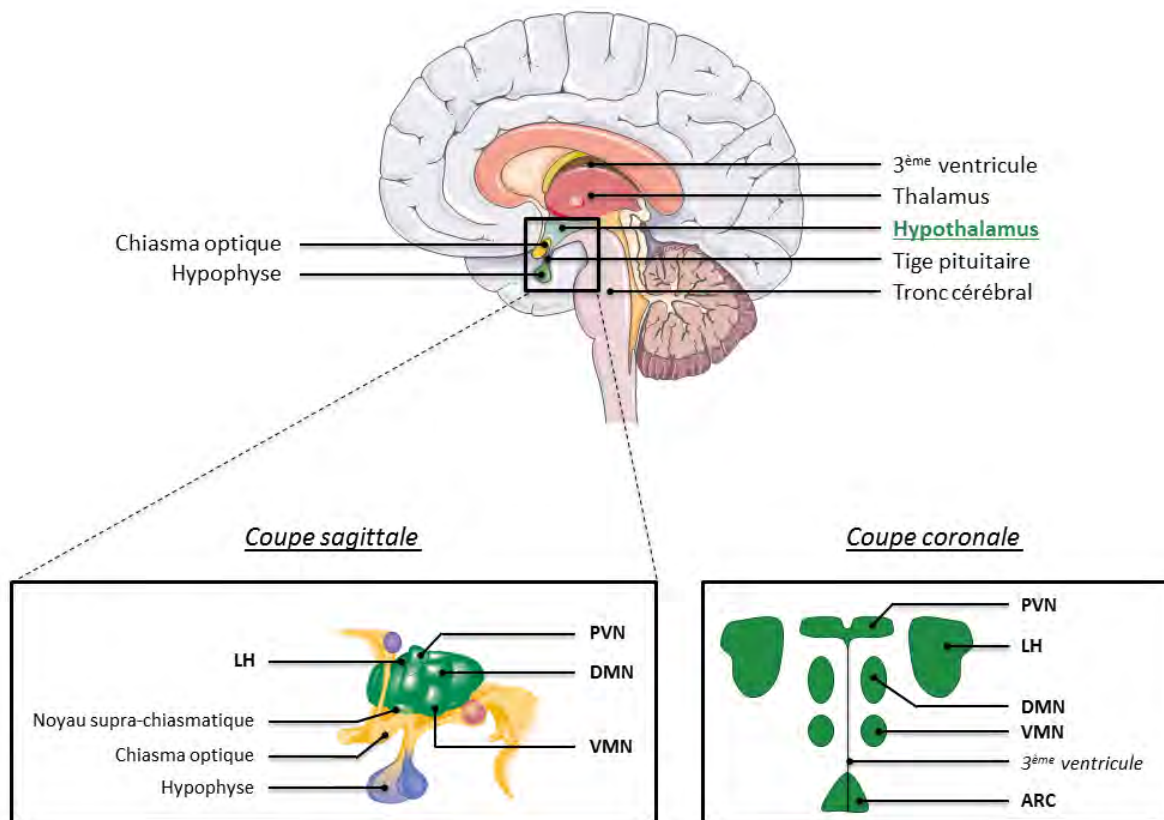


Figure 4: Localisation de l'hypothalamus et des différents noyaux hypothalamiques.

Une coupe sagittale de cerveau humain permet de situer la localisation anatomique de l'hypothalamus. Les coupes sagittales et coronales de ce dernier permettent de visualiser les principaux noyaux hypothalamiques impliqués dans le contrôle de l'homéostasie glucidique, à savoir le noyau arqué (ARC), le Noyau Para-Ventriculaire (PVN), le Noyau Ventro-Médian (VMN), le Noyau Dorso-Médian (DMN) et l'aire Hypothalamique Latérale (LH).

Au niveau organisationnel, l'hypothalamus se subdivise en de nombreux amas de neurones, appelés noyaux hypothalamiques. Ces noyaux, bien qu'ils soient distinctement individualisés, sont interconnectés de façon spécifique, permettant ainsi l'établissement de projections neurales vers d'autres structures, hypothalamiques et extra-hypothalamiques. Depuis les années 1940, les progrès dans les techniques chirurgicales de stéréotaxie, qui consistent à détruire sélectivement les différents noyaux hypothalamiques, ont permis d'identifier précisément leurs rôles [48]. Ainsi, les principaux noyaux hypothalamiques impliqués dans le contrôle de l'homéostasie glucidique sont le noyau arqué (ARC), le Noyau Para-Ventriculaire (PVN), le Noyau Ventro-Médian (VMN), le Noyau Dorso-Médian (DMN) et l'aire Hypothalamique Latérale (LH) (Figure 4).

2) Système nerveux autonome (SNA)

Le SNA ou système nerveux végétatif est la partie du système nerveux responsable des fonctions motrices non soumises au contrôle volontaire. Il innervent la totalité des organes de l'organisme et va donc permettre leur adaptation rapide aux besoins du moment. La partie efférente du SNA est divisée en 2 composantes aux fonctions le plus souvent antagonistes, le Système Nerveux orthosympathique ou Sympathique (SNS), qui intervient en général dans les situations d'alerte, et le Système Nerveux Parasympathique (SNP), qui agit plutôt comme en frein. De plus, ces 2 systèmes vont également différer par la situation de leurs ganglions. Ainsi, les neurones pré-ganglionnaires du SNS sont très courts et font synapse dans les ganglions des chaînes latéro-vertébrales. A l'inverse, dans le SNP, les neurones pré-ganglionnaires sont très longs et font synapse dans les ganglions qui sont proches de l'organe cible. Étant donné que les noyaux hypothalamiques vont se projeter sur les neurones pré-ganglionnaires ortho- et parasympathiques, l'hypothalamus va exercer une influence importante sur l'activité du SNA. Le noyau hypothalamique LH va directement innervent les neurones pré-ganglionnaires du SNP. Le VMN, est lui, en connexion avec les fibres pré-ganglionnaires sympathiques, situées dans la colonne inter-médio-latérale de la moelle épinière. [49]. Dans une moindre mesure, le DMN et le PVN vont également moduler l'activité du SNA. Le DMN reçoit des projections du LH et du VMN, alors que le PVN émet des projections à la fois sur les groupements médullaires parasympathiques et sur la colonne inter-médio-latérale sympathique au niveau thoraco-lombaire.

Concernant l'effet du SNA sur les tissus cibles, le SNS va libérer de la noradrénaline entraînant plutôt des actions cataboliques, alors que le SNP va quant à lui favoriser les réactions anaboliques par la sécrétion d'acétylcholine (**Figure 5**). Ainsi, le SNS va stimuler la sécrétion de glucagon par le pancréas, augmenter la glycolyse et la néoglucogenèse hépatique, augmenter la thermogenèse dans le tissu adipeux brun, et enfin, augmenter l'entrée de glucose dans le muscle ainsi que la glycolyse dans ce tissu. En revanche, le SNP va induire la sécrétion d'insuline par le pancréas et favoriser le stockage de glucose dans le tissu adipeux et le foie [50].

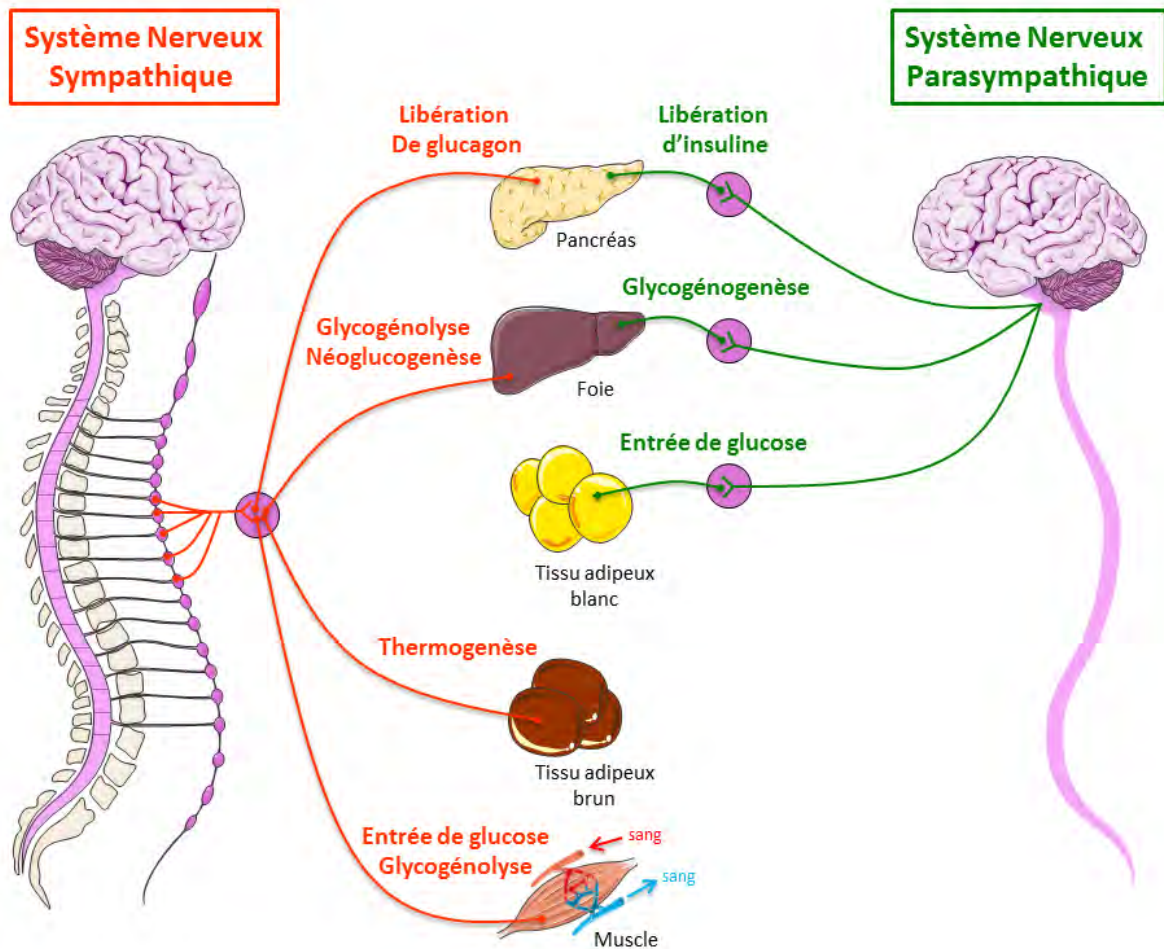


Figure 5: Système Nerveux Autonome (SNA) et métabolisme glucidique.

Le SNA est divisé en 2 systèmes, le Système Nerveux Sympathique (SNS) et le Système Nerveux Parasympathique (SNP), qui vont différer par la situation de leurs ganglions ainsi que par leurs actions antagonistes. En effet, les neurones pré-ganglionnaires du SNS sont très courts et font synapses dans les ganglions des chaînes latéro-vertébrales. Ce dernier, dit « système d'urgence » va stimuler la libération de glucagon par le pancréas ainsi que la production hépatique de glucose et son utilisation par le tissu adipeux brun et le muscle. A l'inverse, dans le SNP, les neurones pré-ganglionnaires sont très longs et font synapse dans des ganglions proches de l'organe cible. Ce système, dit « système de repos », va quant à lui provoquer la libération d'insuline et stimuler le stockage de glucose dans le foie et le tissu adipeux blanc.

3) Neuroendocrinologie

Comme nous l'avons précédemment évoqué, l'hypothalamus communique en permanence avec l'hypophyse *via* la tige pituitaire, qui est un faisceau de fibres nerveuses et de capillaires. L'hypophyse est une glande endocrine divisée en 2 lobes, la post-hypophyse ou neurohypophyse et l'antéhypophyse ou adénohypophyse. L'hypothalamus communique avec la neurohypophyse *via* des neurosécrétions transitant par le tractus hypothalamo-hypophysaire (**Figure 6**). Ainsi, les neurones

hypothalamiques à ocytocine et à vasopressine vont projeter leurs prolongements axonaux directement dans la neurohypophyse. Ces 2 neurohormones seront ensuite relarguées dans les capillaires sanguins, entrant par l'artère hypophysaire inférieure et sortant par la veine hypophysaire, pour ensuite rejoindre la circulation sanguine. En revanche, l'adénohypophyse est reliée à l'hypothalamus par un système vasculaire nommé système porte hypothalamo-hypophysaire (**Figure 6**). Celui-ci va permettre le transport de neurohormones sécrétées par l'hypothalamus, qui vont à leur tour stimuler la libération d'hormones par l'adénohypophyse. Ces hormones hypophysaires vont également se retrouver dans ce système porte hypothalamo-hypophysaire, ce qui leur permettra de rejoindre la circulation sanguine. Ainsi, l'hypothalamus va contenir, entre autres, des neurones à Thyrotrophin Releasing Hormone (TRH) et à Corticotrophin Releasing Hormone (CRH). Ces neurones, en stimulant l'adénohypophyse, vont provoquer la libération de Thyroïde Stimulating Hormone (TSH) et d'AdrenoCorticoTrophic Hormone (ACTH), respectivement. Enfin, la TSH va cibler la glande thyroïdienne engendrant la libération des hormones thyroïdiennes T3 et T4, alors que l'ACTH provoquera la sécrétion de glucocorticoïdes et de catécholamines par les glandes surrénales.

Par la nature de ses sécrétions hormonales, l'hypophyse va jouer un rôle essentiel dans le métabolisme glucidique. Les glucocorticoïdes et les catécholamines ont des effets métaboliques aboutissant à une augmentation de la disponibilité en énergie, notamment sous forme de glucose. Ainsi, ces hormones vont stimuler la production hépatique de glucose *via* la néoglucogenèse [51]. Les hormones thyroïdiennes sont également hyperglycémiantes. Par conséquent, elles vont stimuler l'absorption intestinale de glucose, ainsi que la production hépatique de glucose par la glycogénolyse et la néoglucogenèse [52, 53].

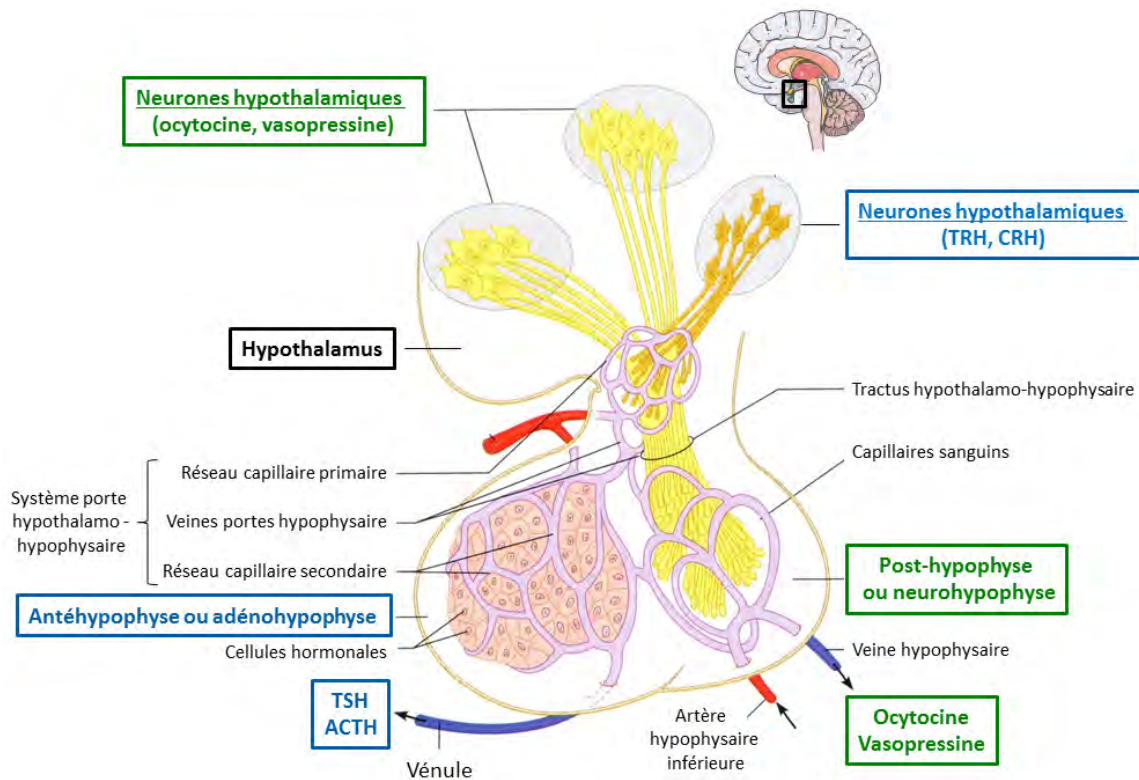


Figure 6: L'axe hypothalamo-hypophysaire.

Certains neurones hypothalamiques se projettent directement au niveau de la post-hypophyse (ou neurohypophyse) via le tractus hypothalamo-hypophysaire. C'est le cas des neurones libérant de l'ocytocine et de la vasopressine. Ainsi ces 2 neurohormones vont être relarguées dans les capillaires sanguins irriguant la post-hypophyse pour ensuite rejoindre la circulation sanguine. En revanche, d'autres neurones, comme les neurones à Corticotrophin Releasing Hormone (CRH) et à Thyrotrophin Releasing Hormone (TRH), vont sécréter leurs neurohormones dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. La CRH et la TRH vont à leur tour stimuler la libération d'AdenoCorticoTrophic Hormone (ACTH) et de Thyroïde Stimulating Hormone (TSH) respectivement, par l'antéhypophyse (ou adénohypophyse). Ces hormones hypophysaires vont également se retrouver dans le système porte hypothalamo-hypophysaire afin de joindre la circulation sanguine.

4) Types cellulaires et acteurs moléculaires principaux impliqués dans la détection centrale du glucose

Comme nous l'avons mentionné, l'hypothalamus est capable de recevoir un grand nombre d'informations provenant de la périphérie. Parmi elles, il va pouvoir spécifiquement détecter les variations de glucose grâce à des cellules spécialisées nommées gluco-senseurs. Après la détection de ce glucose, l'hypothalamus va pouvoir déclencher des réponses adéquates de la part des tissus périphériques impliqués dans le métabolisme glucidique, *via* l'activation des 2 systèmes que nous venons de décrire, le SNA et le système endocrinien.

a) Les types cellulaires

Dans les années 1950, Jean Mayer postule que le cerveau serait capable de détecter des variations de la glycémie, grâce à l'existence de récepteurs sensibles au glucose notamment au niveau hypothalamique [54]. Il faudra attendre une dizaine d'années pour que Oomura et al. montrent qu'effectivement, certains neurones hypothalamiques ont la particularité de réagir à des modifications de la concentration de glucose en modifiant leur activité [55].

a.1) Les neurones glucosensibles

Aujourd'hui, ces neurones spécialisés sont identifiés en tant que gluco-senseurs. Ils peuvent être classés en 2 catégories selon leur réponse à des changements physiologiques de la concentration en glucose, à savoir les neurones excités par le glucose (gluco-excités) et les neurones inhibés par le glucose (gluco-inhibés) [56]. Ainsi, pendant un repas, la concentration centrale de glucose va augmenter de 0,1 à 5mM, les neurones gluco-excités vont s'activer alors que les neurones gluco-inhibés vont rester inactifs. A l'inverse, lors d'une période de jeûne, la réduction de la concentration centrale de glucose de 5 à 0,1mM va activer les neurones gluco-inhibés et inhiber les gluco-excités [56]. Silver et Erecinska ont fourni la seule étude dans laquelle les taux centraux de glucose ont été mesurés simultanément à une manipulation des taux plasmatiques de glucose [57]. Ces auteurs ont pu montrer que des changements de glycémie périphérique étaient immédiatement suivis par des changements de concentration de glucose dans le cerveau. Ainsi, en condition physiologique, la concentration centrale de glucose oscille entre 1 et 2,5mM pour une glycémie sanguine de 5 à 8mM [58].

Dans l'hypothalamus, les neurones gluco-excités sont retrouvés dans la partie latérale de l'ARC où ils représentent 20 à 25% des neurones totaux de cette structure [59]. Les neurones gluco-excités et les cellules β pancréatiques partagent des similarités dans leur réponse au glucose [56]. En effet, le glucose entre dans ces neurones *via* GLUT-2 où il est converti en glucose-6-phosphate par une glucokinase, pour ensuite être utilisé dans la voie de la glycolyse créant ainsi de l'ATP. Cette augmentation des taux intracellulaires d'ATP inactive les canaux K_{ATP} , créant une dépolarisation de la membrane plasmique et donc l'ouverture des canaux calciques. Alors que l'entrée massive de calcium qui s'en suit est responsable de l'exocytose des vésicules d'insuline dans la cellule β pancréatique, cela entraîne une libération des neurotransmetteurs dans le cas des neurones gluco-excités (**Figure 7**). Parmi les acteurs impliqués dans la détection centrale de glucose, le rôle de GLUT-2 a clairement été établi. En effet, l'injection intra-carotidienne de glucose, qui ne peut être perçue

que par l'hypothalamus, entraîne chez le rat, une augmentation de l'insulinémie sans modification de la glycémie. L'inhibition spécifique de GLUT-2, par l'injection icv d'oligonucléotides anti-sens dirigés contre ce transporteur, supprime totalement cette réponse insulinémique en réponse au bolus intracarotidien de glucose [60]. En plus de GLUT-2, les neurones gluco-excités expriment d'autres transporteurs au glucose qui pourraient participer à ce « glucosensing » neuronal, comme le transporteur insulino-sensible GLUT-4 (exprimé par 75% des neurones gluco-excités) et SGLT-1 (retrouvé sur 25% de ces neurones) [61]. La glucokinase, elle aussi, semble jouer un rôle primordial dans le « glucosensing » neuronal. Cette enzyme est retrouvée dans 70% des neurones gluco-excités, et une perte de celle-ci par des approches utilisant des siRNA entraîne une diminution du nombre de neurones glucosensibles, à la fois les gluco-excités et les gluco-inhibés [62]. De plus, l'activation pharmacologique de cette glucokinase provoque une augmentation de l'activité des neurones gluco-excités et à l'inverse, une diminution de celle des neurones gluco-inhibés. Ainsi, l'activation de cette glucokinase suffit à augmenter la sensibilité des neurones glucosensibles. Enfin, les canaux K_{ATP} contribuent également au bon fonctionnement des neurones glucosensibles puisqu'ils permettent leur dépolarisation. Les souris invalidées pour la sous-unité Kir6.2 des canaux K_{ATP} possèdent des neurones gluco-excités incapables de répondre au glucose [63]. De plus, ces animaux présentent un défaut sévère dans la sécrétion de glucagon en réponse à une hypoglycémie systémique. L'ensemble de ces observations démontrent que les canaux K_{ATP} sont aussi impliqués dans les mécanismes de « glucosensing » neuronal.

Les neurones gluco-inhibés sont quant à eux localisés dans la partie médiane de l'ARC ainsi que dans le VMN [59]. A l'inverse des neurones gluco-excités, les neurones gluco-inhibés vont être excités par une diminution de la concentration centrale en glucose. Cependant, leur fonctionnement reste encore assez peu connu. Ainsi, il est établi que lorsque les taux centraux de glucose diminuent, la proportion de glucose entrant dans les neurones *via* les transporteurs GLUT-2 diminue également. Il y a donc moins de glucose empruntant la voie de la glycolyse et donc moins d'ATP cellulaire produit. A ce stade, il semblerait qu'un senseur particulier, l'AMP-activated Protein Kinase (AMPK), détecte la diminution du ratio ATP/ADP. L'activation de l'AMPK entraînerait l'inhibition des canaux chlore particuliers retrouvés dans les neurones gluco-inhibés, les Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) [64]. L'AMPK va également entraîner la production de monoxyde d'azote (NO), un neurotransmetteur gazeux, par la NO Synthase neuronale (nNOS) [65, 66]. Ce NO va à son tour activer le récepteur soluble guanylyl cyclase induisant une libération de Guanosine 3',5'-MonoPhosphate cyclique (cGMP) [67]. Ce cGMP permet de maintenir l'activation de l'AMPK qui inhibe alors le canal CFTR [68]. Cette fermeture empêche le courant entrant de chlore, provoquant ainsi la dépolarisation membranaire et donc l'activation des neurones gluco-inhibés.

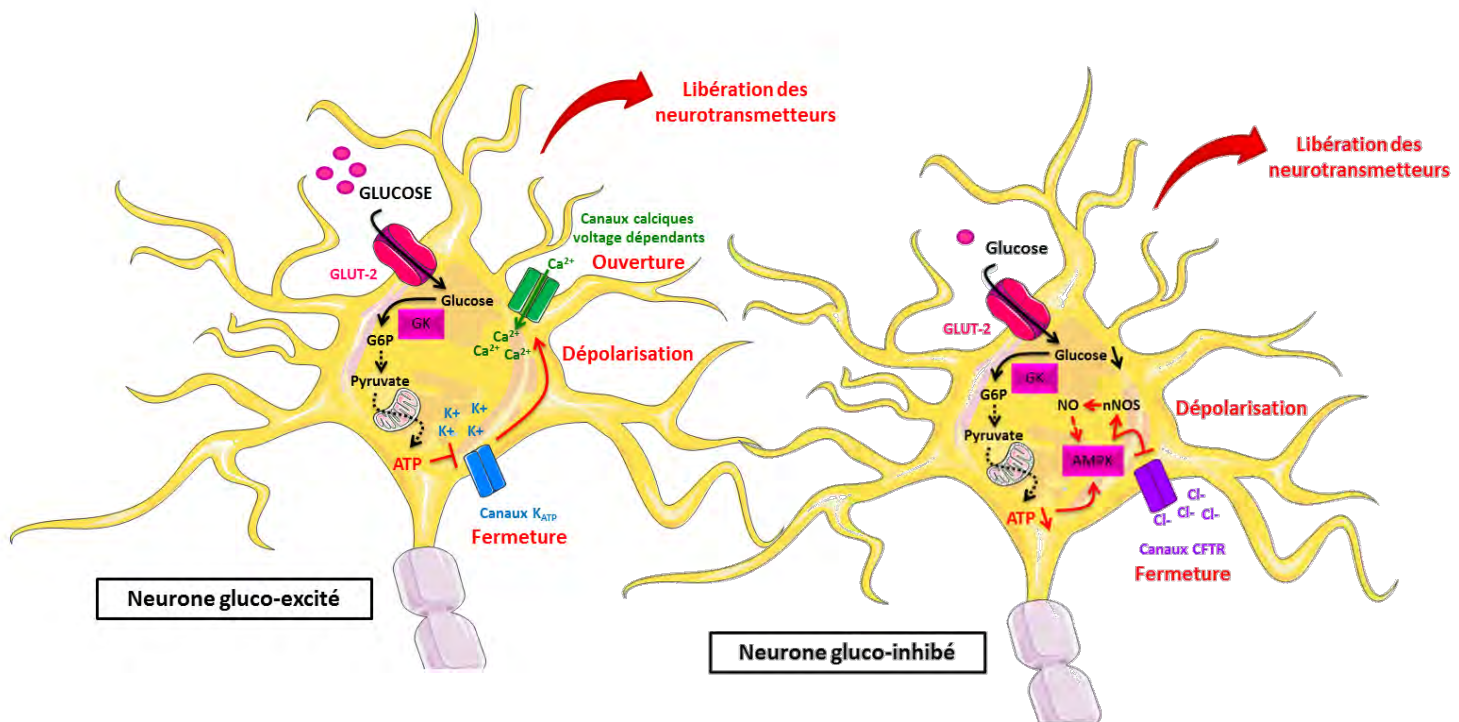


Figure 7: Les neurones glucosensibles.

Dans les neurones gluco-excités, le glucose entre *via* le GLucose Transporter-2 (GLUT-2) pour être converti en Glucose-6-Phosphate (G6P) par une glucokinase (GK), puis utilisé dans la glycolyse et la respiration mitochondriale pour générer de l'ATP. Cette augmentation d'ATP inactive les canaux potassiques ATP-dépendants (canaux K_{ATP}), provoquant une dépolarisation membranaire et l'ouverture des canaux calciques voltages-dépendant. Cet influx massif d'ions calcium à l'intérieur du neurone entraîne la libération des neurotransmetteurs. A l'inverse, les neurones gluco-inhibés sont sensibles à une diminution de la concentration centrale en glucose. Ainsi, il est établi que lorsque les taux centraux de glucose diminuent, la proportion de glucose entrant dans ces neurones *via* GLUT-2 diminue également, il y a donc moins de glucose entrant dans la voie de la glycolyse et donc moins de production d'ATP cellulaire. Cette diminution du ratio ATP/ADP est détectée par l'AMPK qui va inhiber l'inhibition de canaux chlore particuliers : les Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR). En parallèle l'AMPK va également activer la Nitric Oxide Synthase neuronale (nNOS), qui va libérer du monoxyde d'azote (NO). Ce NO va maintenir l'activation de l'AMPK. L'inhibition du canal CFTR par l'AMPK bloque le courant chlore entrant, provoquant ainsi la dépolarisation membranaire et donc la libération des neurotransmetteurs par ces neurones gluco-inhibés.

a.2) Les cellules gliales

A côté de cette détection centrale de glucose par les neurones glucosensibles, des évidences indiquent que les cellules gliales du SNC, en plus de leur rôle protecteur et nourricier vis-à-vis des neurones, sont également impliquées dans la détection de glucose. En effet, une injection intrapéritonéale (ip) de 2-Deoxy Glucose (2-DG) (un analogue non métabolisable du glucose) mimant une hypoglycémie périphérique, entraîne une augmentation du marquage c-Fos (un marqueur d'activité neuronale) dans les neurones. Cependant, ce marquage dans les neurones est réduit, quand les

animaux sont prétraités avec un inhibiteur spécifique du métabolisme des carbohydrates dans les cellules gliales [69]. Parmi les cellules gliales, les astrocytes hypothalamiques et les tanocytes bordant le troisième ventricule sont les plus étudiés [70, 71]. En effet, les tanocytes expriment GLUT-2, la glucokinase et les canaux K_{ATP} , suggérant le fait que ces cellules soient capables de détecter le glucose [59]. De plus, des études ont montré que le glucose entraînait une augmentation des flux calciques dans des tanocytes en culture *via* la libération d'ATP par la connexine 43 [72]. Les astrocytes expriment également le transporteur GLUT-2. Il a été démontré que la réexpression spécifique de GLUT-2 dans les astrocytes (mais pas dans les neurones), chez des souris KO pour ce transporteur, est suffisante pour restaurer une détection hypothalamique de glucose [73].

Cette détection de glucose par les cellules gliales (astrocytes et tanocytes) permet dans un second temps de contribuer à l'activation des neurones gluco-excités (**Figure 8**). Ainsi, lors d'une arrivée de glucose dans le cerveau, celui-ci peut activer ces neurones par 2 voies, une directe (que nous avons décrite précédemment), et une indirecte par les cellules gliales. En effet, le glucose peut entrer dans celles-ci *via* le transporteur GLUT-2 où il sera stocké sous forme de glycogène ou transformé en lactate par la lactate déshydrogénase A. Ce lactate va pouvoir sortir des cellules gliales par les transporteurs monocarboxylate-1 et -4, et entrer dans le neurone *via* le transporteur monocarboxylate-2. A ce niveau il poursuivra son oxydation et permettra de participer à l'activation des neurones gluco-excités [74, 75].

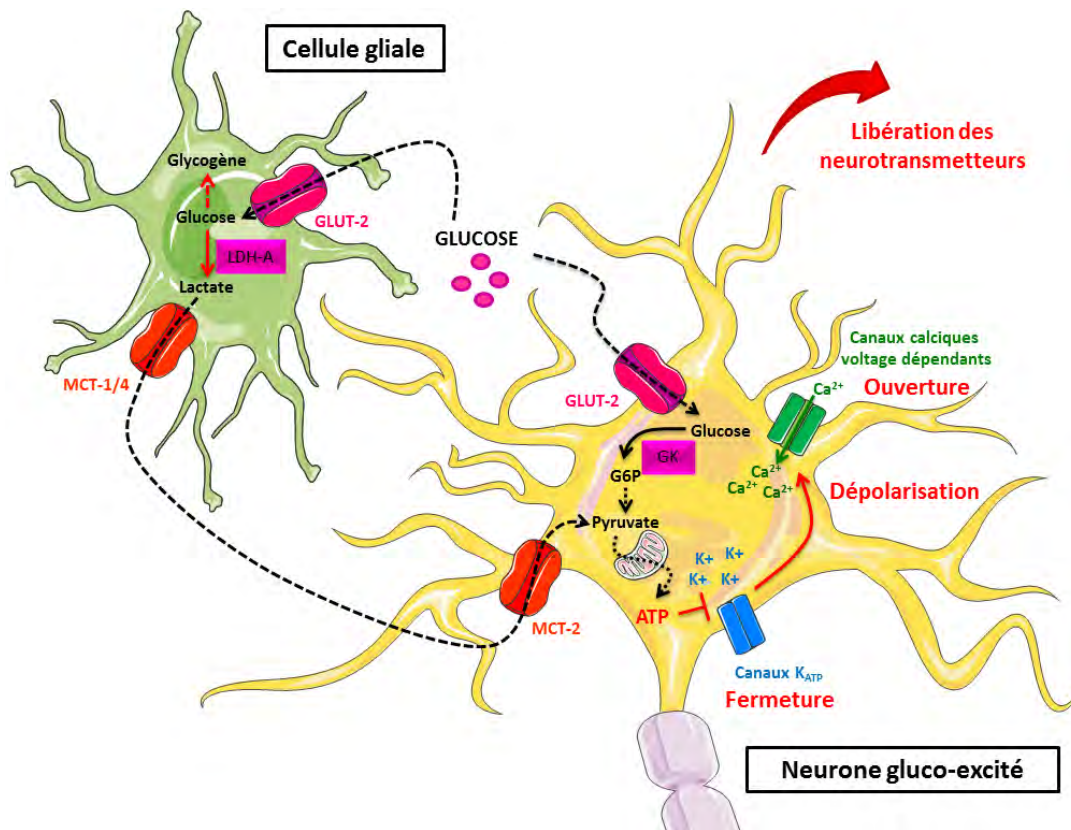


Figure 8: Contribution des cellules gliales dans l'activation des neurones gluco-excités.

Comme nous l'avons vu précédemment, le glucose central peut directement activer les neurones gluco-excités. De plus, ce dernier peut également entrer dans les cellules gliales par le Glucose Transporteur-2 (GLUT-2). Les cellules gliales stockent ce glucose sous forme de glycogène ou le transforment en lactate *via* la Lactate Déshydrogénase-A (LDH-A). Le lactate ainsi formé va sortir de la cellule gliale par les Transporteurs MonoCarboxylates-1 et -4 (MCT-1/4) pour être dirigé vers les neurones gluco-excités. Une fois entré dans les neurones gluco-excités par le MCT-2, le lactate poursuivra son oxydation provoquant leur activation.

b) Les acteurs moléculaires

Nous venons de décrire les structures hypothalamiques impliquées dans la détection centrale de glucose. Cependant, il est important de préciser que le « glucosensing » ne dépend pas uniquement de leur recrutement. En effet, certains médiateurs moléculaires centraux, qui sont aussi retrouvés en périphérie, vont aussi jouer un rôle clef dans ce processus.

b.1) AMPK

L'AMPK est une sérine/thréonine kinase considérée comme un senseur énergétique cellulaire. Elle est exprimée dans un grand nombre de tissus, et notamment dans ceux sensibles au glucose (foie, cœur, tissu adipeux, muscles, cerveau) [76]. Il s'agit d'une protéine hétérodimérique

constituée d'une sous-unité catalytique (α) et de 2 sous-unités régulatrices (β et γ). Différentes isoformes ont été mises en évidence pour chacune des sous-unités, pouvant conduire à 12 possibilités combinatoires différentes tissu-spécifiques. L'état d'activation de l'AMPK dépend de la concentration intracellulaire en AMP, cette dernière étant étroitement liée à la concentration d'ATP. En effet, dans la cellule, une déplétion en ATP s'accompagne d'une augmentation plus marquée de la concentration en AMP. Ainsi, l'AMPK va être phosphorylée par une protéine sérine/thréonine kinase identifiée comme un suppresseur de tumeur (LKB1) [77] ou par la Calcium/calmoduline Kinase Kinase β (CamKK β) [78], elles même étant activées par l'AMP. De plus, l'AMP empêche la déphosphorylation de l'AMPK en inhibant les protéines phosphatases qui viendraient inactiver l'AMPK. Cette AMPK activée va avoir pour but de restaurer les taux d'ATP cellulaires en mettant en route des processus cataboliques.

L'AMPK joue ainsi un rôle important dans le métabolisme glucidique. Au niveau périphérique, elle stimule le transport de glucose dans le muscle et dans le tissu adipeux, en induisant la translocation du transporteur GLUT-4 à la membrane plasmique [79, 80]. L'AMPK induit également l'expression de protéines telles que l'hexokinase et des enzymes de la chaîne mitochondriale nécessaires à l'utilisation des substrats énergétiques [81]. En parallèle, elle va inhiber les enzymes impliquées dans la synthèse de glycogène dans le muscle, permettant à la cellule d'orienter le glucose vers la production d'énergie [82]. Enfin dans le foie, elle va inhiber la production hépatique de glucose en jouant directement sur les enzymes de la néoglucogenèse [83]. Ainsi, de par l'ensemble de ses actions périphériques, l'AMPK constitue une cible privilégiée dans le traitement du Diabète de Type 2. Dans l'hypothalamus, l'AMPK est également fortement impliquée dans le contrôle du métabolisme glucidique [84, 85]. En effet, l'AMPK est capable d'agir sur les tissus périphériques *via* des mécanismes impliquant le SNA, et va avoir des effets différents en fonction de sa localisation. Ainsi, une activation pharmacologique de l'AMPK, via une injection icv d'AICAR, entraîne une augmentation de la sensibilité à l'insuline de l'ensemble de l'organisme et une augmentation de la synthèse de glycogène chez la souris à jeun [18]. L'injection de cet activateur dans le VMN, conduit en revanche, à une augmentation de la production hépatique de glucose en réponse à une hypoglycémie [86]. L'activation hypothalamique d'AMPK permet donc d'activer les voies productrices d'énergie au détriment des voies consommatrices.

b.2) mammalian Target Of Rapamycin (mTOR)

La protéine mTOR est également une sérine/thréonine régulant de nombreux processus cellulaires comme la croissance cellulaire, le cycle cellulaire et l'autophagie. Sa distribution tissulaire

est ubiquitaire, avec toutefois des niveaux d'expression plus importants au niveau du muscle et du cerveau [87]. Cette kinase existe dans la cellule sous forme de 2 complexes protéiques distincts (mTORC1 et mTORC2). mTORC1 est le mieux connu, et est directement activé par le statut énergétique de la cellule [88]. Ainsi, mTOR est également considéré comme un senseur métabolique, mais à l'inverse de l'AMPK, cette kinase sera activée en réponse à un excès d'énergie, en particulier en réponse à un ratio ATP/AMP élevé [89] ou à des forts taux d'insuline [90]. Ceci permet donc à ces 2 senseurs métaboliques d'être complémentaires, et dans cette optique, l'AMPK est d'ailleurs capable d'inhiber l'activité de mTOR [88].

Concernant son rôle dans l'homéostasie glucidique, mTOR va entraîner une augmentation de la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques, conduisant ainsi à une amélioration de la tolérance au glucose [91]. Plus récemment, un nouveau rôle de mTOR sur la régulation de la signalisation insulinémique a été proposé. Ainsi, l'activation de cette voie entraînerait des phosphorylations inhibitrices de IRS-1, provoquant en conséquence, une résistance à l'insuline au niveau du tissu adipeux et du foie [92, 93]. La protéine mTOR est également retrouvée au niveau de l'hypothalamus, et notamment au niveau des neurones de l'ARC. Comme en périphérie, l'activation de la voie de mTOR au niveau hypothalamique contribue au développement d'une résistance centrale et hépatique à l'insuline [94, 95].

b.3) NO

Le NO est un gaz radicalaire synthétisé par les NOS qui catalysent la transformation de L-Arginine en L-Citrulline et NO. Il existe 3 types de NOS, la NOS neuronale (nNOS), la NOS endothéliale (eNOS) et la NOS inductible (iNOS) [96, 97]. La nNOS a été la première découverte, et fut purifiée à partir de cerveaux de rats et de porcs [98, 99]. Cette enzyme est également retrouvée en périphérie, notamment dans les muscles squelettiques [100] et dans le Système Nerveux Entérique (SNE) [101]. La eNOS est principalement exprimée dans les cellules endothéliales en périphérie [102], et dans le SNC [103, 104]. Il a même été démontré l'existence de cette dernière dans certains neurones localisés dans le tronc cérébral et le cervelet [105]. Ces 2 enzymes sont exprimées de façon constitutive, mais leur activité est régulée par des phosphorylations sur des résidus thréonine et sérine. En fonction du site de phosphorylation touché, ces NOS pourront soit être activées, soit inhibées. Par exemple, pour la eNOS, la phosphorylation de son résidu sérine1177 permettra son activation, alors que celle du résidu thréonine495 conduira à une diminution de son activité [104]. A l'inverse, l'expression de la iNOS, identifiée dans les macrophages, est induite par différents stimuli pro-inflammatoires [106]. De façon intéressante, en fonction de sa concentration, le NO va exercer

des effets bénéfiques ou délétères sur les processus physiologiques [107-109]. Généralement, les NOS constitutives sont associées à une libération physiologique de NO, et à l'inverse, les iNOS génèrent de forts taux de NO conduisant à des effets cytotoxiques [104].

Bien que le NO ait une durée de vie très courte (aux alentours de 7 secondes), son pouvoir de diffusion (jusqu'à 300µm autour de son site de production) lui permet de cibler la guanylate cyclase soluble qui constitue l'un de ses récepteurs majeurs [110, 111]. Cette enzyme, activée suite à la fixation de NO, catalyse la transformation de GTP en GMPC. La guanylate cyclase, et donc le NO, sont ainsi impliqués dans de nombreux effets physiologiques dont les plus connus sont la vasorelaxation des vaisseaux sanguins [112] et l'inhibition de l'agrégation plaquettaire [113]. De plus, il est maintenant clairement établi que le NO est fortement impliqué dans le contrôle du métabolisme glucidique. Au niveau du foie, le NO inhibe la production de glucose, la synthèse de glycogène, ainsi que la glycolyse, en agissant sur les enzymes mises en jeu dans ces différentes voies [114-116]. Au niveau des muscles squelettiques [117-119] et du tissu adipeux [120, 121], ce gaz hautement diffusible, va augmenter le transport de glucose et y favoriser son oxydation. Enfin, au niveau intestinal, le NO libéré par les nNOS exprimées par les neurones du SNE, va provoquer une inhibition des contractions intestinales [122]. Nous verrons dans la suite de ce manuscrit, comment une diminution de la contractilité intestinale va pouvoir impacter le métabolisme glucidique (voir Partie Résultats). De par la présence de NOS au niveau central, le NO va donc pouvoir être produit au niveau de l'hypothalamus. A ce niveau, nous avons vu précédemment que le NO était impliqué dans la détection centrale de glucose *via* les neurones gluco-inhibés. De plus, sa production hypothalamique est associée à une élévation du flux sanguin périphérique, ainsi qu'à une augmentation de l'utilisation du glucose chez la souris [123]. Ainsi, le NO hypothalamique est un acteur moléculaire central jouant un rôle crucial dans le contrôle de l'homéostasie glucidique.

b.4) Espèces Actives de l'Oxygène (EAOs)

Les EAOs sont des espèces radicalaires dérivées de l'oxygène, dont les plus connues sont l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et le radical hydroxyle (OH^\cdot). Tous ces radicaux libres possèdent un électron célibataire sur un atome d'oxygène. Cette propriété rend les EAOs très instables, étant donné que ces espèces vont vouloir réagir rapidement avec les autres molécules chimiques les entourant afin d'apparier leurs électrons. Ceci va créer de nouveaux radicaux libres provoquant des réactions en chaînes, et donc l'activation de nombreuses voies de signalisation [124]. Dans la cellule, tous les processus utilisant de l'oxygène peuvent aboutir à la formation des EAOs. Cependant, la chaîne mitochondriale représente la source majeure d'EAOs

[125]. Enfin, celles-ci sont également produites par les NADPH OXYdases (NOX) [126, 127], qui sont des complexes enzymatiques liés à la membrane capables de transférer les électrons du NADPH cytosolique sur l'oxygène. Tout comme le NO, lorsque les EAOs sont produites de façon modérée et transitoire, elles agissent comme de véritables molécules signalisantes [128]. En revanche, lorsque les EAOs sont produites en excès, ou lorsque les capacités anti-oxydantes de la cellule sont dépassées, se créer un stress oxydant [128]. A ce stade, les EAOs deviennent « toxiques » pour la cellule et sont donc délétères pour l'organisme [129].

Les EAOs produites par la mitochondrie font de cette dernière un véritable senseur métabolique. En effet, un excès de pyruvate dans la cellule va entraîner la production mitochondriale d' H_2O_2 , qui à son tour va favoriser le stockage du glucose. Cette direction du glucose vers son stockage va empêcher son oxydation, donc la production d'équivalents réduits et donc d'EAOs par la mitochondrie [130]. Les EAOs produites par les NOX ont également un rôle non négligeable dans le contrôle du métabolisme glucidique. Ainsi, il a été montré dans des adipocytes *in vitro*, une potentialisation de l'entrée de glucose stimulée par l'insuline en réponse la surexpression de la NOX4 [131]. Les EAOs sont également très présentes au niveau central. La grande majorité de ces EAOs produites par les neurones ont une origine mitochondriale. Néanmoins, des approches immunohistochimiques ont également permis de localiser la présence de NOX dans différentes régions du SNC, et notamment dans l'hypothalamus chez le rongeur [132]. Concernant leur rôle dans le métabolisme glucidique, il a clairement été démontré l'implication des EAOs mitochondriales dans le « glucosensing » hypothalamique. En effet, un bolus de glucose sur des coupes d'hypothalamus *ex vivo*, stimule la génération de ces dernières [133]. De plus, une injection intra-carotidienne de glucose (donc uniquement perçue par l'hypothalamus) chez le rat, entraîne une augmentation significative de l'activité neuronale dans l'ARC, et cet effet est aboli par la co-injection d'enzyme anti-oxydantes [133]. En ce qui concerne les EAOs centrales produites par les NOX, elles permettent de transmettre des signaux en périphérie puisqu'il a été montré que leur stimulation dans des régions clefs contrôlant le SNA allait stimuler l'activité du SNS [132]. Ainsi, les EAOs ont un rôle de molécule signalisante dans le SNC, et plus particulièrement dans l'hypothalamus.

Ainsi, l'ensemble des types et acteurs cellulaires évoqués dans cette partie vont permettre à l'hypothalamus d'intégrer les informations, concernant le métabolisme glucidique, issues de la périphérie. En retour, cette structure va déclencher des réponses adaptées, précédemment décrites, sur les tissus cibles impliqués dans le métabolisme glucidique *via* 2 systèmes, le SNA et le système neuroendocrinien.

IV- Le cas du Diabète de Type 2

1) Généralités

L'ensemble des voies de régulations que nous venons de décrire agissent en concert pour assurer l'homéostasie glucidique. Par conséquent, une ou plusieurs altérations de celles-ci vont aboutir à l'apparition de pathologies, nommées maladies métaboliques. Parmi elles, le Diabète de Type 2 (DT2) est la plus répandue. En effet, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) indique qu'en 2014, la prévalence mondiale du diabète était estimée à 9% chez les adultes âgés de plus de 18 ans. Cette pathologie est en grande partie le résultat d'une surcharge pondérale, et l'augmentation vertigineuse de l'obésité à travers le monde est associée à un accroissement parallèle du DT2. Cette pathologie est caractérisée par une hyperglycémie chronique à jeun (supérieure à 1,26g/L ou 7mM). Dans des conditions physiologiques, une hyperglycémie postprandiale transitoire va stimuler la synthèse et la sécrétion d'insuline, et permettre une assimilation correcte du glucose. Au contraire, une exposition prolongée à des concentrations supraphysiologiques de glucose exerce des effets toxiques et délétères pour l'organisme, regroupés sous le terme de glucotoxicité. Cette glucotoxicité, va entraîner l'apparition d'une inflammation qualifiée de bas bruit ainsi que d'un stress oxydant, venant interférer avec la voie de signalisation de l'insuline, et conduisant à l'insulino-résistance tissulaire [134].

Le terme d'insulino-résistance décrit la situation pathologique dans laquelle on observe un défaut d'action de l'insuline au niveau de ses tissus cibles : principalement le foie, les muscles et le tissu adipeux. Cette insulino-résistance va se manifester par une augmentation de la production hépatique de glucose (principalement à partir de la néoglucogenèse), ainsi qu'une diminution des capacités de captation musculaire de glucose, le tout entraînant une augmentation de la glycémie. Toutefois, au début de la pathologie, le pancréas va pouvoir normaliser la glycémie via une augmentation de la sécrétion d'insuline. Il s'agit de l'état pré-diabétique, caractérisé par une normoglycémie et une hyperinsulinémie. Cependant, l'insulino-résistance va devenir de plus en plus sévère, et le pancréas ne va plus réussir à contrecarrer ce défaut. On parle alors de DT2, qui se caractérise par une hyperglycémie associée à une hyperinsulinémie. A terme, le pancréas trop sollicité par l'augmentation de la glycémie, va s'épuiser. Cela va conduire à l'apoptose des cellules β pancréatiques entraînant une diminution de la sécrétion d'insuline, on parle alors d'insulinopénie.

Outre ces altérations périphériques observées lors d'un DT2, il est également retrouvé des atteintes du SNC dans le cadre de cette pathologie. En effet, étant donnée l'implication du

« glucosensing » hypothalamique précédemment décrit dans l'homéostasie glucidique, il est facile de comprendre qu'un défaut de celui-ci va également entraîner l'apparition de désordres métaboliques tels que le DT2. Ainsi, une injection intra-carotidienne de glucose à faible concentration (qui ne permet pas d'élever la glycémie systémique), est suffisante pour produire une augmentation de l'insulinémie plasmatique chez des rats Zucker obèses, ce qui n'est pas le cas chez les rats minces issus de la même portée [135]. De plus, chez la souris diabétique, de faibles diminutions de la concentration en glucose vont significativement plus inhiber les neurones gluco-excités [136]. Ainsi, l'ensemble de ces observations montrent que dans le cadre d'un DT2, donc d'une hyperglycémie, l'hypothalamus perçoit un signal inapproprié de déficit en glucose. Afin de contrecarrer le déficit perçu, la conséquence va être une activation des mécanismes responsables de la production de glucose, et donc l'aggravation du DT2. Dans ce cadre physiopathologique, les voies de la signalisation de l'AMPK [137] et de mTOR [138] semblent être également complètement altérées, les empêchant de jouer leur rôle de senseur et contribuant ainsi à la détérioration du métabolisme glucidique. Concernant le NO, l'inhibition centrale des NOS *via* l'injection icv de L-NG- MonoMethylarginine, Acetate salt (L-NMMA) chez le rat, entraîne une hyperglycémie et une résistance à l'insuline [139]. Ces altérations sont caractéristiques d'un DT2, et à ce propos, il a été montré un défaut de sécrétion de NO due à une diminution de l'expression de la eNOS et la nNOS dans cette pathologie [140]. Enfin, comme nous l'avons déjà évoqué, une surproduction des EAOs va conduire à un stress oxydant. Le stress oxydant va de paire avec une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires ce qui entraîne une altération de la signalisation à l'insuline [132].

2) Stratégies thérapeutiques

L'hyperglycémie chronique qui résulte du DT2 constitue un important facteur de risques pour différentes pathologies, et notamment pour les maladies cardiovasculaires (hypertension artérielle, infarctus du myocarde, accidents vasculaires cérébraux, ischémie des membres inférieurs). En effet, les personnes atteintes du DT2 sont 2 à 4 fois plus susceptibles de développer ces maladies que les personnes non atteintes. En considérant le fait que ces maladies cardiovasculaires représentent la 1^{ère} cause de décès dans le monde, le DT2 se positionne comme un problème de santé publique majeur, et restaurer une normoglycémie chez les patients diabétiques est donc une priorité. Pour cela plusieurs stratégies thérapeutiques sont disponibles.

a) *Pharmacologie classique*

Les traitements antidiabétiques ont longtemps ciblé le pancréas et les tissus insulino-sensibles. Ainsi, les sulfamides hypoglycémiants et les glinides sont des insulinosécréteurs, ils vont bloquer les canaux K_{ATP} des cellules β pancréatiques afin d'induire la sécrétion d'insuline par le pancréas. La metformine, qui appartient à la classe des biguanines, est quant à elle un agent normoglycémiant, et représente le traitement antidiabétique le plus largement prescrit depuis les années 50. La metformine n'agit pas sur la sécrétion d'insuline, mais favorise l'utilisation du glucose par le foie principalement, et dans une moindre mesure par les muscles et le tissu adipeux. Cette dernière inhibe également la néoglucogenèse et la glycogénolyse par le foie. Tous ces effets de la metformine sur cet organe semblent être le résultat de l'activation de l'AMPK [141, 142], cependant, ce mécanisme d'action a été remis en cause par une étude en 2010, montrant que les souris invalidées pour l'AMPK répondent quand même à la metformine [143]. Trois ans plus tard, les mêmes auteurs ont montré qu'un traitement à la metformine était également capable d'inhiber la signalisation du glucagon dans des hépatocytes de souris, provoquant une moindre production de glucose [144]. Ainsi, la metformine jouerait sur plusieurs fronts pour réguler la production endogène de glucose par le foie. Comme nous l'avons mentionné, le foie n'est pas le seul organe ciblé par la metformine. En effet, celle-ci est également capable d'augmenter la captation du glucose au niveau des muscles squelettiques. Cet effet s'explique en partie par une stimulation de la translocation des transporteurs glucidiques sensibles à l'insuline à la membrane plasmique [145]. De plus, cette augmentation de l'entrée musculaire du glucose par la metformine, est associée à une augmentation de l'activité de la glycogène synthase, et donc du stock du glycogène dans cet organe [145]. Là aussi, ces effets de la metformine sur les muscles squelettiques passeraient par une activation de l'AMPK [146].

Cependant, face à l'expansion de cette pathologie, les traitements proposés aujourd'hui sont insuffisants, de plus, leur administration est souvent accompagnée d'effets secondaires indésirables. Ainsi, malgré les avancées technologiques et médicales, la pathologie du diabète reste encore peu comprise, et des thérapeutiques efficaces pour traiter le DT2 sont toujours manquantes.

b) Nouvelles stratégies thérapeutiques

Dans cette perspective de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques, l'intestin a pris depuis une dizaine d'années, de plus en plus d'importance dans le traitement de cette pathologie.

b.1) Les antidiabétiques oraux

En effet, plusieurs classes d'antidiabétiques agissant sur la sphère digestive sont déjà sur le marché. Les inhibiteurs des alpha-glucosidases intestinales inhibent la dernière étape de la digestion des sucres. Ceux-ci ne pouvant être absorbés, ils vont continuer leur chemin dans l'intestin pour, soit subir la fermentation colique bactérienne, soit être éliminés dans les selles. Il en résulte une diminution de l'hyperglycémie postprandiale. Les analogues du GLP-1 et les inhibiteurs de la DDP-IV (les gliptines) ont pour but d'augmenter l'action du GLP-1 endogène, dont nous avons détaillé tous les mécanismes d'actions sur le métabolisme glucidique précédemment. Ainsi, ces médicaments vont permettre une stimulation de la sécrétion d'insuline entraînant une augmentation de l'entrée de glucose dans le muscle, et une diminution de la néoglucogenèse dans le foie, le tout contribuant à une baisse de la glycémie. Cependant, ces agents ayant été mis sur le marché il y a une dizaine d'années, il est encore difficile d'avoir un recul suffisant permettant d'apprécier leurs effets indésirables.

b.2) La chirurgie bariatrique

A côté de ces traitements antidiabétiques, les progrès effectués en termes de chirurgies bariatriques ont également permis de mettre en lumière le rôle de l'intestin dans l'homéostasie glucidique. Les chirurgies bariatriques regroupent un ensemble de techniques modifiant l'anatomie du système digestif. Il s'agit de chirurgies lourdes, réservées aux personnes réunissant des critères de sélection précis, tels qu'un indice de masse corporelle supérieur à $40\text{kg}/\text{m}^2$ (sujets en obésité morbide) ou entre 35 et $40\text{kg}/\text{m}^2$ en cas de facteur de morbidité sévère, un échec des autres prises en charge au moins depuis un an, et des graves complications liées à l'obésité (hypertension artérielle, DT2, douleurs articulaires, essoufflement, hypercholestérolémie, hyperlipémie). Ces chirurgies peuvent être classées en 2 types principaux d'intervention. Premièrement, les techniques restrictives visant à réduire les capacités gastriques (c'est-à-dire le volume de l'estomac), et/ou réduire la vitesse de vidange de l'estomac afin d'obtenir un sentiment de satiété plus rapidement. Deuxièmement, les techniques mixtes, qui associent à cette restriction gastrique la création d'un système de dérivation dans le tube digestif afin de diminuer l'absorption des nutriments par l'intestin (malabsorption). La chirurgie bariatrique est actuellement le traitement le plus efficace dans la perte

de poids durable chez la personne obèse. Ces chirurgies (avec des efficacités différentes selon les techniques), en cas de non complication, entraînent une perte de poids drastique (jusqu'à 30% du poids initial avec un maintien pendant 10 ans) [147]. A ceci s'ajoute des effets métaboliques bénéfiques. En effet, il est observé dans $\frac{3}{4}$ des cas une rémission du DT2, si bien que la chirurgie bariatrique est maintenant considérée comme une « chirurgie métabolique », permettant dans certains cas un meilleur contrôle de la glycémie que les thérapies conventionnelles précédemment décrites [147]. Il a de plus été observé une sécrétion de GLP-1 après certaines interventions bariatriques, ce dernier contribuant aux effets bénéfiques observés sur le métabolisme glucidique de ces chirurgies [147, 148].

b.3) Le microbiote intestinal

Enfin, depuis une dizaine d'années, une autre cible intestinale dans la prise en charge du DT2 a été identifiée, le microbiote intestinal. Il s'agit de l'ensemble des microorganismes qui peuplent notre intestin, parmi lesquels les bactéries sont les plus abondantes et les plus étudiées. Chaque individu abrite 100000 milliards de bactéries regroupées en 160 à 200 espèces différentes. Ainsi, chaque personne possède un microbiote unique avec lequel il va vivre en symbiose tout le long de sa vie. Ce microbiote possède de multiples fonctions, telles que la dégradation des fibres dans le côlon, la production d'énergie sous forme de vitamines et d'acides gras à chaînes courtes, le maintien de l'intégrité et de l'étanchéité de la barrière intestinale ainsi que la régulation de la maturation et de la stimulation du système immunitaire.

Depuis les années 2000, de nombreuses études se sont intéressées au rôle de ce microbiote dans la régulation du stockage énergétique de l'hôte. Tout d'abord, la comparaison des microbiotes issus de souris et d'humains obèses ou minces a révélé que l'obésité était associée à de profondes modifications du microbiote intestinal, appelées dysbiose [149, 150]. Parallèlement à cette constatation, le lien direct entre le microbiote intestinal et l'homéostasie énergétique a été établi en utilisant des souris axéniques (dépourvues de microbiote). Ces dernières ont une adiposité réduite de 40% comparativement à des souris possédant un microbiote intestinal classique, et sont de plus protégées de l'obésité induite par un régime gras [151, 152]. Aussi, la colonisation de ces souris axéniques avec un microbiote issu de souris minces entraîne une augmentation de la masse adipeuse. De plus, le transfert de microbiote de souris obèses chez des souris axéniques, conduit à une augmentation encore plus drastique de la masse adipeuse chez ces dernières, comparativement à celles ayant reçues un microbiote de souris minces [153]. Dès lors, l'hypothèse a été qu'une dysbiose du microbiote intestinal pouvait participer au développement de l'obésité et des maladies métaboliques qui lui sont associées. Cette hypothèse a été confirmée par l'étude des fonctions

métaboliques de ce microbiote « obèse », révélant que ce dernier permettrait aux souris d'extraire d'avantage d'énergie à partir de l'alimentation [153]. De plus, il a été mesuré une augmentation des taux circulants de LipoPolySaccharide (LPS) chez les souris obèses diabétiques [154]. Le LPS est un composant essentiel de la paroi des bactéries Gram négatif. Il s'agit d'une endotoxine libérée lors de la lyse bactérienne. Des études ont montré qu'un régime riche en lipides entraînait une augmentation de la perméabilité intestinale au LPS, qui pourrait expliquer l'augmentation de l'endotoxémie lors de l'obésité [155]. En se retrouvant dans la circulation sanguine, le LPS va se lier aux cellules immunitaires, déclenchant ainsi la libération de cytokines pro-inflammatoires. Cette endotoxémie va donc initier le développement d'une inflammation de bas grade, entraînant une insulino-résistance dans le foie, les muscles et le tissu adipeux [154, 156].

Aux vues de ces résultats, il est maintenant évident que le microbiote intestinal participe au développement de la masse grasse, de la résistance à l'insuline et de l'inflammation caractérisant l'obésité et le DT2 associé. Dès lors, de nouvelles thérapies dans la prise en charge du DT2 ciblant ce microbiote se sont développées [157]. Parmi elles, l'utilisation de probiotiques ou de prébiotiques. Les probiotiques sont des microorganismes vivants, qui administrés de façon adéquate, confèrent des effets bénéfiques à l'hôte. Parmi les bactéries qui pourraient être utilisées dans le traitement du DT2, *A.muciniphila* apparaît être un bon candidat. En effet, non seulement l'abondance de cette bactérie est diminuée chez des souris obèses et diabétiques, mais de plus, l'administration de celle-ci à ces souris améliore leur profil métabolique (en terme de gain de masse grasse, d'inflammation et de résistance à l'insuline) [158]. Enfin, les prébiotiques sont des nutriments non assimilables par l'hôte (en général des polymères de glucides) qui agissent comme des substrats sélectifs d'une ou d'un nombre restreint de souches bactériennes spécifiques, favorisant ainsi leur croissance. Les prébiotiques peuvent se trouver naturellement dans l'alimentation ou peuvent être synthétisés. Ainsi, très récemment, il a été montré que la consommation de pain à base de grains d'orge chez l'Homme, entraînait une augmentation de l'abondance d'une bactérie intestinale nommée *Prevotella*, elle-même étant responsable d'une baisse de la glycémie postprandiale *via* une augmentation du stockage de glucose sous forme de glycogène [159].

Ainsi, face au besoin urgent d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour limiter l'expansion du DT2 associé à l'obésité, et en considérant le rôle majeur qu'exerce l'intestin dans le contrôle du métabolisme glucidique, celui-ci constitue un candidat de choix dans la prise en charge de cette pathologie.

Partie 2 : L'intestin grêle

I- Du simple tube au deuxième cerveau

Alors que certains organes comme le cœur et le cerveau ont toujours fasciné et possèdent toute notre considération, l'intestin, lui, a longtemps été considéré comme un tube, simplement bon à se remplir d'un côté et à se vider de l'autre. Cependant, il est important de rappeler que le système digestif est indispensable à l'assimilation des nutriments et se retrouve dans toutes les espèces, même les moins évoluées. Ainsi, les nématodes (vers ronds) ont un tube digestif complet (bouche, intestin, anus), mais ne possèdent ni de véritable cerveau, ni appareil circulatoire, ni tunique musculaire. Cette espèce n'a donc pas besoin de cœur ou de cerveau pour vivre, mais en revanche, tout son organisme s'organise autour de son intestin. Aussi, il est observé que la taille de l'intestin augmente avec l'évolution des espèces. Les animaux les moins évolués ont un intestin qui fait la taille de leur corps, alors que celui-ci fait le quadruple de la taille du corps chez les animaux carnivores, et le sextuple chez l'Homme. Aujourd'hui nous nous rendons compte que cet organe, dont la surface est 100 fois plus grande que celle de la peau chez l'Homme, possède un système immunitaire complet, abrite des trilliards de bactéries, et constitue l'organe endocrine le plus grand de l'organisme, libérant à lui tout seul une vingtaine d'hormones impliquées dans un grand nombre de processus biologiques. Enfin, cet organe possède son propre système nerveux, le Système Nerveux Entérique (SNE), comprenant 600 millions de neurones interconnectés. Ce SNE interagit en permanence avec le SNC, et des études de plus en plus nombreuses démontrent qu'il est capable d'influencer ce dernier. Ainsi, cet organe encore peu connu il y a quelques années, est désormais considéré comme le principal « conseiller » de notre cerveau, et endosse désormais la lourde et prestigieuse charge de « deuxième cerveau ».

II- Anatomie de l'intestin grêle

1) Généralités

L'intestin grêle fait suite à l'estomac au niveau du pylore. Il représente la partie la plus longue du tube digestif (environ 6 m de long chez l'Homme pour un diamètre de 3-4 cm), et se divise en 3 segments. Un segment court initial (0,25 m) se situant autour du pancréas, le duodénum, suivi par le jéjunum (2,5 m), et le segment distal, l'iléon (3,5 m) qui s'abouche dans le caecum. Au niveau

anatomique, la paroi digestive de l'intestin grêle est constituée de 5 couches concentriques, qui sont depuis la lumière: la muqueuse, la musculaire muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et une tunique conjonctive externe la séreuse (**Figure 9**). L'intestin grêle a pour fonctions principales de poursuivre la digestion des aliments mais surtout d'absorber les nutriments.

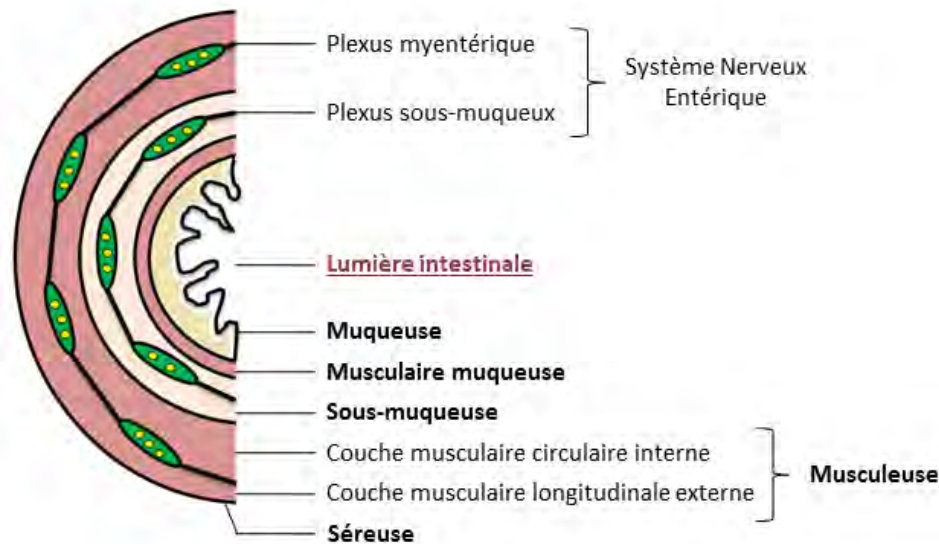


Figure 9: Coupe transversale de l'intestin grêle.

2) La muqueuse

Afin de permettre une absorption optimale des nutriments, la surface d'échange entre la lumière et la paroi intestinale doit être maximale. Cette augmentation de la surface d'échange va être permise non seulement par la grande longueur de l'intestin grêle, mais aussi par la disposition de la muqueuse intestinale à ce niveau. Tout d'abord, la muqueuse va se replier sur elle-même formant des replis transversaux, nommés valvules conniventes, dont l'existence va multiplier par 3 la surface de l'intestin. Au niveau de ces valvules, la muqueuse forme de multiples projections digiformes, appelées villosités intestinales, multipliant par 20 la surface de l'intestin. A la base de chaque villosité se trouvent les cryptes de Lieberkühn, lieu de la division des cellules souches intestinales. Enfin, les entérocytes bordant cette muqueuse possèdent, au niveau apical, des replis de membrane appelés microvillosités (**Figure 10**). Cela multiplie encore par 10 la surface d'échange, d'où une multiplication globale par 600 de la surface de l'intestin grêle. Ainsi chez l'Homme, cette surface est estimée à environ 260-300 m², soit la surface d'un court de tennis [160].

La muqueuse est délimitée par l'épithélium et le tissu conjonctif lâche sous-jacent, appelé *lamina propria*. La *lamina propria* contient les vaisseaux sanguins, les organes lymphoïdes secondaires du tractus digestif, et des cellules immunitaires. L'épithélium de la muqueuse de l'intestin grêle est de type simple et prismatique, et est composé de plusieurs types cellulaires se renouvelant tous les 2 à 3 jours [161].

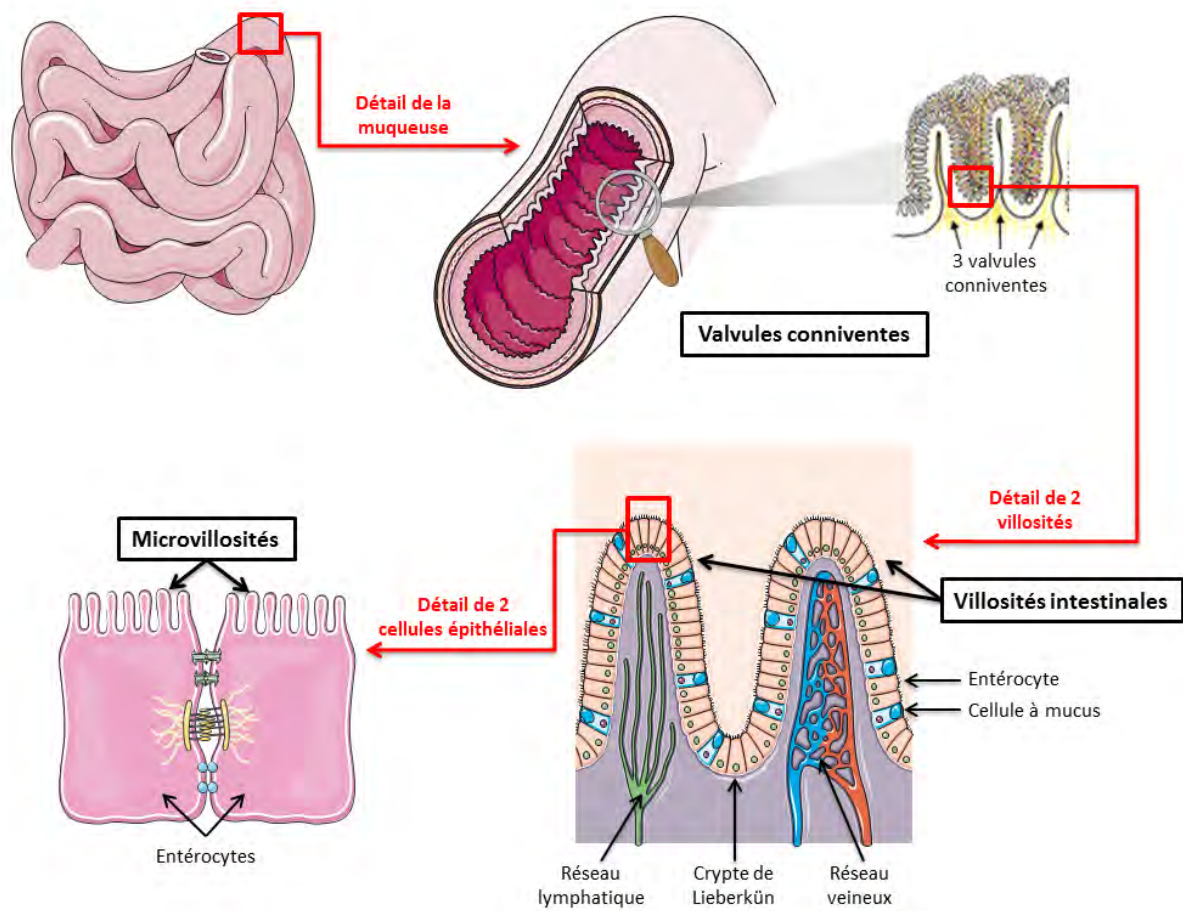


Figure 10: Valvules, villosités et microvillosités intestinales.

La muqueuse intestinale se replie sur elle-même formant des replis transversaux (hauts d'environ 1 à 2 cm) nommés valvules conniventes. Au niveau de ces valvules, la muqueuse forme de multiples projections digiformes (d'environ 1 mm) appelées villosités intestinales. Enfin, les entérocytes bordant cette muqueuse possèdent, au niveau apical, des replis de membrane appelés microvillosités. L'ensemble de ces structures permettent une multiplication globale par 600 de la surface de l'intestin grêle.

a) Les entérocytes

Les entérocytes constituent la population prédominante des cellules de la muqueuse. Ceux-ci sont joints par différents systèmes de jonctions assurant l'étanchéité de la barrière intestinale (jonctions serrées), et la cohésion de ces cellules (jonctions intermédiaires et desmosomes). Le pôle apical des entérocytes est orienté en direction de la lumière intestinale, et est donc en contact direct avec les nutriments. Dès lors, ce type cellulaire va jouer un rôle majeur dans leur absorption (voir point IV-2)). De plus, de nombreuses enzymes hydrolytiques sont présentes soit dans la membrane même des microvillosités, soit dans les mailles du glycolalix qui les revêt [162]. Ces diverses enzymes assurent les dernières étapes de l'hydrolyse des protides et des glucides alimentaires, et livrent ainsi les acides aminés et le glucose aux transporteurs de la membrane plasmique. Enfin, comme nous le verrons dans la suite de ce manuscrit, les entérocytes sont très largement impliqués dans le phénomène de « glucosensing » intestinal (voir Partie 3, point III-2)).

b) Les cellules à mucus

Ces cellules, encore appelées cellules caliciformes, sécrètent le mucus tapissant la paroi intestinale. Ce mucus, principalement constitué de mucine, possède à la fois un rôle protecteur et un rôle lubrificateur. Concernant son rôle protecteur, la polymérisation des monomères de mucine contribue à former un gel visqueux, constituant une barrière physique protectrice entre le tissu et toutes les substances potentiellement nocives présentes dans la lumière intestinale. De plus, récemment, il a été mis en évidence le rôle essentiel de ce mucus intestinal dans le contrôle de la réponse immunitaire. En effet, une étude a pu montrer que les cellules dendritiques produisaient d'avantage de cytokines anti-inflammatoires en présence de mucus, et en particulier de mucine 2 [163]. Dès lors, le mucus n'agirait pas seulement comme une barrière passive, mais il permettrait également de limiter la réaction immunitaire pour protéger les tissus. A côté de cette fonction protectrice, le mucus facilite aussi le transit des aliments dans l'intestin grêle.

c) Les cellules Entéro-Endocrines (EEs)

Il s'agit de cellules spécialisées permettant la libération de peptides ou d'hormones GI. Ces cellules ne sont pas regroupées en un organe endocrine bien défini, mais sont disséminées dans l'épithélium de la muqueuse intestinale. Elles présentent un pôle apical avec des microvillosités

faisant face à la lumière intestinale, et un pôle basolatéral renfermant des granules sécrétoires. Elles agissent comme des chémosenseurs puisque la détection de diverses substances (et en particulier des nutriments) à leur pôle apical, va entraîner l'exocytose basolatérale des vésicules contenant les peptides et hormones GI [164]. Seul l'effet de la détection de glucose par les cellules EEs sera abordé dans ce manuscrit. Une fois libérés, ces peptides et hormones GI vont pouvoir agir localement sur l'intestin. A ce niveau, ils vont être impliqués dans les processus de digestion (abordé point IV-1)) et de motricité intestinale (abordé point IV-3)). De plus, ces sécrétions GI vont également rejoindre la circulation sanguine après leur passage dans la veine porte, ou générer des réponses nerveuses en activant le SNE. Elles vont donc pouvoir impacter toute la physiologie de l'organisme. Ainsi, comme nous l'avons déjà évoqué dans la première partie de ce manuscrit et comme nous allons continuer de le démontrer, ces cellules EEs vont notamment jouer un rôle crucial dans l'homéostasie glucidique.

d) *Les cellules souches et les cellules de Paneth*

A l'inverse des cellules précédemment décrites qui se situent au niveau des villosités de la muqueuse intestinale, ces 2 types cellulaires sont eux retrouvés au fond des cryptes Lieberkühn. L'intestin grêle se caractérise par une grande plasticité morphologique et fonctionnelle, et ce notamment grâce à son renouvellement cellulaire très rapide. Ainsi, les cellules souches se divisent activement dans les cryptes, et les cellules issues de cette division migrent ensuite des cryptes vers les villosités. A la base des villosités ces cellules se différencient pour donner naissance à l'ensemble des types cellulaires de la muqueuse.

Les cellules de Paneth élaborent des granules contenant des peptides antimicrobiens (lysozymes, défensines et immunoglobulines), qui une fois sécrétés dans la lumière des cryptes vont participer au maintien de la barrière intestinale.

3) Les autres couches de la paroi digestive

La musculaire muqueuse, encore appelée *muscularis mucosae*, est composée de 2 couches fines de cellules musculaires lisses : une couche longitudinale externe et une couche circulaire interne. Cette couche musculaire maintient la muqueuse en agitation douce et constante, permettant l'expulsion des sécrétions glandulaires et le renforcement du contact entre l'épithélium et le contenu de la lumière.

La sous-muqueuse est constituée de tissu conjonctif, et contient des vaisseaux sanguins et lymphatiques pour la muqueuse. A sa jonction avec la musculuse se trouve un des plexi du SNE, le plexus sous-muqueux (ou de Meissner). Ce plexus nerveux contrôle essentiellement les sécrétions GI et le débit sanguin local.

La musculuse, comme la musculaire muqueuse, est organisée en 2 couches de cellules musculaires lisses : une couche circulaire interne et une couche longitudinale externe. En se contractant, elle va être responsable de la contraction intestinale abordée dans la suite de ce manuscrit (voir point IV-3)). Entre les 2 couches musculaires de la musculuse se trouve l'autre plexus du SNE, à savoir le plexus myentérique (ou d'Auerbach). Dès lors, en innervant la musculuse, ce plexus nerveux va permettre le contrôle moteur du tube digestif.

Enfin la tunique externe, appelée séreuse, comporte un tissu conjonctif tapissé sur son versant externe par un épithélium pavimenteux simple (mésothélium).

III- Innervation de l'intestin grêle

En 1899, Bayliss et Starling démontrent pour la première fois, que l'intestin grêle isolé, donc dénervé, se contracte de façon spontanée dans le sens oro-aboral [165]. Dès lors, ces 2 auteurs apportent la preuve expérimentale de l'existence d'un centre nerveux propre à l'intestin, différent du SNC. Ce système nerveux intrinsèque, appelé SNE, est composé de neurones dont le corps cellulaire est situé dans l'organe lui-même. A cette innervation intrinsèque s'ajoute une innervation extrinsèque dont les fibres nerveuses sont originaires de neurones situés en dehors du SNE, mais se projettent sur les neurones de ce dernier.

1) Le Système Nerveux Entérique (SNE)

Le SNE est réparti tout le long du tube digestif, et est composé d'environ 600 millions de neurones chez l'Homme (le cerveau en contient une centaine de milliards et la moelle épinière une centaine de millions). Ses fonctions principales sont d'assurer les contractions intestinales, les sécrétions glandulaires, et le débit sanguin local. Si son organisation fonctionnelle est identique à celle du SNC, il en va de même pour la diversité biochimique des neurones le composant. De plus, bien qu'il soit en interaction permanente avec le SNA, le SNE est capable de fonctionner de façon

indépendante des autres centres nerveux. Toutes ces constatations font que le SNE est désormais considéré comme notre « deuxième cerveau ».

a) Morphologie du SNE

Les neurones du SNE s'organisent en plexi ganglionnaires. Il s'agit d'un maillage serré de fibres nerveuses recouvrant toute la circonférence du tube digestif. Les nœuds de ces « mailles », appelés ganglions, sont formés à la jonction de ces fibres nerveuses. Les ganglions sont constitués d'un amas de corps neuronaux entériques et de cellules gliales. Comme nous l'avons mentionné, au sein du SNE il existe de 2 plexi ganglionnaires majeurs. Le plexus sous-muqueux (ou de Meissner), situé à la jonction de la sous-muqueuse avec la musculuse, et le plexus myentérique (ou d'Auerbach), situé entre les couches circulaires internes et une couche longitudinale externe de la musculuse. Les neurones entériques sont fortement interconnectés au sein d'un même ganglion, avec les neurones des ganglions voisins, mais aussi avec les neurones appartenant aux ganglions d'un autre plexus. Ainsi, bien qu'anatomiquement distincts, les 2 plexi entériques dialoguent en permanence et agissent de concert dans les fonctions de sécrétion et de motricité [166].

b) Les neurones entériques

S'agissant d'un véritable centre nerveux, le SNE comprend des neurones afférents, des interneurones, et des neurones efférents reliés aux effecteurs (cellules musculaires lisses et glandes intestinales). Ces neurones synthétisent plus d'une trentaine de neuromédiateurs qui peuvent être des petites molécules (comme l'acétylcholine synthétisée par la Choline Acetyl Transferase (ChAT)), des peptides (comme le Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)) ou des gaz (comme le NO synthétisé par la nNOS) (**Figure 11**). A noter que les neurones cholinergiques et nitrergiques constituent à eux seuls 90% de la population neuronale entérique [167].

Stimulation	Inhibition
Acétylcholine	NO
Adénosine	VIP
Bombésine	Somatostatine
CCK	GABA
GRP	CGRP
Histamine	NPY
Motiline	Galanine
Neurokinine A	Glucagon
PGE ₂	Neurotensine
Sérotonine	PACAP
SP	PHI
TRH	PYY
	Sécrétine

Figure 11: Principaux neuromédiateurs classés selon leur action physiologique sur la motricité intestinale (adapté de Hansen et al. [168]).

CCK: CholécystoKinine; GRP: Gastrin Releasing Polypeptide; PGE₂: ProstaGlandine E₂, SP: Substance P, TRH: Thyrotropin Releasing Hormone; NO: monoxyde d'azote; VIP: Vasoactive Intestinal Ppeptide, GABA: GAMMA Butyric Acid; CGRP: Calcitonin Gene-regulated Peptide; NPY: NeuroPeptide Y; PACAP: Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide; PHI: Peptide Histidine Isoleucine, PYY: Peptide YY.

Parmi les neurones afférents du SNE, on distingue les Neurones Intrinsèques Primaires Afférents (IPANs). Ceux-ci sont situés dans les plexi sous-muqueux et myentérique, et possèdent une ramification axonale et dendritique longue et ramifiée (**Figure 12**). Alors que leurs dendrites vont innerver les villosités intestinales, leurs axones vont se projeter sur les interneurons et les motoneurons des 2 plexi entériques. Dès lors, les IPANs vont pouvoir détecter toutes sortes d'informations émanant de l'environnement intestinal pour les relayer à l'ensemble des neurones du SNE, et déclencher ainsi un réflexe entérique indépendamment du SNA. Ces neurones sont sensibles à des modifications chimiques ou des stimuli mécaniques, comme les distensions intestinales ou les distorsions de la muqueuse intestinale [169, 170]. Cependant, les terminaisons nerveuses de ces neurones afférents sont séparées de la lumière intestinale par l'épithélium de la muqueuse, impliquant ainsi des composés intermédiaires pour leur activation. Parmi eux, l'implication de la sérotonine semble cruciale [171]. A titre d'exemple, dans une étude mesurant l'activité neuronale entérique en réponse à des stimuli mécaniques et chimiques, il a été montré une diminution de celle-ci suite à l'utilisation d'antagonistes aux récepteurs à la sérotonine [172].

Les interneurones, eux, possèdent de courts prolongements dendritiques et un long axone unique. Il existe 2 types d'interneurones, les interneurones ascendants (se projetant vers la bouche) et les interneurones descendants (se projetant vers l'anus). Ces neurones sont connectés entre eux formant une chaîne d'excitation ascendante ou descendante tout le long du tube digestif. De plus, comme nous l'avons mentionné, ces interneurones reçoivent également des afférences des IPANs. Dans les voies ascendantes, la transmission entre les interneurones, ou entre les interneurones et les neurones efférents moteurs, est exclusivement cholinergique [173, 174]. Les interneurones ascendants sont responsables des réflexes propulsifs permettant le déplacement du contenu luminal dans le sens oral-aboral. En revanche, il existe 3 classes d'interneurones descendants, en fonction de leurs codages neurochimiques et de leurs effets. Les interneurones exprimant ChAT/nNOS/VIP sont impliqués dans le réflexe péristaltique, ceux exprimant ChAT/somatostatine sont impliqués dans la propagation des complexes moteurs migrants de l'intestin grêle, et enfin, ceux exprimant ChAT/sérotonine sont impliqués dans les réflexes sécrétomoteurs locaux [174] **(Figure 12)**.

Enfin, les neurones efférents sont connectés aux effecteurs. Il s'agit soit des cellules musculaires lisses, on parle alors de motoneurones, soit des glandes, des vaisseaux ou des cellules immunitaires, on parle dans ce cas-là de neurones sécrétomoteurs. Comme les interneurones, ils possèdent de courts prolongements dendritiques et un long axone unique. Les motoneurones sont surtout retrouvés dans le plexus myentérique et sont soit excitateurs soit inhibiteurs. Ils ciblent les couches musculaires circulaires et longitudinales de la musculature, ainsi que de la musculature muqueuse. Les motoneurones excitateurs libèrent principalement des substances comme l'acétylcholine et les tachykinines, et entraînent une contraction musculaire. Les motoneurones inhibiteurs, quant à eux, provoquent la relaxation musculaire *via* la libération de NO principalement, mais aussi de VIP ou d'ATP [174, 175] **(Figure 12)**. Concernant les neurones sécrétomoteurs, la plupart d'entre eux ont leur corps cellulaire dans le plexus sous-muqueux. On distingue 2 types de neurones sécrétomoteurs, ceux qui libèrent de l'acétylcholine, et ceux qui libèrent le VIP [174, 175] **(Figure 12)**.

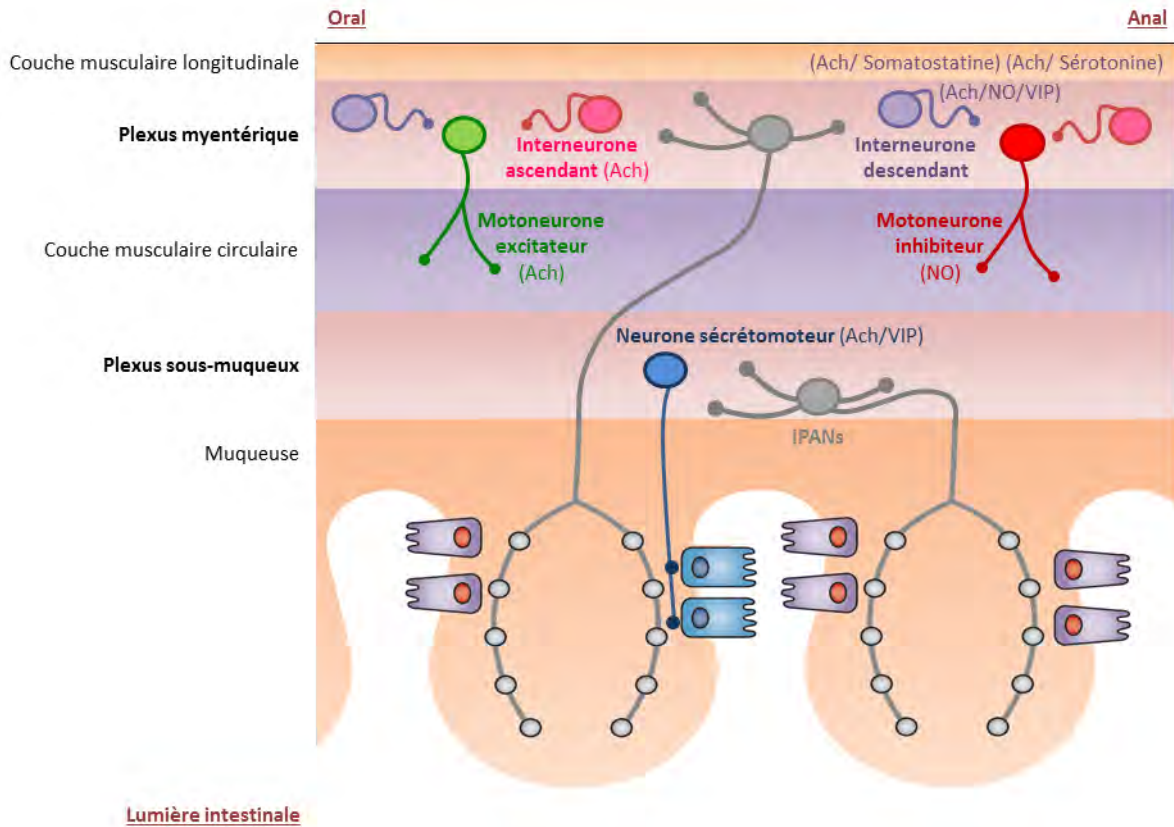


Figure 12: Innervation entérique intrinsèque (adapté de Brierly et al. [176]).

Les neurones intrinsèques ont à la fois leurs corps cellulaires et leurs projections dans l'intestin. Parmi eux, les IPANs (Neurons Intrinsèques Primaires Afférents) vont pouvoir détecter toutes sortes d'informations émanant de l'environnement intestinal pour les relayer à l'ensemble des neurones du SNE, dont les interneurones. Il existe 2 types d'interneurones, les interneurones ascendants (se projetant vers la bouche) et les interneurones descendants (se projetant vers l'anus). Ces derniers sont connectés aux effecteurs. Il s'agit soit des cellules musculaires lisses, on parle alors de motoneurones, soit des glandes, des vaisseaux ou des cellules immunitaires, on parle dans ce cas-là de neurones sécrétomoteurs. Les motoneurones sont surtout retrouvés dans le plexus myentérique et sont soit excitateurs soit inhibiteurs de la motricité intestinale. Concernant les neurones sécrétomoteurs, la plupart d'entre eux ont leur corps cellulaire dans le plexus sous-muqueux. Ainsi, l'ensemble de ces neurones entériques forment un réseau autonome qui contrôle la motilité, la sécrétion et la vasodilatation des vaisseaux sanguins indépendamment du SNA.

Ach : Acétylcholine ; VIP : Vasoactive Intestinal Peptide ; NO : monoxyde d'azote.

c) Les autres populations cellulaires du SNE

Comme nous l'avons évoqué, les cellules gliales font parties du SNE. Celles-ci sont 4 fois plus nombreuses que les neurones entériques [177], et présentent beaucoup de similitudes avec les astrocytes du SNC [178]. Elles sont majoritairement retrouvées au niveau des ganglions des plexi nerveux entériques, mais sont aussi situées le long des fibres inter-ganglionnaires, et des nerfs extrinsèques [179]. Ces cellules gliales possèdent de multiples rôles au niveau du SNE, et plus

largement au niveau intestinal. Tout d'abord, il a été observé qu'une ablation des cellules gliales entériques chez des animaux transgéniques, entraînait une dégénérescence neuronale, suggérant donc leur implication dans la survie des neurones entériques [180]. Ceci serait permis, entre autres, par l'approvisionnement de ces derniers en nutriments [178], et par la production de facteurs neurotrophiques comme le Glial-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) [181]. A côté de cette fonction protectrice vis-à-vis des neurones, les cellules gliales jouent également un rôle dans la neurotransmission entérique. Par exemple, dans le cadre de la transmission nitrergique, la L-arginine (le substrat nécessaire à la synthèse de NO par les NOS) a exclusivement été détectée dans les cellules gliales. Dès lors, elles représentent la seule source de L-arginine pour les neurones entériques synthétisant du NO [182]. Enfin, plus récemment, il a été montré que ces cellules gliales entériques interviennent également dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale, ainsi que dans la réponse immunitaire intestinale *via* la sécrétion de cytokines [178, 183].

Enfin, les Cellules Interstitielles de Cajal (CIC) sont des cellules spécialisées, jouant un rôle déterminant dans le contrôle neuronal de la contraction musculaire intestinale. Il existe 2 grands groupes fonctionnels de CIC. Celles qui sont situées au niveau du plexus myentérique, il s'agit de cellules « pacemakers » générant des ondes lentes de propagation de la motricité intestinale (voir point IV-3) [184]. La seconde population de CIC est située dans les couches musculaires intestinales, et sont fortement innervées par les motoneurones entériques excitateurs et inhibiteurs [184]. Des données récentes montrent que la transmission nerveuse motrice implique peu de synapses directes entre les neurones entériques et les cellules musculaires lisses intestinales [185]. En revanche, étant donné que les CIC intramusculaires établissent d'un côté des connections avec les terminaisons nerveuses de ces motoneurones, et de l'autre des gap junctions avec les cellules musculaires lisses, celles-ci serviraient d'intermédiaire crucial dans cette neurotransmission intestinale [185]. A titre d'exemple, une mutation de c-kit (un marqueur clé des CIC) chez la souris, est associée à une forte diminution de la réponse inhibitrice nitrergique [186]. Il a depuis été montré que le récepteur du NO (la guanylate cyclase soluble) était exprimé dans les CIC, démontrant clairement que ces dernières constituent un relai dans la transmission neurone nitrergique-cellule musculaire lisse intestinale [184, 187].

2) Innervation extrinsèque

Le SNE, bien qu'étant autonome, va communiquer en permanence avec le SNC. Ainsi, des neurones sensitifs afférents extrinsèques se projettent au niveau du SNC pour l'informer de toutes

variations de la physiologie intestinale. Dans le sens inverse, le SNC, par l'activation du SNA (ortho- et parasympathique), va pouvoir adapter la motricité, le débit sanguin et les sécrétions glandulaires intestinales, aux conditions imposées par l'environnement.

a) *Innervation extrinsèque afférente*

Les neurones sensitifs afférents extrinsèques détectent des stimuli physiques ou chimiques au niveau intestinal, et transmettent ces informations au SNC. Il existe des afférences vagues et spinales (elles-mêmes divisées en afférences pelvienne et splanchnique en fonction du nerf à travers lequel elles se projettent) (**Figure 13**). Les afférences vagues innervant l'intestin ont leurs corps cellulaires dans les ganglions jugulaires et noueux, alors que les afférences spinales ont leurs corps cellulaires dans de multiples ganglions rachidiens [176]. Au niveau central, les afférences vagues se projettent dans le tronc cérébral alors que les spinales se projettent dans la moelle épinière. Au niveau intestinal, les terminaisons nerveuses de ces neurones extrinsèques afférents se situent à de nombreux endroits dans la paroi digestive, incluant les ganglions des plexus myentérique et sous-muqueux, la muqueuse, la *lamina propria*, les fibres musculaires longitudinales et circulaires, et les vaisseaux sanguins de la sous-muqueuse [188]. Ces terminaisons nerveuses vont être sensibles à différents stimuli, tels que des distorsions, des compressions, et des distensions de la muqueuse, des changements de pH, des modifications de la pression osmotique, et divers signaux chimiques de la lumière intestinale [188]. L'activation des afférences vagues est généralement associée à des événements physiologiques, comme la sensation de satiété, alors que les signalisations spinales sont plutôt associées à des sensations de douleurs, d'inconfort et de ballonnements [176]. Enfin, certains de ces neurones afférents extrinsèques sont également responsables d'effets efférents notamment lors de stimulations nociceptives, contribuant ainsi à la protection de l'organe lors de dommages tissulaires [188].

b) *Innervation extrinsèque efférente*

Comme la plupart des organes, l'intestin est innervé par le SNS et le SNP (**Figure 13**). Concernant le SNS, les corps cellulaires des neurones pré-ganglionnaires sympathiques impliqués dans les fonctions GI sont situés dans la moelle épinière thoraco-lombaire. Ces neurones se prolongent dans le nerf splanchnique et se projettent jusqu'au ganglion prévertébral. A ce niveau, ils font synapse avec les neurones post-ganglionnaires sympathiques. Les fibres de ces neurones post-

ganglionnaires vont suivre le trajet de celles des neurones sensitifs, le long des artères cœliaque et mésentériques innervant l'intestin. Ces fibres post-ganglionnaires sympathiques vont innerver les artérioles de la paroi intestinale contrôlant ainsi le débit sanguin local. Elles vont aussi innerver le SNE et la muqueuse afin de contrôler les fonctions motrices et sécrétrices intestinales [176].

Concernant l'innervation parasympathique, les corps cellulaires des neurones pré-ganglionnaires se trouvent d'une part, au niveau du bulbe rachidien dans les noyaux dorsaux et ambigu. Les axones se prolongent ensuite dans les nerfs vagues qui innervent principalement l'œsophage, l'estomac, et la partie proximale de l'intestin grêle. D'autre part, il existe aussi des corps cellulaires dans la moelle épinière sacrée. Leurs axones se prolongent ensuite dans les nerfs splanchniques innervant le rectum et le sphincter anal. Ainsi, la partie centrale de l'intestin est peu innervée par le SNP. Les fibres pré-ganglionnaires parasympathiques innervent directement les neurones entériques (majoritairement au niveau du plexus myentérique). Au niveau de ces neurones myentériques, la libération d'acétylcholine par ces fibres sympathiques entraîne la modulation des circuits de réflexes internes de l'intestin [176].

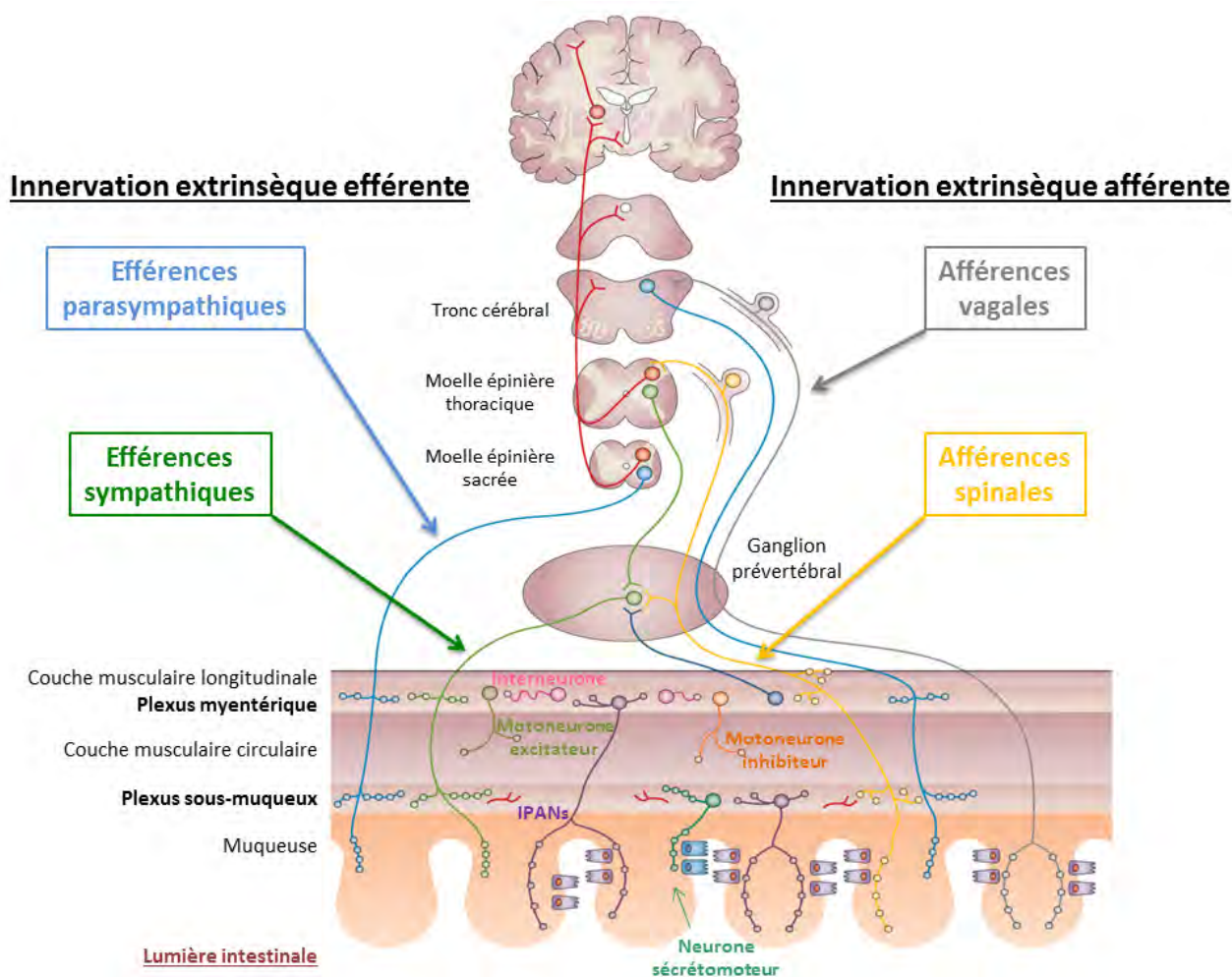


Figure 13: Innervation entérique extrinsèque (adapté de Briery et al. [176]).

Le SNE, bien qu'étant autonome, va communiquer en permanence avec le SNC. Les neurones sensitifs afférents extrinsèques détectent des stimuli physiques ou chimiques au niveau intestinal, et transmettent ces informations au SNC. Il existe des afférences vagales et spinales qui contribuent notamment à la perception consciente du transit, et à la nociception. Dans le sens inverse, le SNC, par l'activation du SNA (efférences ortho- et parasympathique), va pouvoir adapter la motricité, le débit sanguin et les sécrétions glandulaires intestinales, aux conditions imposées par l'environnement.

IPANs : Neurones Intrinsèques Primaires Afférents ; Ach : Acétylcholine ; VIP : Vasoactive Intestinal Peptide ; NO : monoxyde d'azote.

IV- Fonctions physiologiques de l'intestin grêle

L'intestin grêle est doué d'activité digestive, absorptive et motrice. Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons uniquement à la digestion et à l'absorption des carbohydrates. L'ensemble de ces fonctions sont sous le contrôle de l'alimentation elle-même, du SNE et du SNA.

1) Digestion des carbohydrates

Chez les monogastriques, les glucides représentent une part importante de l'apport énergétique. Par exemple, aux Etats-Unis, les apports quotidiens d'hydrates de carbone sont de 250 à 300 g, ce qui représente près de la moitié des apports caloriques. Près des 2/3 de ces hydrates de carbone proviennent de l'amidon (un polysaccharide végétal) [189], et le 1/3 restant provient du saccharose (glucose + fructose) et du lactose (glucose + galactose). L'amidon est un composé de 2 fractions polysaccharidiques : l'amylose (molécule formée d'environ 600 molécules de glucose reliées par des liaisons de type α -(1-4) glucose) et l'amylopectine (qui contient des chaînes linéaires de glucose reliées par des liaisons de type α -(1-4) glucose, et des chaînes ramifiées reliées par des liaisons de type α -(1-6) glucose). Ainsi, on ne retrouve que peu de monosaccharides dans l'alimentation. Or, seuls le glucose, le fructose et le galactose peuvent être absorbés par les entérocytes, impliquant donc une digestion complète des sucres dans le tube digestif.

La digestion des polysaccharides débute dans la bouche, et continue dans la partie supérieure de l'estomac sous l'action de l'amylase salivaire. Cette digestion s'achève dans l'intestin grêle, sous l'effet de l'amylase pancréatique et des enzymes intestinales de la bordure en brosse [189]. L'amylase pancréatique est produite par le pancréas et est sécrétée dans la lumière intestinale au niveau du duodénum. Elle attaque les liaisons glucidiques α -(1-4), transformant ainsi les polysaccharides en di- ou trisaccharides. Les enzymes digestives « terminales » des glucides sont synthétisées par les entérocytes, principalement au niveau de la partie proximale de l'intestin grêle, et se retrouvent dans la bordure en brosse et le glycolalyx [190]. Ces enzymes sont non seulement des di- ou trisaccharidases (maltase, lactase, saccharase...), mais aussi des aminopeptidases et des phosphatases. Elles vont permettre la transformation des di- ou trisaccharides en monosaccharides absorbables (glucose, galactose et fructose), au niveau de la bordure en brosse de l'intestin grêle, donc au voisinage de la surface d'absorption.

Comme nous l'avons évoqué, cette phase digestive va être régulée par les hormones GI libérées par les EECs, ainsi que par le SNA. D'une manière générale, les sécrétions pancréatiques exocrines vont être stimulées par la sécrétine, la CholécystoKinine (CCK), et le SNP. A l'inverse, elles vont être inhibées par la somatostatine, le GLP-1, le Peptide YY (PYY), et le SNS [191-194].

2) Absorption des carbohydrates

Une fois formés, les monosaccharides vont alors être absorbés par les entérocytes, pour ensuite rejoindre la circulation sanguine. Le transport apical du glucose et du galactose se fait activement *via* SGLT-1, alors que le fructose pénètre dans la cellule par diffusion facilitée *via* le transporteur GLUT-5 [195, 196]. Le transport apical actif du glucose est un paramètre hautement régulé. A ce titre, il a été montré que la leptine sécrétée par l'estomac et se retrouvant dans la lumière de l'intestin grêle exerçait, à ce niveau, une inhibition rapide de l'absorption du glucose induite par SGLT-1 [197, 198]. De plus, ce transporteur arrive à saturation pour des concentrations de glucose de 30 à 50 mM [199]. A des concentrations supérieures, la translocation de GLUT-2 à la membrane apicale de l'entérocyte permettrait la diffusion facilitée de glucose à l'intérieur de celui-ci [200]. Dans des conditions physiologiques, cette translocation rapide de GLUT-2 à la membrane apicale est finement régulée, et est restreinte à la période du repas afin de permettre une assimilation optimale du glucose [201]. Ainsi, ce transporteur au glucose est la cible de nombreux régulateurs qui vont stimuler ou au contraire inhiber sa translocation apicale. Parmi ceux-ci, l'insuline joue un rôle majeur en promouvant l'internalisation de GLUT-2 de la bordure en brosse apicale vers les stocks membranaires intracellulaires [202]. En revanche, dans des conditions pathologiques caractérisées par un défaut d'action de l'insuline telles que le DT2, la translocation apicale de GLUT-2 est dramatiquement augmentée, et ce de façon permanente. Il en résulte une absorption massive de glucose malgré l'hyperglycémie caractérisant cette pathologie [201].

Ces monosaccharides sont ensuite évacués au pôle basolatéral de l'entérocyte par diffusion facilitée à travers GLUT-2 (pour le glucose, le galactose et le fructose) et GLUT-5 (pour le fructose) [195, 196] (**Figure 14**). Cependant, des études chez des souris [203] et des patients [204] déficients pour GLUT-2 n'ont révélés aucune altération de l'absorption intestinale de glucose, suggérant que celui-ci puisse emprunter une seconde voie de sortie de l'entérocyte. En effet, dans les mêmes études, il a été montré que le glucose pouvait également être phosphorylé en glucose-6-phosphate dans l'entérocyte, pour ensuite être transloqué dans le réticulum endoplasmique. A ce niveau, il va être hydrolysé en glucose et phosphate, et le glucose va être évacué à l'extérieur de l'entérocyte *via* un trafic vésiculaire. Cette voie alternative semble être également présente dans des entérocytes sains et contribuerait à 15% de l'absorption intestinale de glucose [203]. Ainsi, dans des conditions physiologiques (où GLUT-2 est exprimé normalement), le glucose serait libéré dans la circulation sanguine à la fois *via* le transporteur GLUT-2 et le trafic vésiculaire. Dans des conditions pathologiques où les entérocytes sont déficients pour GLUT-2, cette voie alternative permettrait de compenser totalement cette absence de transporteur afin de permettre une absorption intestinale

normale de glucose [203]. L'essentiel de l'absorption des monosaccharides s'opère dans le duodénum et dans la partie proximale du jéjunum [205-207].

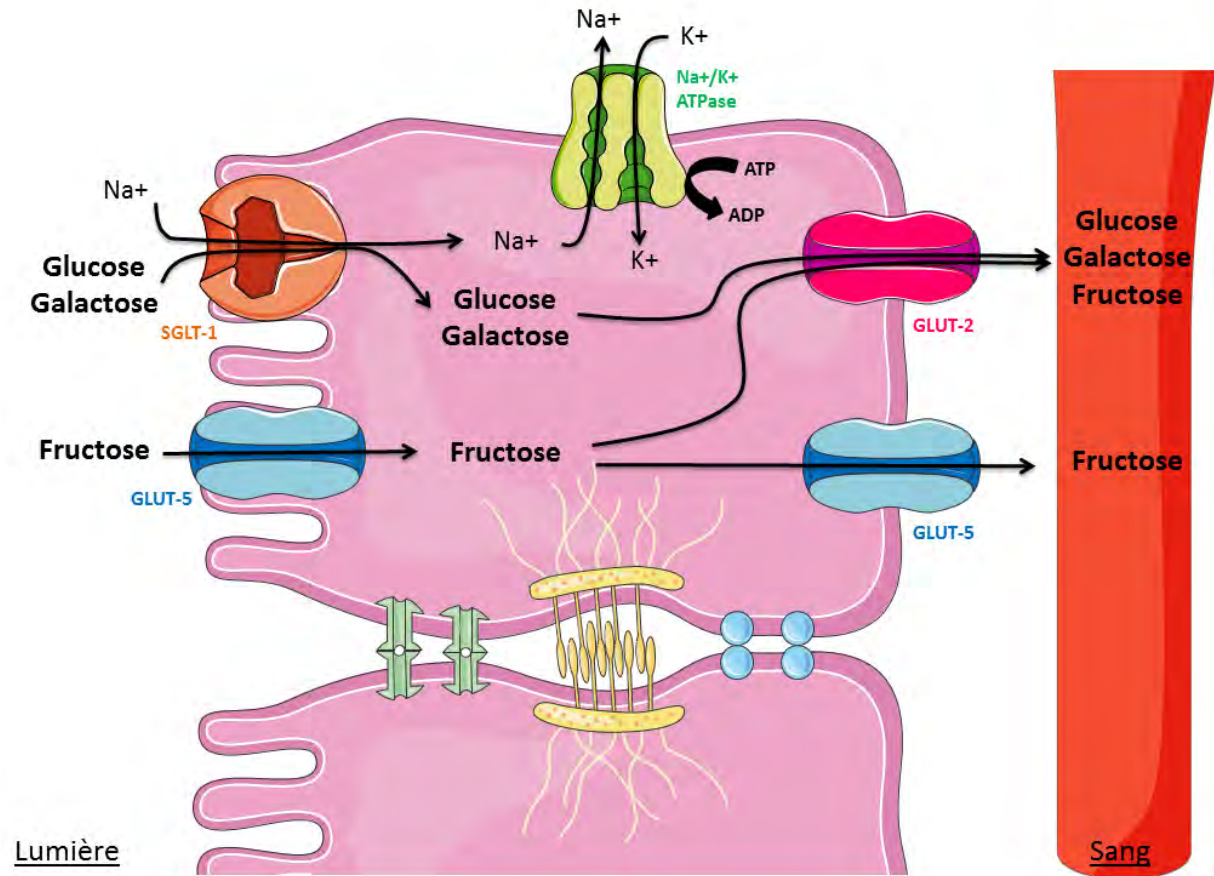


Figure 14: Absorption intestinale des carbohydrates.

Le transport apical du glucose et du galactose se fait activement via SGLT-1, alors que le fructose pénètre dans la cellule par diffusion facilitée via le transporteur GLUT-5. Ces monosaccharides sont ensuite évacués au pôle basolatéral de l'entérocyte par diffusion facilitée à travers GLUT-2 (pour le glucose, le galactose et le fructose) et GLUT-5 (pour le fructose).

3) Motricité intestinale

Les fonctions digestives et absorbatives de l'intestin grêle que nous venons de décrire dépendent de mécanismes permettant de mélanger les aliments avec les sécrétions digestives, de faciliter le contact du chyme avec la muqueuse et d'assurer la propulsion du contenu intestinal le long du tube digestif. Tout ceci va être permis par l'activité motrice de l'intestin grêle. Comme nous l'avons évoqué, Bayliss et Starling ont observé en 1899 que l'intestin grêle isolé, donc sans innervation extrinsèque, est capable de se contracter de façon polarisée dans le sens oro-anal [165].

Ceci démontre que cette contractilité intestinale est dictée uniquement par le SNE, et peut se produire indépendamment de l'activité du SNC, bien que celui puisse la moduler. Il est décrit plusieurs types d'activités motrices en fonction de l'état nutritionnel, c'est-à-dire en fonction des périodes inter-digestives ou des périodes postprandiales.

a) *Période inter-digestive*

Pendant les périodes de jeûnes inter-digestifs, l'intestin est soumis à des ondes lentes de contractions, se propageant de proche en proche en direction anale. Cette activité motrice est connue sous le nom de Complexe Moteur Migrant (CMM). Chaque cycle de CMM peut se décomposer en 3 phases [208]. La phase I dure environ 35-65 min, il s'agit d'une phase de quiescence, seules les ondes lentes sont présentes. Comme nous le verrons par la suite (voir point c)), celles-ci sont engendrées par les CIC, qui agissent comme des cellules pacemakers. La phase II dure 25-60 min, et correspond à une phase d'activité irrégulière, à savoir que des potentiels d'actions viennent surcharger les ondes lentes entraînant des contractions irrégulières de faibles amplitudes. Enfin la phase III dure 5-10 min, chaque onde lente est porteuse d'un potentiel d'action provoquant des contractions régulières. Chez l'Homme et le chien, la phase III de contraction a lieu périodiquement toutes les 90-120 min [209]. Les contractions spontanées de la phase III débutent pour la plupart dans l'estomac (71%), mais peuvent également être initiées dans la partie proximale de l'intestin grêle (29%) [210]. Les mécanismes déclenchant ce CMM ne sont pas à ce jour totalement élucidés, cependant la libération d'hormones GI, ainsi que des activations nerveuses semblent être impliquées. En effet, une phase III d'origine stomacale peut être induite chez l'Homme *via* une administration iv de motiline, d'érythromicine ou de ghréline, alors que l'administration de sérotonine ou de somatostatine induit une phase III d'origine duodénale. D'un point de vue nerveux, le rôle du nerf vague dans le contrôle du CMM semble être restreint à l'estomac, puisqu'une vagotomie transthoracique bilatérale chez le chien bloque le CMM dans l'estomac sans affecter celui de l'intestin grêle [211]. Cette dernière observation démontre également la contribution du SNE dans la mise en place du CMM au niveau de l'intestin grêle. En effet, les contractions observées lors des phases II et III du CMM ne sont possibles que lorsqu'une onde lente et la libération d'un neurotransmetteur exciteur par les motoneurons du SNE surviennent de façon simultanée [210]. De plus, des expériences menées par Sarna et al. ont permis de mesurer le CMM au niveau du jéjunum chez le chien, en réponse à une perfusion locale d'atropine (un antagoniste cholinergique muscarinique) ou d'hexaméthonium (un antagoniste cholinergique nicotinique) [212]. L'administration de ces 2 agents pharmacologiques juste avant l'arrivée de la

phase III au niveau du site de perfusion bloque complètement la propagation des contractions de cette phase III. Dès lors, il semblerait que les neurones cholinergiques entériques participent à l'établissement du CMM. Concernant les rôles fonctionnels du CMM, il contribue à débarrasser l'intestin des particules alimentaires non digérées et des sécrétions digestives non réabsorbées. De plus, chez des patients souffrant d'un défaut ou d'une absence de CMM, il est observé une pullulation microbienne de l'intestin grêle [208]. Ainsi, cette activité motrice permet également d'empêcher la colonisation bactérienne intestinale entre les repas. Pour résumer, le CMM a pour but de faire place nette afin de préparer le tube digestif au prochain repas. Enfin, le CMM est immédiatement stoppé par l'ingestion des nutriments [213] et est relayé par d'autres types de contractions intestinales propres à la période postprandiale.

b) Période postprandiale

L'arrivée des nutriments dans le tube digestif va entraîner l'apparition de 2 types d'activité motrice. Le plus connu étant le péristaltisme, qui permet la propulsion du contenu luminal dans le sens aboral. Cependant, l'activité motrice prédominante après un repas est l'activité dite de segmentation, permettant le mixage du chyme ainsi que son contact facilité avec la paroi digestive [214].

b.1) Activité péristaltique

Le réflexe péristaltique provoque une contraction de la couche musculaire circulaire en amont du bol alimentaire (côté oral), et une relaxation de celle-ci en aval (côté anal). Il se forme ainsi un segment d'amont propulsif et un segment d'aval réceptif, se reproduisant de proche en proche, permettant la progression du bol alimentaire dans le sens oro-anal. Le déclenchement du réflexe péristaltique fait suite à l'activation des IPANs. En effet, comme nous l'avons déjà détaillé (voir Partie 2, point III-1)b)), le stretch de la muqueuse intestinale et les sécrétions GI associées à l'arrivée du bol alimentaire vont entraîner une libération de sérotonine qui va être détectée par ces derniers. Ces neurones sensoriels vont alors activer les interneurons entériques ascendants et descendants. Les interneurons ascendants cholinergiques se projettent en direction orale sur les motoneurons excitateurs cholinergiques et tachykininergiques du plexus myentérique, provoquant ainsi la contraction en amont du chyme. Les interneurons descendants, eux, ont un codage neurochimique plus complexe (voir Partie 2, point III-1)b)) et se projettent en direction anale sur les motoneurons

inhibiteurs nitrgiques du plexus myentérique, générant la relaxation en aval du bol alimentaire [215] (**Figure 15**).

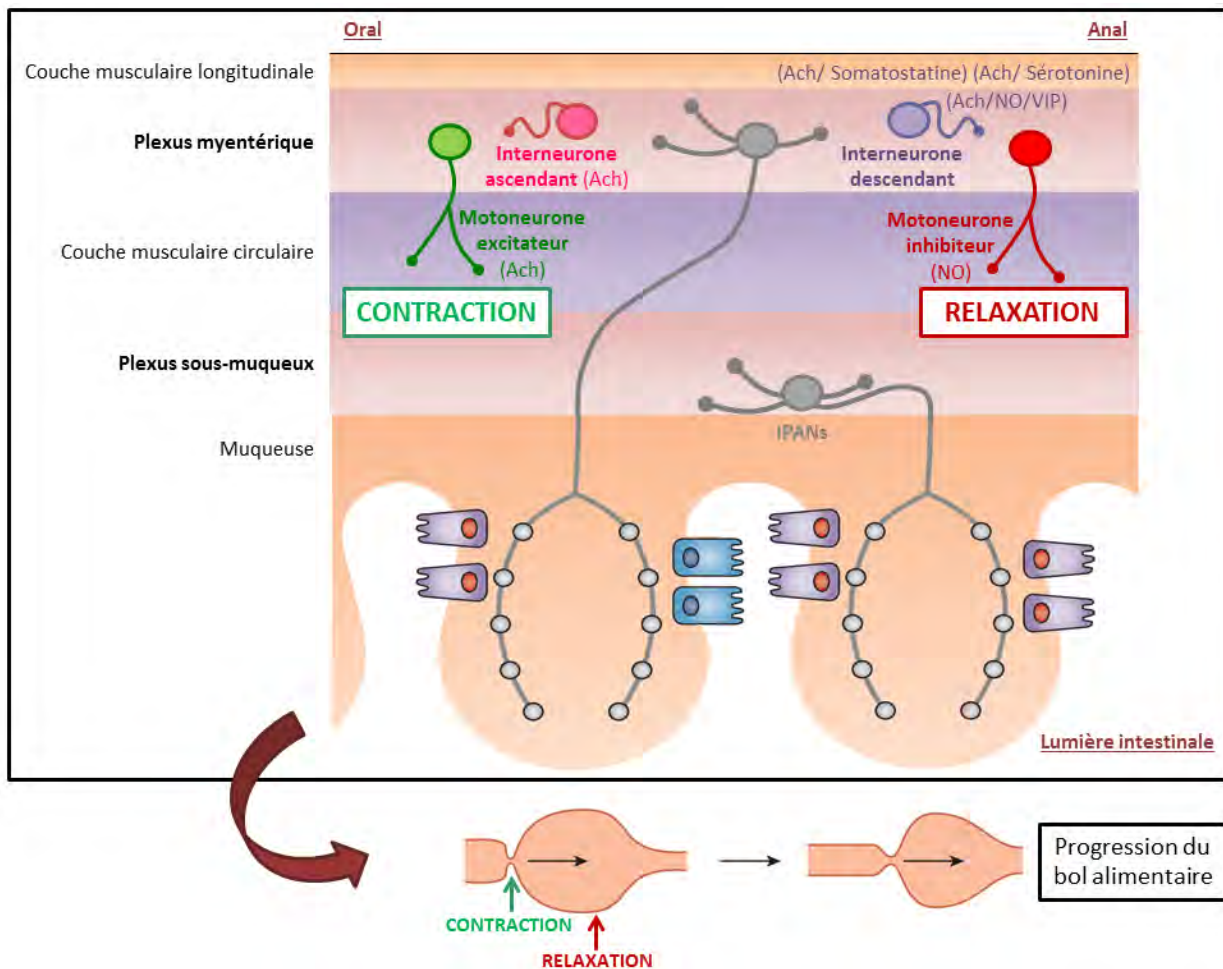


Figure 15: Péristaltisme.

Le déclenchement du réflexe péristaltique fait suite à l'activation des IPANs. Ces neurones sensoriels vont alors activer les interneurons entériques ascendants et descendants. Les interneurons ascendants se projettent en direction orale sur les motoneurons excitateurs cholinergiques et tachykininergiques du plexus myentérique, provoquant ainsi la contraction en amont du chyme. Les interneurons descendants se projettent en direction anale sur les motoneurons inhibiteurs nitrgiques, générant la relaxation en aval du bol alimentaire. Il se forme ainsi un segment d'amont propulsif et un segment d'aval réceptif, se reproduisant de proche en proche, permettant la progression du bol alimentaire dans le sens oro-anal.

b.2) Activité segmentaire

L'activité segmentaire, mise en évidence par Cannon dans les années 1900 [214], va provoquer des contractions régulières et stationnaires tout le long du chyme, divisant ainsi l'intestin en segments. Au niveau de chaque segment d'intestin formé entre 2 contractions de la couche musculaire circulaire, une troisième contraction va se déclencher au centre de celui-ci, afin de forcer

le chyme à se mélanger et à venir contre la paroi absorbative intestinale [216] (**Figure 16**). De plus, ces phases de contraction s'alternent avec des périodes de relaxation, ayant pour conséquence la division et la re-division du chyme, et donc un brassage maximal [217]. Les mécanismes responsables de ces ondes segmentaires sont encore très peu connus. Des évidences indiquent cependant que le SNE participe à l'établissement de ces contractions, puisque le blocage pharmacologique de la neurotransmission entérique abolit la segmentation intestinale induite par des acides gras intraluminaux [217]. De plus, cette activité segmentaire intestinale est également abolie par l'hexaméthonium, suggérant que les récepteurs nicotiques cholinergiques soient impliqués dans les circuits neuronaux sous-jacents [217]. Enfin, des expériences ont montré que l'injection de sérotonine et de CCK sur des fragments de duodénum et de jéjunum entraînait l'apparition de ces contractions segmentaires [218]. Une hypothèse est donc que ces 2 hormones GI puissent être libérées en réponse à l'arrivée des nutriments, déclenchant dans un second temps l'activité segmentaire intestinale.

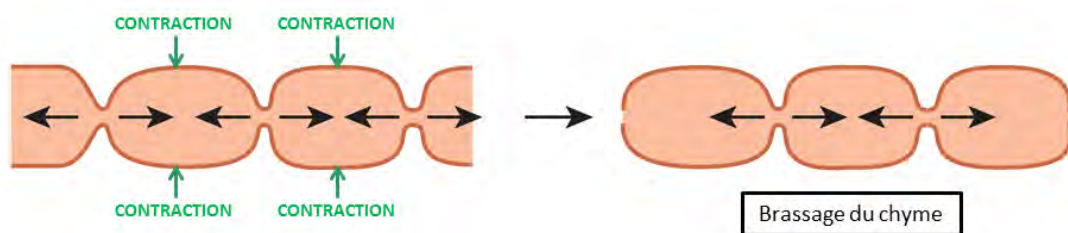


Figure 16: Activité segmentaire.

L'activité segmentaire provoque des contractions régulières et stationnaires tout le long du chyme, divisant ainsi l'intestin en segments. Au niveau de chaque segment d'intestin formé entre 2 contractions de la couche musculaire circulaire, une troisième contraction va se déclencher au centre de celui-ci, afin de permettre un brassage maximal du chyme.

c) Régulation de l'activité motrice

Dans un premier temps, la motricité digestive va essentiellement être dictée par l'alimentation. En effet, l'arrivée des nutriments va elle-même déclencher l'activation des contractions péristaltiques ou segmentaires. De plus, l'incidence relative de ces 2 types de contractions va dépendre de la quantité de nutriments dans la lumière intestinale [219, 220]. En effet, lorsque ceux-ci sont présents, les contractions segmentaires dominent à l'instar du péristaltisme. En revanche quand le contenu luminal est composé de substances non nutritives les contractions de propagations prennent le dessus sur les contractions segmentaires.

Les CIC jouent également un rôle déterminant dans le contrôle neuronal de la contraction musculaire. Comme nous l'avons mentionné, celles-ci sont responsables de l'activité pacemaker de l'intestin [215]. En effet, elles initient des dépolarisations partielles du potentiel de membrane (qui correspondent aux ondes lentes de propagation), dont la rythmicité est à l'origine du Rythme Electrique de Base (REB). Les ondes lentes entraînent rarement des contractions, mais lorsque la dépolarisation atteint le seuil d'excitation, *via* la libération concomitante d'un neurotransmetteur excitateur par les motoneurones entériques, un potentiel d'action se déclenche autorisant ainsi les contractions intestinales. Dès lors, en imposant le REB, les CIC coordonnent l'activité motrice intestinale. La fréquence de ce REB est décroissante le long du tube digestif, ainsi elle est de 12 pics de dépolarisation par min dans le duodénum et tombe à 8 pics par min dans la partie distale de l'iléon [216].

Enfin, même si l'apparition des contractions intestinales ne dépend pas de l'activité du SNC, celui-ci va permettre leur coordination. Par exemple, dans des segments d'intestins grêles ayant été dénervés extrinsèquement chez le chien, on observe une absence d'interruption du CMM en réponse à un repas [221]. De plus, le blocage des conceptions vagues empêche la conversion de la motilité inter-digestive en motilité postprandiale dans n'importe quelle région du tractus digestif ayant subi une dénervation extrinsèque [222, 223]. Toutes ces observations soulignent le rôle de coordination du SNA dans la transition jeûne-digestion.

Partie 3: Axe « intestin-cerveau » : manger, détecter/informer et métaboliser

I- L'axe intestin-cerveau

La connexion entre l'intestin et le cerveau, connue sous le nom d'axe intestin-cerveau, est un concept largement ancré dans l'inconscient collectif. En effet, un bon nombre d'expressions courantes illustre cette communication inter-organes. Par exemple, « avoir des tripes » signifie avoir du courage, « avoir des nœuds à l'estomac » reflète un état de stress, ou encore, « avoir des papillons dans le ventre » traduit la sensation agréable qui nous traverse en présence d'une personne qui nous plaît. De telles expressions ne concernent pas seulement la langue française. Ainsi, en anglais, on pourra par exemple entendre parler de « gut feelings » pour évoquer une conviction profonde. Toutes ces expressions ne sont pas le fruit du hasard, et permettent de mettre en lumière la communication constante entre ces 2 organes. En effet, comme nous l'avons mentionné au cours des 2 premières parties de ce manuscrit, l'intestin est capable de générer plusieurs sortes de signaux, à la fois hormonaux et nerveux, qui vont moduler l'activité centrale. Dès lors, un grand nombre d'études s'accorde pour démontrer que l'axe intestin-cerveau va jouer un rôle majeur dans la physiologie générale de l'organisme.

II- Communication intestin-cerveau dans le contrôle de la prise alimentaire

La régulation de la prise alimentaire est un bon exemple permettant d'illustrer cette connexion entre l'intestin et le cerveau. Cette régulation s'effectue à long terme selon divers paramètres (tels que la température et le poids corporels) de façon à satisfaire les besoins métaboliques de l'organisme. Cependant, cette régulation de l'ingestion est également modulée à l'échelle de la journée, on parle alors de régulation à court terme de la prise alimentaire. Celle-ci exploite divers signaux traduisant les caractéristiques physiques et chimiques du tractus digestif. En effet, comme nous l'avons détaillé précédemment, le tractus GI est le siège de l'absorption des nutriments. L'arrivée de ces derniers va entraîner l'activation de chémo- et mécanorécepteurs situés dans la paroi intestinale aboutissant entre autres, à la libération d'hormones GI. Dès lors, cette détection intestinale des nutriments et les modifications qui vont en résulter, vont pouvoir informer le cerveau afin de moduler les sensations de faim et de satiété.

1) Distension gastrique

Au fur et à mesure de l'ingestion, l'estomac doit recevoir une grande quantité d'aliments. Ceci est permis grâce à l'activation de mécanorécepteurs présents dans la paroi intestinale, qui vont permettre un relâchement progressif des muscles lisses, et donc une dilatation de l'estomac [224]. Ces mécanorécepteurs et ce phénomène de dilatation de l'estomac vont eux-mêmes jouer un rôle important dans la mise en place du signal de satiété durant la prise alimentaire. En effet, plusieurs études chez l'Homme se sont intéressées aux conséquences de la distension gastrique provoquée par l'insertion de ballons gonflables dans l'estomac de volontaires sains. Ces études ont reporté que cette distension gastrique entraînait, chez ces patients, une sensation de satiété pouvant aller jusqu'à une sensation désagréable de « trop plein » directement corrélée au volume de gonflage du ballon [225, 226]. De plus, cette même expérience chez des individus présentant une obésité sévère a également permis de réduire leur sensation de faim, bien que cet effet ne soit que transitoire [227].

Cette modification de l'appétit en fonction de la distension gastrique suggère donc un effet du tractus GI sur le SNC, ce dernier étant le siège de la régulation du comportement alimentaire. A ce titre, plusieurs études ont montré qu'une fois activés, les mécanorécepteurs de l'estomac relayaient l'information à différentes régions centrales, dont le tronc cérébral [228], *via* le nerf vague et les nerfs splanchniques [229]. De plus, une vagotomie chez le rat bloque la satiété induite par la distension gastrique, renforçant l'hypothèse que le nerf vague joue un rôle majeur dans cette communication intestin-cerveau pour la régulation de la satiété [230].

2) Hormones gastro-intestinales

Les sensations à court terme de faim et de satiété sont également régulées par la libération d'hormones GI. Parmi ces différents peptides GI, la ghréline, la CCK, et le GLP-1 sont les plus impliqués dans cet effet, ainsi que les mieux décrits.

a) *Ghréline*

La ghréline est un peptide de 28 acides aminés, produit et sécrété principalement par l'estomac et l'intestin [231]. Cette production est dépendante de l'état énergétique de l'organisme. En effet, les taux circulants de ghréline sont augmentés lorsque l'organisme manque d'énergie (lors de périodes de jeûnes ou en cas d'hypoglycémie par exemple). A l'inverse, ces taux vont diminuer

dans des conditions d'excès d'énergie (après une prise alimentaire, en cas d'hyperglycémie, ou encore en condition d'obésité) [232]. La ghréline a été identifiée comme étant le ligand endogène du Récepteur Sécrétagogue de l'Hormone de Croissance (GHSR) [233]. Ce récepteur appartenant à la famille des RCPG est fortement exprimé en périphérie, et a notamment été retrouvé au niveau du pancréas, du tissu adipeux, de l'intestin et sur les afférences vagales GI [234, 235]. Il est également présent au niveau central, dans plusieurs noyaux de l'hypothalamus et plus particulièrement sur les neurones orexigènes à NeuroPeptide Y (NPY) du noyau arqué [236, 237].

Etant donnée la modulation des taux de ghréline en fonction de l'état énergétique de l'organisme, plusieurs études se sont intéressées à son rôle dans l'homéostasie énergétique. Ainsi, il a été mis en évidence que l'administration centrale ou périphérique de cette hormone GI, entraînait une augmentation de la prise alimentaire, que ce soit chez le rongeur ou chez l'Homme [238, 239]. De plus, l'administration d'antagonistes pour GHSR a pour effet de réduire la prise alimentaire chez les souris [240]. Par ailleurs, les souris déficientes pour le gène de la ghréline ou son récepteur sont résistantes à l'obésité induite par un régime riche en graisse et en sucre [240]. Aussi, des souris diabétiques invalidées pour la ghréline ont une hyperphagie diminuée [241], et la perte de la ghréline améliore le statut diabétique des souris ob/ob (souris rendues diabétiques suite à la délétion du récepteur à la leptine) [242]. L'ensemble de ces résultats démontrent que la ghréline est capable d'agir au niveau central afin d'induire un effet orexigène. A ce titre, la ghréline est à l'heure actuelle, le seul facteur GI décrit capable d'augmenter l'appétit. Cet effet vaut souvent l'appellation de cette hormone GI comme « hormone de la faim » [243].

A ce titre, il a été montré une augmentation de l'expression de c-Fos au sein du noyau arqué en réponse à une injection périphérique de ghréline [244]. Ces données ont été complétées par une étude rapportant une augmentation de l'activité des neurones orexigènes NPY et AgRP de ce même noyau, suite à l'injection icv de ghréline [245]. Bien que la ghréline circulante puisse traverser la BHE, il a été révélé que ce passage était très faible, suggérant ainsi que les effets centraux de cette hormone GI s'établissaient plutôt *via* une voie nerveuse afférente [246]. Confirmant cette hypothèse, il a été observé une diminution de l'activité du nerf vague en réponse à la ghréline, ainsi qu'une perte de son effet orexigène chez des rats vagotomisés [235]. Ainsi, la ghréline produite au niveau intestinal est capable de modifier l'activité du nerf vague, permettant une modulation de l'activité de neurones hypothalamiques impliqués dans la régulation du comportement alimentaire.

b) Cholécystokinine (CCK)

La CCK est une protéine produite au niveau intestinal, et plus particulièrement au niveau duodénal et jéjunal par les cellules I [247]. De plus, la CCK est également fortement exprimée au sein du SNC, notamment dans certains noyaux hypothalamiques [248]. Tout comme la ghréline, les taux plasmatiques de CCK vont dépendre de l'état énergétique de l'organisme. En revanche, à l'inverse de la ghréline, les taux de CCK sont augmentés suite à une prise alimentaire, et diminuent lors d'un jeûne [249]. Il existe 2 récepteurs à la CCK, CCK-1 et CCK-2, tout 2 appartenant à la famille des RCPG [250]. Ces 2 récepteurs sont largement distribués dans l'ensemble de l'organisme. Toutefois, CCK-2 est majoritairement retrouvé dans l'ensemble du SNC [251], alors qu'à l'inverse, CCK-1 est plutôt exprimé en périphérie. Ce dernier est notamment présent au niveau du pancréas [252], de l'estomac [253], des muscles lisses intestinaux [254], ainsi que sur les afférences vagales [255].

Les antagonistes de CCK-1 augmentent la prise alimentaire chez le rat et chez l'Homme [256]. De plus, des rats déficients pour ce récepteur sont hyperphagiques et développent une obésité [256]. Enfin, l'injection systémique de CCK permet de réduire la prise alimentaire chez le rat [257]. L'ensemble de ces résultats a permis de définir le rôle physiologique de la CCK dans le contrôle de la prise alimentaire en tant que facteur satiétogène.

Concernant les mécanismes impliqués, l'équipe de Smith et al. a montré qu'une vagotomie chez le rat permettait de supprimer l'effet anorexigène de la CCK [258]. Par la suite, il a été décrit une diminution de l'activité des neurones du tronc cérébral en réponse à la CCK, chez des animaux dont le nerf vague a été inhibé suite à un traitement à la capsaïcine [259]. Tout ceci suggère donc que la CCK, produite par l'intestin en réponse à une prise alimentaire, entraînerait une activation du nerf vague suite à sa fixation sur son récepteur CCK-1 présent au niveau des afférences vagales gastro-intestinales. L'information serait ainsi relayée au cerveau induisant la sensation de satiété. Néanmoins, les mécanismes s'établissant au niveau du SNC sont encore peu connus. Les seules informations disponibles sont une augmentation de l'expression de c-Fos au niveau du NTS, du PVN et du noyau supraoptique en réponse à une injection périphérique de CCK. De même, cette expression est perdue suite à une vagotomie ou à l'utilisation d'un antagoniste de CCK-1 [260, 261].

c) Glucagon Like Peptide- 1 (GLP-1)

Comme nous l'avons mentionné dans la première partie de ce manuscrit, le GLP-1 est un peptide produit par les cellules L intestinales en réponse aux nutriments. Une fois sécrété, le GLP-1

va d'abord se retrouver dans la circulation sanguine afin d'exercer son effet incrétine *via* une stimulation directe de la production d'insuline par le pancréas associée à une augmentation de la sensibilité à l'insuline [262]. De plus, comme nous le détaillerons dans la partie suivante, le GLP-1 va également pouvoir activer les neurones entériques et les terminaisons nerveuses afférentes innervant le tractus GI. De cette manière, cette hormone va activer l'axe intestin-cerveau afin d'exercer plusieurs rôles.

Parmi ceux-ci, il a été montré que l'administration de GLP-1, qu'elle soit centrale ou périphérique, réduisait drastiquement la prise alimentaire chez les rongeurs [262-264]. De plus, chez le rat, une administration icv aïgue d'exendine 9-39 (un antagoniste du récepteur au GLP-1) augmente la prise alimentaire et son administration chronique augmente la prise de poids [265]. Ainsi, il semble que la signalisation périphérique par le GLP-1 intervienne dans les mécanismes physiologiques qui réduisent l'appétit et la prise alimentaire suite à un repas. De plus, il a été montré que la réduction de la prise alimentaire après une administration périphérique de GLP-1 pouvait être abolie par une vagotomie [266]. Cette dernière observation suggère donc que l'effet du GLP-1 sur la prise alimentaire serait un effet paracrine, *via* l'activation des afférences vagales locales, plutôt qu'un effet endocrine.

d) Peptide YY (PYY)

Tout comme le GLP-1, le PYY est principalement produit par les cellules L intestinales dans l'iléon et le côlon. Sa sécrétion est augmentée suite à un repas et est réduite par le jeûne [267]. Il existe 2 formes de PYY, la forme entière PYY₁₋₃₆ et la forme tronquée PYY₃₋₃₆, cette dernière étant la forme circulante majoritaire [268]. Ces 2 formes se lient aux récepteurs Y appartenant à la famille des RCPG. Il existe 4 sous-types de récepteurs (Y1R à Y4R) tous couplés à une protéine G_i, cependant la forme tronquée PYY₃₋₃₆ se lie préférentiellement au récepteur Y2R [268]. Celui-ci est retrouvé dans l'hypothalamus, plus précisément au niveau des neurones orexigènes NPY de l'ARC [269].

Parmi les effets de ce peptide GI, il a été montré qu'une administration périphérique de PYY₃₋₃₆ réduisait significativement la prise alimentaire chez le rongeur et chez l'Homme [270]. Concernant les mécanismes moléculaires, plusieurs hypothèses subsistent et ne sont toujours pas à l'heure actuelle totalement élucidées. Tout d'abord, il a été montré que les effets de PYY₃₋₃₆ sur la prise alimentaire étaient totalement abolis chez des souris déficientes pour Y2R [270]. Ainsi l'effet inhibiteur de la prise alimentaire de PYY₃₋₃₆ serait médié par sa liaison sur le récepteur inhibiteur Y2R

exprimé par les neurones orexigènes NPY de l'ARC. Confirmant cette hypothèse, dans la même étude il a été montré qu'une administration périphérique de PYY₃₋₃₆ augmentait l'expression du marqueur c-Fos à ce niveau. En revanche, une autre étude a montré que tous ces effets de PYY₃₋₃₆, que ce soit sur la prise alimentaire ou sur l'activité neuronale hypothalamique, étaient abolis suite à une vagotomie chez le rongeur [266].

3) Frein iléal

La régulation à court terme de la prise alimentaire fait également appel au contrôle de segments gastro-intestinaux proximaux par des segments plus distaux. A ce titre, il a été montré que dans des conditions physiologiques, des nutriments non digérés dans les parties hautes de l'intestin pouvaient atteindre l'iléon. L'arrivée du bol alimentaire à ce niveau déclenche, par des mécanismes de rétrocontrôle, un ralentissement de la vidange gastrique et de la vitesse de transit dans l'intestin grêle [271]. Ce phénomène est connu sous le nom de frein iléal. Des études chez l'animal et chez l'Homme ont montré que l'activation de ce frein iléal en réponse à une infusion de nutriments, augmentait la sensation de satiété et réduisait la prise alimentaire [272-274].

Concernant les médiateurs de ce frein iléal, de nombreux travaux démontrent le rôle de 2 hormones GI également connues pour leurs effets satiétogènes: le PYY et le GLP-1 (pour revue [271]). En effet, l'association entre un ralentissement du transit intestinal et la libération de PYY, en réponse à des perfusions iléales de gras a clairement été démontrée [275, 276]. De plus, cet effet est perdu suite à l'immunoneutralisation de PYY [277]. De la même façon, chez le rat, l'inhibition de la motilité gastrique, duodénale et jéjunale observée en réponse à une perfusion intra-iléale de protéines, est inhibée suite à l'infusion d'un antagoniste du récepteur au GLP-1 [278]. Des évidences indiquent également que ces 2 peptides puissent agir de façon synergique dans l'activation du frein iléal et dans la diminution de la prise alimentaire qui en résulte [279, 280]. Enfin, la dénervation extrinsèque jéjuno-iléale inhibe également les effets d'une perfusion iléale de gras sur la vidange gastrique [281]. Ces résultats démontrent donc que des signalisations neurales sont impliquées dans l'inhibition du transit intestinal après l'activation du frein iléal. De façon similaire, comme nous l'avons mentionné précédemment, une vagotomie réduit ou abolit les effets du PYY et du GLP-1 sur la prise alimentaire. L'ensemble de ces observations suggèrent ainsi que des mécanismes hormonaux et nerveux interagissent pour produire les effets inhibiteurs de la prise alimentaire par l'activation du frein iléal.

4) Néoglucogénèse intestinale

Il est clairement établi qu'un régime riche en protéines diminue la sensation de faim et par conséquent la prise alimentaire, à la fois chez l'animal et chez l'Homme [282, 283]. Par ailleurs, il a été observé une augmentation significative de l'expression de 2 enzymes clefs impliquées dans la néoglucogénèse intestinale, à savoir la glucose-6-phosphatase et la phosphoenolpyruvate carboxykinase, chez des rats nourris avec un régime riche en protéines [284]. L'induction de cette néoglucogénèse déclenche alors un flux de glucose jusqu'à la veine hépato-portale, représentant 15 à 20% de la production endogène de glucose [285]. De plus, l'infusion de taux équivalents de glucose directement dans la veine hépato-portale de rats en période post-absorptive, suffit à diminuer leur prise alimentaire [285]. Dès lors, il est apparu que la néoglucogénèse intestinale, et donc la libération de glucose dans la circulation portale qui en résulte, constituait un mécanisme clef dans l'effet satiétogène induit par un régime riche en protéines. Venant confirmer cette hypothèse, il a été montré chez le rat, une activation de l'expression de c-Fos au niveau hypothalamique en réponse à un régime riche en protéines ou à une infusion portale de glucose. En revanche, ce marquage ainsi que l'effet satiétogène de ce régime sont perdus chez des rats vagotomisés [286].

Concernant les mécanismes impliqués, il a été montré qu'en période postprandiale, les oligopeptides résultants de la protéolyse des protéines alimentaires étaient libérés dans la circulation portale [287]. A ce niveau, ces oligopeptides sont capables d'antagoniser les Récepteurs Mu-Opiïdes (MORs), eux-mêmes présents sur les fibres nerveuses contenues dans la paroi de la veine porte. Une fois ces nerfs activés par les MORs, ils vont emprunter le nerf vague ou la moelle épinière pour atteindre le cerveau. Au niveau central, ces 2 routes nerveuses vont relayer leurs informations à leurs cibles spécifiques, à savoir l'hypothalamus et le NTS pour le nerf vague, et le noyau parabrachial et la substance grise périaqueducule pour la moelle épinière. En retour, l'intégration centrale de ces signaux va induire l'expression intestinale des enzymes clefs de la néoglucogénèse. Le déclenchement de la néoglucogénèse intestinal va alors entraîner la libération de glucose au niveau hépato-portal, qui va être détecté par des senseurs présents à ce niveau. Parmi-eux, de nombreuses évidences suggèrent un rôle clef de GLUT-2 et SGLT-3 dans la détection portale du glucose [288-290]. Enfin, ce « glucosensing » portal va entraîner l'activation des noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire aboutissant à la sensation de satiété observée lors d'un régime riche en protéines [284] (**Figure 17**).

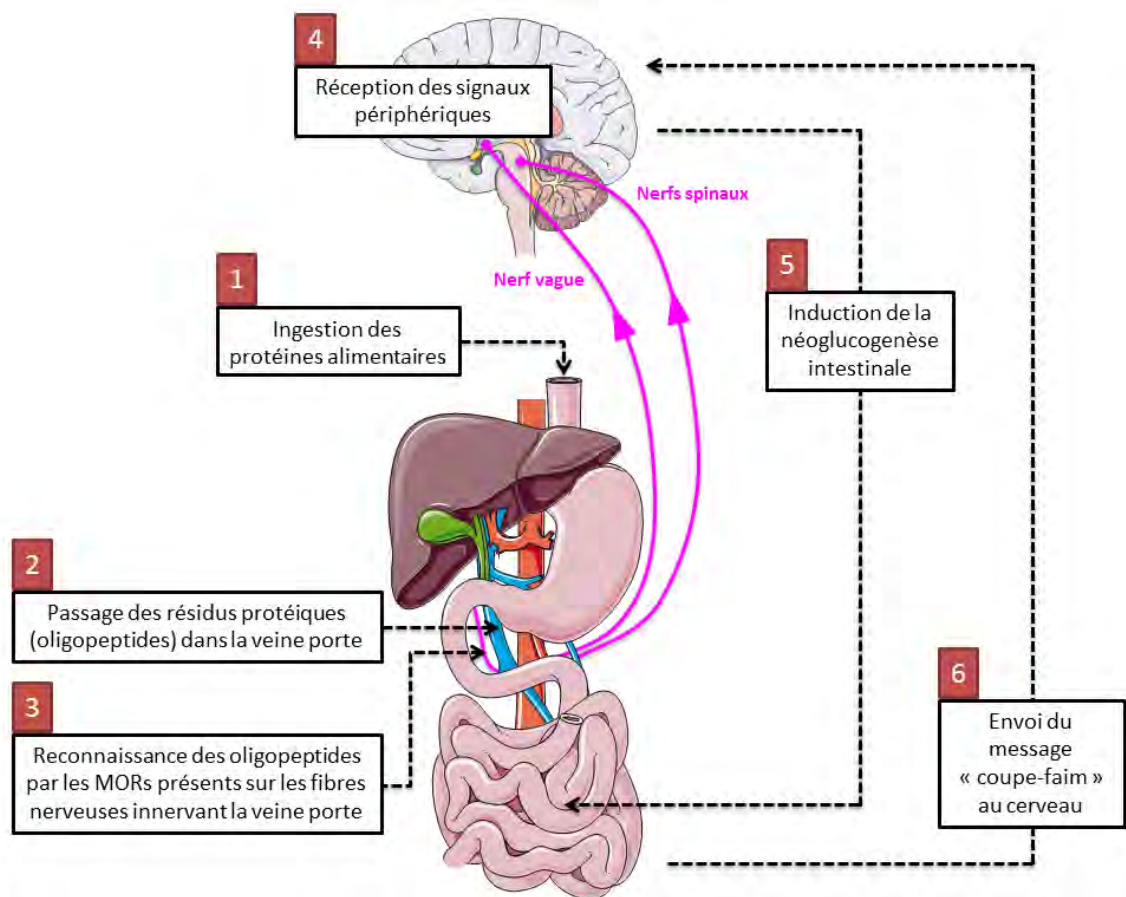


Figure 17: Schéma récapitulatif de la néoglucogénèse intestinale (adapté de Duraffourd et al. [287]).

MORs : Récepteurs Mu-Opioides.

L'ensemble de ces données met en lumière l'existence d'un axe de communication entre l'intestin et le cerveau, ainsi que l'importance de cette connexion dans la physiologie de l'organisme. En particulier, ces dernières années, de nombreuses études se sont penchées sur le rôle crucial de cet axe dans le contrôle de l'homéostasie glucidique.

III- « Glucosensing » intestinal

1) Généralités

L'implication de l'axe intestin-cerveau dans le contrôle du métabolisme glucidique repose en grande partie sur la capacité du tractus GI à détecter spécifiquement le glucose. En effet, étant

donné que ce dernier constitue le premier site anatomique en contact avec le glucose ingéré, il va occuper une place centrale dans la détection de celui-ci, encore appelée « glucosensing ». A ce titre, tout le long de ce tractus GI (cavité orale, intestin, veine porte, pancréas), existe des cellules spécialisées dans cette détection glucidique, nommées glucosenseurs. Dans ce manuscrit, nous détaillerons uniquement le « glucosensing » se déroulant dans l'intestin grêle. Par ailleurs, la détection de glucose par ces cellules va entraîner des réponses neuronales et endocrines contrôlant, dans un deuxième temps, le métabolisme glucidique. De plus, ce « glucosensing » intestinal va également transmettre des messages nerveux afférents jusqu'au cerveau, en particulier à l'hypothalamus, qui, comme nous l'avons vu dans la première partie de ce manuscrit, joue un rôle clef à la fois dans la détection et le métabolisme du glucose. Après l'intégration de l'ensemble de ces messages, l'hypothalamus va envoyer des signaux spécifiques aux tissus périphériques impliqués dans le métabolisme glucidique. L'ensemble de cette communication inter-organes aboutit au contrôle de la glycémie.

2) Types cellulaires impliqués

a) Entérocytes

Au niveau intestinal, plusieurs types cellulaires sont capables de détecter le glucose luminal. Tout d'abord, l'entérocyte constitue le type cellulaire majeur bordant la muqueuse intestinale, et représente donc une interface importante entre le glucose ingéré et le reste de l'organisme. De plus, les entérocytes sont impliqués dans l'absorption des nutriments, et en particulier du glucose, *via* les transporteurs SGLT-1 et GLUT-2 (voir Partie 2, point IV-2)) (**Figure 18**). Cette fonction absorptive indique que ces derniers pourraient jouer un rôle fondamental dans le « glucosensing » intestinal. Cette notion est confirmée par le fait que l'absorption de glucose déclenche une activation des nerfs afférents. Par ailleurs, cet effet est aboli par la phloridzine, un analogue structural du glucose qui agit comme inhibiteur compétitif de celui-ci sur les SGLTs, et n'est pas observé avec des carbohydrates non absorbés [291].

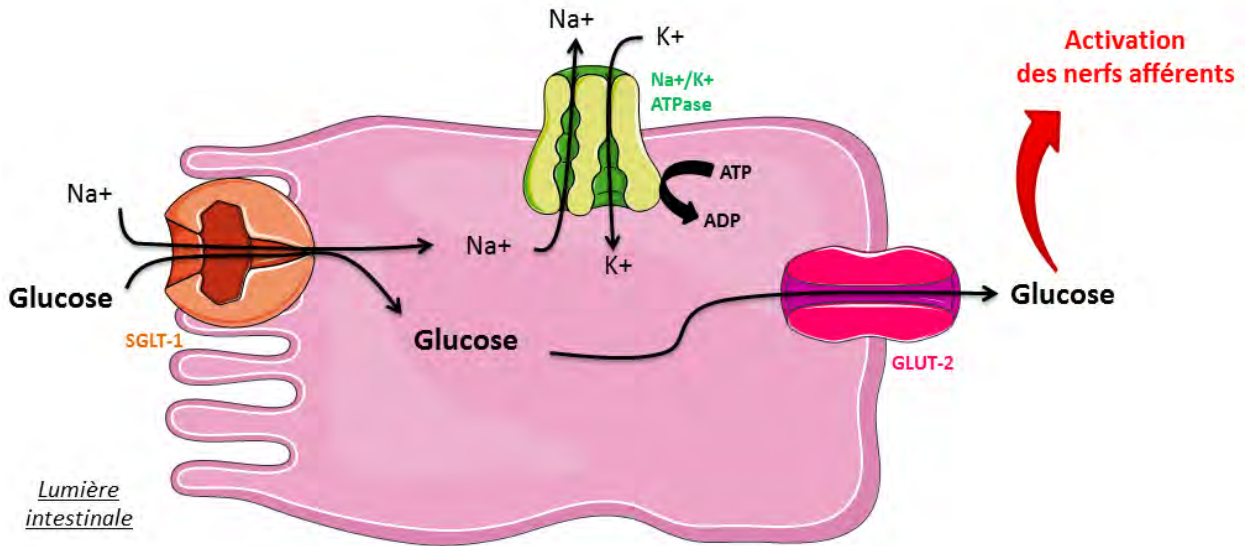


Figure 18: Détection du glucose par les entérocytes.

Dans les entérocytes, le transport apical du glucose se fait via le transporteur SGLT-1 selon le gradient électrochimique du sodium (Na^+) provoqué par la pompe Na^+/K^+ ATPase. En revanche, le glucose est expulsé de la cellule par diffusion facilitée via le transporteur GLUT-2 situé sur la membrane baso-latérale de l'entérocyte. Cette absorption de glucose déclenche une activation des nerfs afférents.

b) Brush cells

En plus des entérocytes absorbants classiques, il existe un type distinct d'entérocytes impliqués dans le «glucosensing» intestinal. Ceux-ci sont regroupés sous le nom de « brush cells » [292]. Ces cellules partagent des similitudes morphologiques avec les cellules du goût retrouvées au niveau lingual. De plus, ces cellules expriment également le récepteur aux saveurs sucrées, à savoir l'hétérodimère entre les récepteurs TAS1R2 (TASte 1 Receptor 2) et TAS1R3 (TASte 1 Receptor 3) [292]. Il s'agit de récepteurs appartenant à la famille des RCPG, couplés à l' α -gustucine. La fixation de composés sucrés sur cet hétérodimère active la phospholipase C- β 2, aboutissant à la libération de calcium à partir des stocks intracellulaires. Cette voie de signalisation va alors autoriser l'ouverture de canaux ioniques, tels que les canaux Transient Receptor Potential cation channel subfamily M member 5 (TRPM5), laissant entrer les ions sodium et calcium. La dépolarisation membranaire de la cellule qui en résulte va générer une libération d'ATP, lui-même agissant sur les fibres nerveuses afférentes et conduisant à la perception du goût [32]. Etant donnée la similarité avec les cellules du goût de la cavité orale, il a été suggéré que les « brush cells » pourraient également participer au processus de « glucosensing » intestinal, et ceci selon un mécanisme analogue à celui des bourgeons du goût de l'épithélium lingual (**Figure 19**). A ce titre, il a été montré que la perfusion intestinale de

ligands de TAS1R2 et TAS1R3 stimulent fortement l'absorption intestinale de glucose *via* la translocation apicale de GLUT-2 [293].

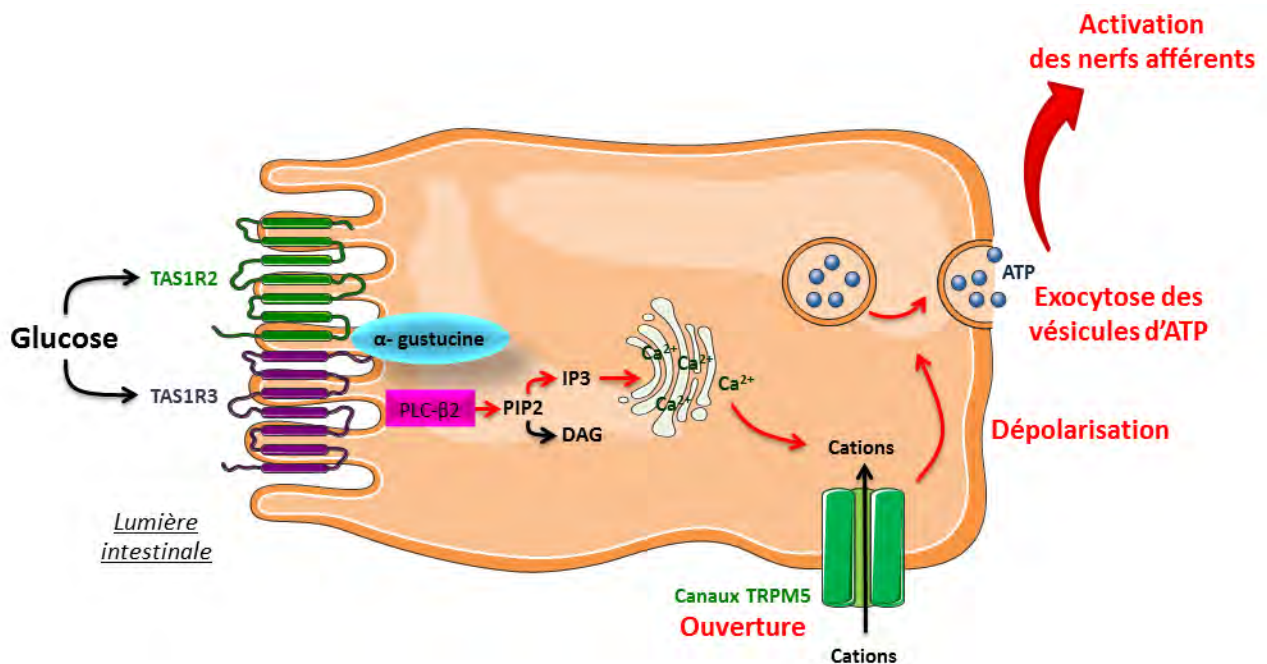


Figure 19: Détection du glucose par les Brush cells.

Les Brush cells expriment le récepteur aux saveurs sucrées, également retrouvé au niveau des bourgeons du goût, à savoir l'hétérodimère entre les récepteurs TAS1R2 (TAS1 Receptor 2) et TAS1R3 (TAS1 Receptor 3). Une fois activé par le glucose cet hétérodimère interagit avec une protéine G, α -gustucine, elle-même activant la PhosphoLipase C- β 2 (PLC- β 2). Cette PLC- β 2 clive le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate en 1,4,5-triphosphate (IP3) et en DiAcylGlycerol (DAG). IP3 stimule la libération de calcium (Ca^{2+}) à partir des stocks du réticulum endoplasmique. Cette élévation des taux intracellulaires de calcium active les canaux Transient Receptor Potential cation channel subfamily M member 5 (TRPM5). La dépolarisation membranaire de la cellule qui en résulte va générer une libération d'ATP, lui-même agissant sur les fibres nerveuses afférentes.

c) Cellules entéro-endocrines

A côté des entérocytes, les cellules EEs sont également impliquées dans la détection du glucose au niveau de l'intestin grêle. Après avoir détecté le glucose, ces cellules sécrètent des hormones GI informant l'organisme sur son statut nutritionnel [33]. Parmi ces EEs, les cellules L et K, libérant le GLP-1 et le GIP respectivement, sont les 2 populations majeures impliquées dans ce « glucosensing » intestinal [32, 33]. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la sécrétion de ces hormones GI en réponse au glucose. Le plus connu et décrit est l'absorption de glucose *via* SGLT-1. Le co-transport de sodium avec le glucose va entraîner une dépolarisation membranaire des cellules EEs, conduisant à l'ouverture des canaux calciques et par conséquent, à la libération du GLP-1 et de GIP (**Figure 20**). Confirmant cela, il a été montré que l'inhibition

pharmacologique de SGLT-1 *in vitro*, abolissait la sécrétion de ces 2 peptides GI [33]. De plus, des souris déficientes pour SGLT-1 présentent des taux de GLP-1 et GIP réduits suite à une administration orale de glucose.

Par ailleurs, suite à son transport dans les cellules L et K *via* SGLT-1, le glucose entre également dans la voie de la glycolyse pour générer de l'ATP. Cette augmentation des taux intracellulaires d'ATP entraîne la fermeture des canaux K_{ATP} suivie d'une dépolarisation membranaire, de l'ouverture des canaux calciques, et de la libération de GIP et GLP-1 (**Figure 20**). Ainsi, des études montrant une augmentation de la sécrétion de GLP-1 *in vitro* suite au blocage des canaux K_{ATP} suggèrent un rôle potentiel du métabolisme du glucose dans la sécrétion des hormones GI [32].

Enfin, l'implication des récepteurs du goût sucré (les hétérodimères TAS1R2/TAS1R3) dans la stimulation de la sécrétion de ces peptides GI a également été proposée (**Figure 20**). En effet, il a été montré une co-localisation entre α -gustucine, le GLP-1 et le GIP dans l'intestin grêle [32, 33]. De plus, plusieurs agonistes pour ces récepteurs du goût sucré peuvent entraîner une sécrétion de GLP-1, *in vitro*, à partir de cellules EEs provenant de souris ou d'humains. A l'inverse, des souris déficientes pour TAS1R3, présentent un défaut dans la sécrétion de GLP-1 induite par le glucose [32, 33].

Une fois sécrétées, ces hormones GI diffusent dans la circulation sanguine ou se fixent sur leurs récepteurs spécifiques présents sur les neurones entériques et/ou sur les terminaisons nerveuses afférentes.

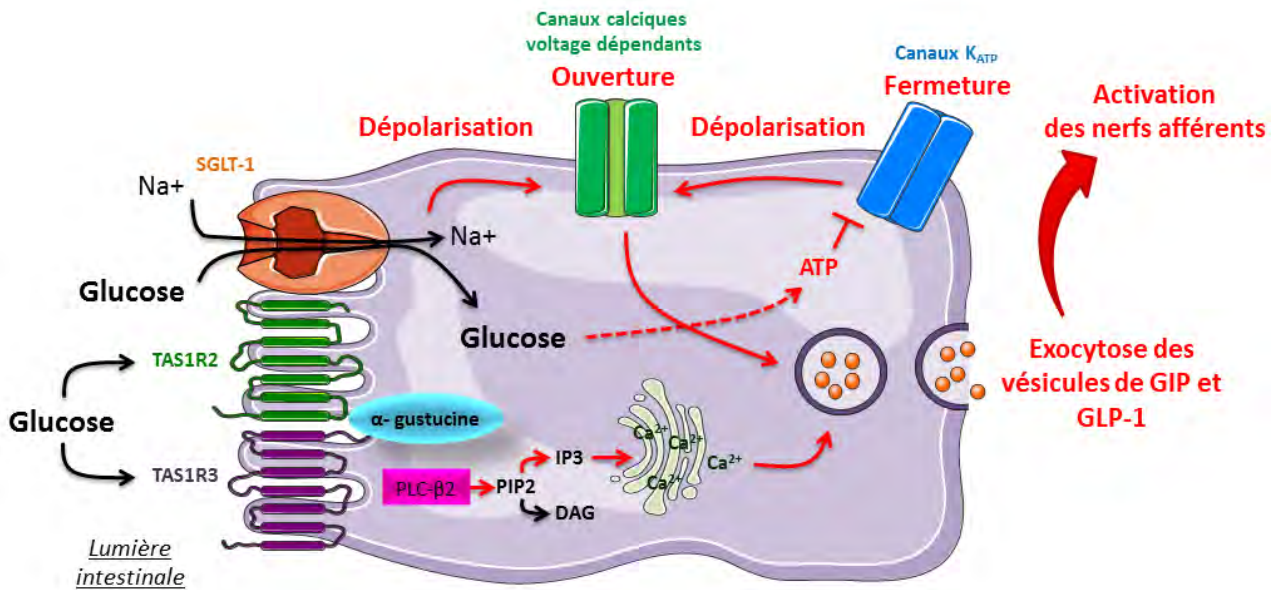


Figure 20: Détection du glucose par les cellules entéro-endocrines.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la sécrétion de ces hormones GI en réponse au glucose. Tout d'abord, le glucose peut entrer dans cette cellule via SGLT-1. Le co-transport de sodium (Na^+) avec le glucose va entraîner une dépolarisation membranaire des cellules EE, conduisant à l'ouverture des canaux calciques et par conséquent, à la libération du GLP-1 et de GIP. Par ailleurs, suite à son transport dans les cellules EE via SGLT-1, le glucose entre également dans la voie de la glycolyse pour générer de l'ATP. Cette augmentation des taux intracellulaires d'ATP entraîne la fermeture des canaux potassiques ATP- dépendants (canaux K_{ATP}) suivie d'une dépolarisation membranaire. Il en résulte une ouverture des canaux calciques, suivie d'une libération de GIP et GLP-1. Enfin, l'implication des récepteurs du goût sucré (les hétérodimères TAS1R2/TAS1R3) dans la stimulation de la sécrétion de ces peptides GI a également été proposée, selon les mécanismes précédemment décrits.

d) Neurones entériques

Bien que le SNE soit classiquement connu pour contrôler la motilité, la sécrétion et l'absorption intestinale, des évidences récentes suggèrent son implication dans le « glucosensing ». En effet, il a été montré que l'infusion intra-intestinale de glucose entraînait une augmentation de l'expression de c-Fos dans les neurones entériques chez des rats conscients [294]. Ce « glucosensing » par les neurones entériques peut avoir lieu *via* une voie de signalisation directe ou indirecte. Premièrement, ceux-ci peuvent être activés indirectement par les hormones GI sécrétées par les cellules EE suite à la détection de glucose (**Figure 21**). Dans cet optique, des avancées technologiques récentes ont permis de générer des modèles de souris transgéniques permettant d'identifier des cellules neuronales, au sein du SNE, exprimant le récepteur au GLP-1 [295].

Deuxièmement, les neurones entériques, semblent être capables de détecter directement le glucose. En effet, dès 1999, Liu et al. ont identifié des neurones répondant au glucose dans l'intestin grêle de cobaye [296]. Ces neurones ont pu être distingués des autres populations neuronales suite à l'observation de leur hyperpolarisation en réponse à l'élimination du glucose du milieu extracellulaire. Cet effet est inversé suite à la réintroduction du glucose, ou à l'ajout d'un inhibiteur des canaux K_{ATP} , suggérant que l'excitation des neurones entériques par le glucose pourrait être induite par l'inhibition de ces canaux. De plus, des expériences d'immunofluorescence ont démontré que les neurones entériques, à la fois du plexus myentérique et du plexus sous-muqueux, expriment le transporteur du glucose SGLT-3 [297] (**Figure 21**). Cette donnée suggère que ce transporteur pourrait également jouer le rôle de senseur glucidique dans les neurones entériques.

Une fois activés par le glucose, les neurones entériques vont pouvoir activer d'autres neurones entériques dans le SNE, ou transmettre ces informations glycémiques au niveau central, *via* les nerfs afférents (**Figure 21**).

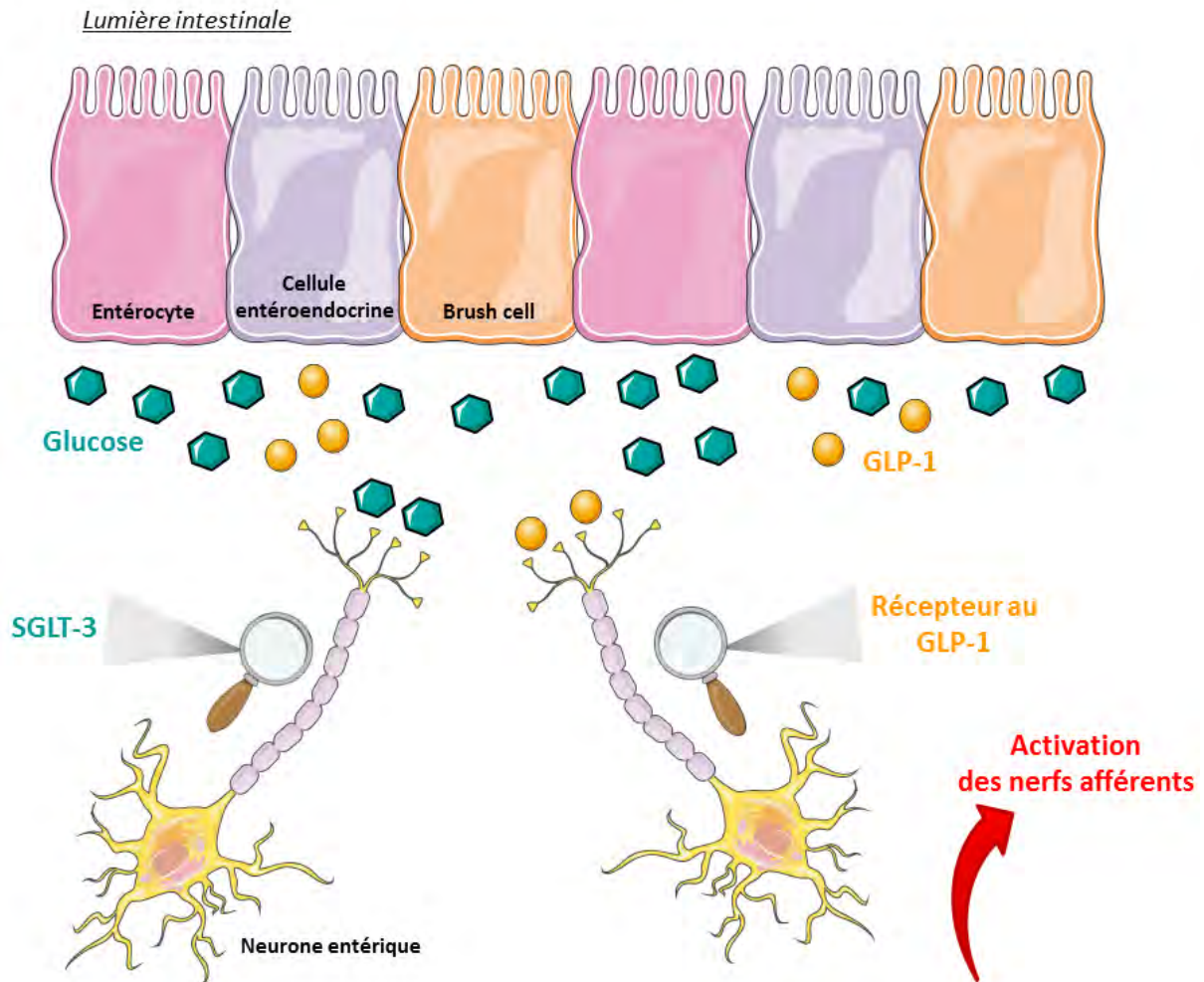


Figure 21: Détection du glucose par les neurones entériques.

Les neurones entériques sont également des cellules glucosensitives. Premièrement, certains d'entre eux expriment le récepteur au GLP-1, et peuvent donc être activés par cette hormone GI sécrétée par les cellules EE en réponse au glucose. Par ailleurs, les neurones entériques semblent être également capables de détecter eux-mêmes le glucose via l'expression du transporteur du glucose SGLT-3. Une fois activés par le glucose, les neurones entériques vont pouvoir activer d'autres neurones entériques dans le SNE, ou transmettre ces informations glycémiques au niveau central, via les nerfs afférents.

Comme nous l'avons abordé dans la première partie de ce manuscrit, cette détection intestinale de glucose va être transmise aux tissus périphériques impliqués dans le contrôle du métabolisme glucidique. De plus, ce « glucosensing » intestinal va également être relayé jusqu'au cerveau, en particulier jusqu'à l'hypothalamus. A ce niveau, l'intégration des différents messages provenant du tractus GI va permettre l'établissement de réponse adaptées jusqu'au tissus périphériques impliqués dans le contrôle du métabolisme glucidique. Dès lors, cet axe intestin-cerveau va jouer un rôle primordial dans le contrôle de l'homéostasie glucidique.

IV- Communication intestin-cerveau dans le contrôle du métabolisme glucidique

1) Axe intestin-cerveau et utilisation périphérique de glucose

Une fois produit par les cellules L en réponse au glucose, le GLP-1 va pouvoir agir sur les afférences du SNA, en particulier sur le nerf vague, et ainsi établir une connexion avec le cerveau [298]. De plus, des travaux montrent également que le récepteur au GLP-1 est nécessaire au niveau central afin de permettre l'effet insulino-trope de ce peptide. En effet, chez la souris, l'injection centrale d'un antagoniste de ce récepteur réduit fortement la production d'insuline en réponse à une charge intra-gastrique de glucose [299]. Ceci suggère que le GLP-1 est également sécrété dans le cerveau en réponse à la détection intestinale de glucose.

Dès lors, le modèle suivant a été proposé [300] (**Figure 22**): au début d'un repas, la détection de glucose par l'intestin entraîne une libération de GLP-1, conduisant à l'émission d'un message nerveux afférent jusqu'au tronc cérébral. L'intégration de ces messages entériques va également générer une synthèse de GLP-1 par le tronc cérébral. Le GLP-1 produit va ensuite être libéré dans l'hypothalamus pour se fixer sur ses récepteurs présents au niveau de cette structure. La modification de l'activité neuronale hypothalamique qui va en résulter, va permettre l'envoi de signaux jusqu'au pancréas, entraînant une libération d'insuline, ainsi qu'aux muscles squelettiques, en vue de les préparer à capter le glucose circulant. A la fin du repas, c'est-à-dire en condition d'hyperglycémie postprandiale, se rajoute à la détection entérique de glucose, une détection directe de cette molécule par le cerveau [299]. En conséquence, un signal opposé à ceux déclenchés par les senseurs entériques au glucose sera envoyé aux muscles, aboutissant à une insulino-résistance musculaire transitoire. Ce mécanisme permettra alors de rediriger le glucose vers le foie afin de permettre sa mise en réserve sous forme de glycogène, et ainsi préparer la période de jeûne entre 2 repas.

Par ailleurs, l'utilisation de sondes ampérométriques (permettant de mesurer spécifiquement et en temps réel la libération de NO) implantées directement dans l'hypothalamus de souris, a permis de démontrer que la libération de NO à ce niveau était stimulée suite à l'activation des senseurs glucidiques entériques [301]. Comme nous l'avons mentionné dans la première partie de ce manuscrit, la production hypothalamique de NO aboutit à une élévation du flux sanguin périphérique, associée à une augmentation de l'utilisation de glucose chez la souris [123]. A l'inverse, l'utilisation d'inhibiteurs des NOS au niveau hypothalamique, entraîne une hyperglycémie périphérique et une résistance à l'insuline chez la souris [302]. Ainsi, il est légitime de penser que le

NO hypothalamique pourrait être ciblé par la détection entérique de glucose pour, en retour, participer au contrôle de l'homéostasie glucidique.

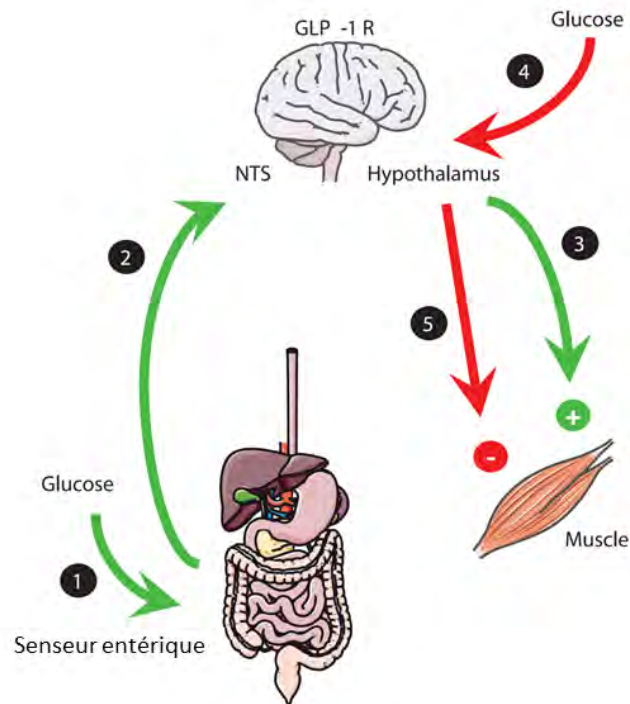


Figure 22: Axe intestin-cerveau et utilisation périphérique de glucose (d'après Knauf et al. [300]).

La détection entérique de glucose provoque l'émission d'un message nerveux entraînant la libération de GLP-1 au niveau hypothalamique. Cette production de GLP-1 entraîne à son tour un message nerveux jusqu'aux muscles afin de les préparer à capter le glucose circulant. Lorsque le cerveau détecte lui-même le glucose, il élabore alors un second message, antagoniste à celui déclenché par les senseurs entériques au glucose, aboutissant à une insulino-résistance musculaire transitoire. Ce mécanisme permettra alors de rediriger le glucose vers le foie afin de permettre sa mise en réserve sous forme de glycogène, et ainsi préparer la période de jeûne interdigestive.

GLP-1R : Récepteur au GLP-1.

2) Axe intestin-cerveau et inflammation : cas du Diabète de Type 2

Comme nous venons de le voir, la détection entérique de glucose est cruciale pour le maintien de l'homéostasie glucidique. Il est donc facilement compréhensible qu'un défaut dans ce « glucosensing » intestinal puisse conduire à de profonds désordres métaboliques tels que le DT2. A ce titre, Knauf et al. ont montré que, comparativement à des souris saines, des souris rendues diabétiques suite à un régime riche en graisse (HFD : High-Fat Diet) ne présentaient aucune modification de l'expression de c-Fos dans l'hypothalamus en réponse à une infusion intra-gastrique

de glucose [300]. De plus, chez les souris diabétiques, il n'est plus observé de modifications de l'utilisation du glucose suite à sa perfusion intra-gastrique. A la suite de ce travail, cette équipe a voulu savoir si l'altération de la détection intestinale de glucose chez les souris diabétiques pouvait être liée à une modification de la libération de NO hypothalamique. Pour cela, la libération de NO hypothalamique a été mesurée par ampérométrie, chez des souris saines et des souris rendues diabétiques génétiquement (souris Db /Db déficientes pour le récepteur à la leptine), en réponse à une injection intra-gastrique de glucose stimulant spécifiquement et uniquement les senseurs intestinaux, sans entraîner de variations de la glycémie [301]. De cette façon il a notamment été observé que la détection entérique de glucose entraînait une augmentation significative de la fréquence de production de NO au niveau hypothalamique uniquement chez les animaux sains, phénomène totalement altéré chez les souris Db/Db. Par ailleurs, dans la même étude, il a été montré que ces animaux diabétiques présentaient une augmentation de l'expression des marqueurs du stress oxydant, de l'inflammation et du stress du réticulum endoplasmique dans l'intestin, alors que l'expression de ces mêmes marqueurs était très peu affectée dans l'hypothalamus. Etant donné que l'expression de ces marqueurs est connue comme étant capable de perturber la régulation du métabolisme glucidique [303-306], il a été suggéré qu'un stress cellulaire intestinal suffise à perturber l'axe intestin-cerveau, et à induire l'établissement de maladies métaboliques telles que le DT2 (**Figure 23**).

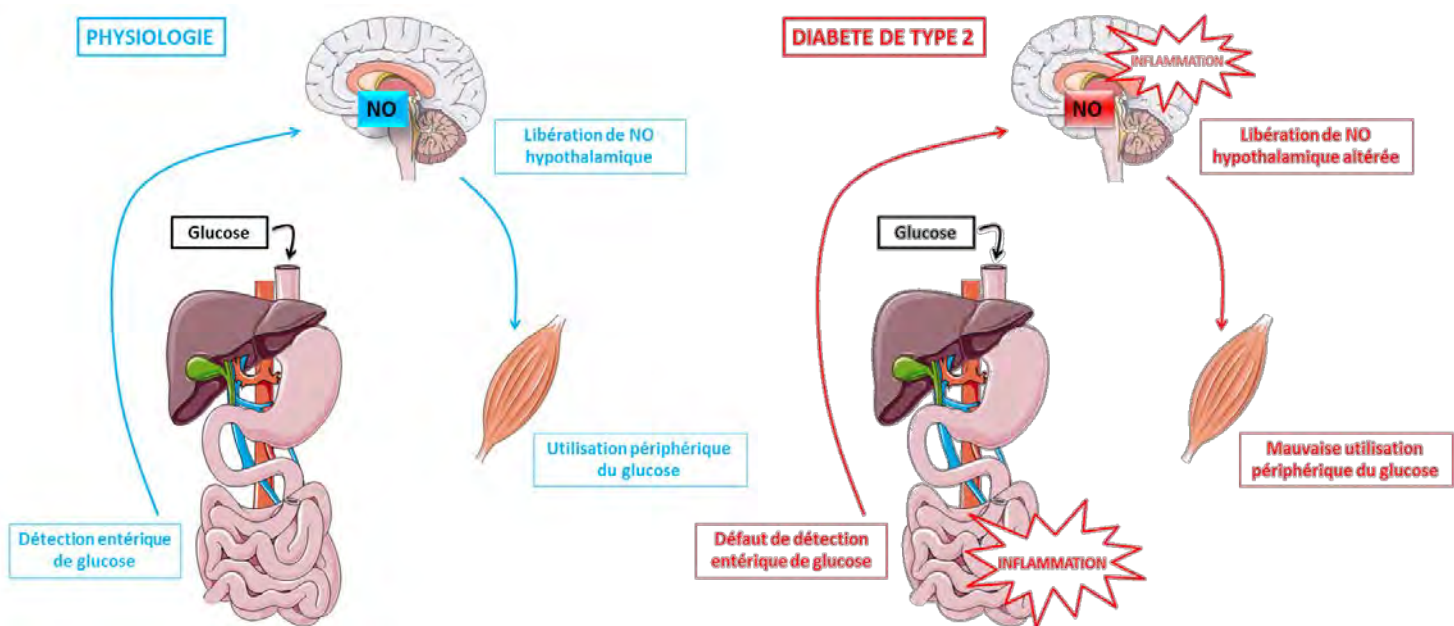


Figure 23: Axe intestin-cerveau et inflammation: cas du Diabète de Type 2.

3) Axe intestin-cerveau et néoglucogenèse intestinale

Comme nous l'avons abordé précédemment, la néoglucogenèse intestinale est impliquée dans l'effet satiétogène induit par un régime riche en protéines. Des expériences pratiquant des chirurgies bariatriques ont également permis de mettre en évidence le rôle crucial de cette voie de signalisation dans le maintien de l'homéostasie glucidique [307]. Parmi ces chirurgies, 2 sont communément utilisées dans le traitement de l'obésité morbide : la pose d'un anneau gastrique ajustable et le bypass gastrique de type Roux-en-Y. La première est une technique purement restrictive qui consiste à poser un anneau en silicone autour de la partie supérieure de l'estomac, entraînant une diminution de son volume. La seconde consiste à réduire le volume de l'estomac et à modifier le circuit alimentaire, à savoir que les aliments passeront directement de l'estomac au jéjunum distal, court-circuitant ainsi le duodénum et le jéjunum proximal. Il s'agit d'une technique à la fois restrictive mais aussi malabsorptive puisqu'en temps normal la majorité de l'absorption se fait dans les parties court-circuitées par cette chirurgie. Ces 2 techniques entraînent incontestablement une perte de poids drastique. En plus de cela, le bypass gastrique provoque également des améliorations très rapides du statut diabétique des patients, telles qu'une amélioration de la tolérance au glucose et une diminution de la résistance à l'insuline [308]. Or ces améliorations ne sont pas observées suite à la pose d'un anneau gastrique. Les études incriminant le rôle des hormones GI dans cet effet ayant souvent des résultats contradictoires [286], la potentielle implication de la néoglucogenèse intestinale a donc été testée.

A ce titre, des modèles animaux de ces 2 chirurgies ont été utilisés et mis sous régime HFD [307]. Dix jours après la chirurgie, les souris ayant subies un bypass gastrique présentent une amélioration de la tolérance au glucose associée à une augmentation de la sécrétion d'insuline comparativement à celles ayant un anneau gastrique. Il est de plus observé chez ces mêmes souris une amélioration de la sensibilité à l'insuline ainsi qu'une diminution de la production endogène de glucose, mesurées lors d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique. Par ailleurs, toujours chez ces souris, l'expression des 2 enzymes clefs de la néoglucogenèse (la glucose-6-phosphatase et la phosphoenolpyruvate carboxykinase) est augmentée au niveau jéjunal et iléal, entraînant une augmentation de la production de glucose à ce niveau. Cependant, les mécanismes sous-jacents à l'activation de cette néoglucogenèse intestinale dans la cadre d'un bypass gastrique restent à être identifiés [309]. Enfin, tous ces effets observés suite à une chirurgie de type bypass gastrique sont perdus chez des souris déficientes pour GLUT-2 ou ayant subies un traitement à la capsaïcine (un neurotoxique qui inactive sélectivement les fibres afférentes du SNA). Dès lors, l'ensemble de ces résultats suggèrent que lors d'un bypass gastrique il va y avoir induction de la néoglucogenèse

intestinale. Le glucose ainsi produit va être détecté selon une signalisation portale GLUT-2 dépendante. Il va en résulter une activation des afférences nerveuses signalisant jusqu'aux régions cérébrales impliquées dans le contrôle du métabolisme glucidique [309]. Cette communication intestin-cerveau va donc aboutir aux effets bénéfiques sur l'homéostasie glucidique observés lors du bypass gastrique.

4) Axe intestin-cerveau et néoglucogénèse hépatique

En plus du glucose, d'autres nutriments vont également pouvoir participer à la régulation glucidique suite à leur détection intestinale. A ce titre, il a été montré qu'une infusion intra-duodénale de lipides entraînait une diminution de la production hépatique de glucose chez le rongeur sain, et ceci sans modifications des taux plasmatiques d'insuline [310, 311]. Après l'absorption des lipides par les entérocytes, les Acides Gras à Chaînes Longues (AGCL) provenant de ces nutriments, vont être métabolisés en AGCL-CoA *via* l'acyl-CoA synthase [312]. L'inhibition directe de cette acyl-coA synthase duodénale, et donc la diminution des taux AGCL-CoA à ce niveau, bloque les effets glucorégulateurs des lipides [311]. De plus, cette infusion de lipides dans le duodénum de rongeurs rendus diabétiques, suite à un régime HFD, échoue également à diminuer la production hépatique de glucose chez ces animaux [311]. L'ensemble de ces données démontrent l'importance de cette détection duodénale de lipides dans le contrôle de la néoglucogénèse hépatique.

Concernant les mécanismes impliqués, il a été observé que l'administration intra-duodénale de lipides diminuait la prise alimentaire, à la fois chez les rongeurs et chez l'Homme, *via* la libération de CCK par les cellules I duodénales [313]. Cette libération de CCK par les AGCL a par la suite été confirmée *in vitro*, et a été montrée comme Protéine Kinase C (PKC) dépendante [314, 315]. Par ailleurs, l'inhibition des récepteurs intestinaux CCK-1 abolit la capacité des AGCL, de la PKC et de la CCK à diminuer la production hépatique de glucose [310, 316, 317]. Ainsi, chez des rongeurs sains, l'activation des récepteurs CCK-1 est nécessaire dans l'établissement de cet effet induit par la signalisation AGCL-PKC-CCK. Dès lors, il a été suggéré que la CCK se liait sur son récepteur, lui-même exprimé sur les afférences vagues innervant l'intestin grêle [318], et que l'activation de ce dernier déclenchait une diminution de la néoglucogénèse hépatique chez le rongeur sain, *via* un axe intestin-cerveau-foie [310]. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'une vagotomie abolit les effets des lipides intestinaux sur la prise alimentaire et la régulation glucidique [319]. De plus, il a été montré qu'en activant ces fibres afférentes vagues, la CCK permettait l'envoi d'un signal neuronal jusqu'au NTS, aboutissant à une activation des récepteurs au N-méthyl-D-aspartate. Il en résulte, *via* des

mécanismes encore peu clairs, une émission vagale jusqu'au foie, ayant pour but de supprimer la production hépatique de glucose [311] (**Figure 24**).

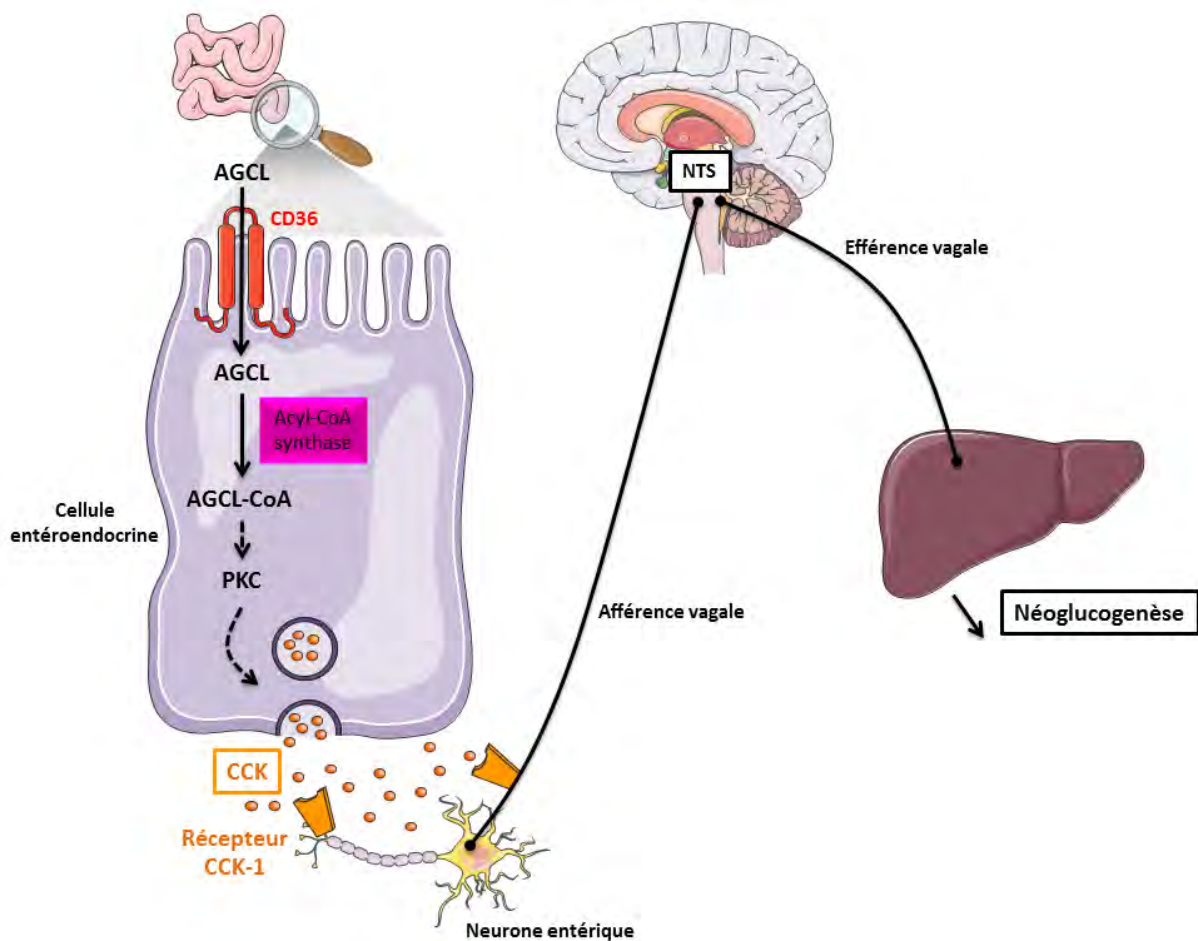


Figure 24: Axe intestin-cerveau et néoglucogenèse hépatique.

Suite à une perfusion intra-duodénale de lipides, les Acides Gras à Chaînes Longues (AGCL) vont entrer dans les cellules entéroendocrines par le transporteur CD36. A ce niveau ils vont être métabolisés en AGCL-CoA via l'acyl-CoA synthase. Ces AGL-CoA vont provoquer la sécrétion de CholécystoKine (CCK) par un mécanisme Protéine Kinase C (PKC)-dépendant. Une fois libérée, il a été suggéré que le CCK se liait sur son récepteur (R-CCK-1), lui-même exprimé sur les neurones entériques et afférences vagales innervant l'intestin grêle. En activant ces fibres afférentes vagales, la CCK permettait l'envoi d'un signal neuronal jusqu'au Noyau du Tractus Solitaire (NTS), aboutissant à une activation des récepteurs au N-méthyl-D-aspartate. Il en résulte, via des mécanismes encore peu clairs, une émission vagale jusqu'au foie, provoquant une inhibition de la néoglucogenèse.

Ainsi, dans des conditions physiologiques, la détection duodénale des lipides entraîne l'activation d'un axe intestin-cerveau-foie aboutissant à une diminution de la néoglucogenèse hépatique. Ce « sensing » lipidique agirait donc, dans ces conditions, comme un mécanisme protecteur permettant de maintenir une glycémie stable malgré la prise alimentaire. Cependant, ce mécanisme semble être défectueux dans des conditions d'excès calorique [147]. De plus, Breen et al.

ont émis l'hypothèse que le succès des chirurgies bariatriques était en partie dû à cette détection de lipides, mais cette fois-ci au niveau jéjunal [320]. En effet, dans le cadre de ces chirurgies, il a été montré qu'une infusion intra-jéjunale de lipides entraînait une diminution de la néoglucogenèse hépatique, et ceci *via* le même circuit nerveux que nous venons de décrire au niveau duodénal.

Ces dernières années, la considération de l'intestin en tant qu'acteur clef impliqué dans le métabolisme glucidique n'a cessé de s'amplifier. L'intérêt croissant pour cet organe a conduit à l'élucidation des mécanismes moléculaires lui permettant de détecter les nutriments, et de communiquer avec le SNC. En effet, il est maintenant clairement établi que la détection intestinale des aliments ingérés, en particulier le glucose, va entraîner l'émission de voies nerveuses et hormonales modifiant l'activité centrale dans le but réguler la glycémie. Par ailleurs, un défaut dans la détection intestinale de glucose génère un message altéré jusqu'à l'hypothalamus, pouvant entraîner le développement de maladies métaboliques telles que le DT2. Ainsi, l'axe intestin-cerveau représente un point de contrôle majeur dans le maintien de l'homéostasie glucidique. Dès lors, cet axe de communication ouvre des perspectives prometteuses dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à traiter les maladies métaboliques.

Partie 4 : Le système Apeline-APJ dans le contrôle du métabolisme glucidique

I- Généralités

1) Le récepteur APJ

Le récepteur APJ a été identifié pour la première fois par O'Dowd et ses collaborateurs en 1993 sur la bande q12 du chromosome 11 humain [321]. Il s'agit d'un récepteur de 380 acides aminés appartenant à la famille des RCPG, couplé à une protéine de type $G_{i/o}$. APJ présente une homologie globale de 30% avec le récepteur à l'angiotensine II, et de 40 à 50% dans ses régions transmembranaires, sans pour autant pouvoir se lier à celle-ci [321, 322]. De plus, le récepteur APJ humain possède 80% d'homologie avec celui du rat et 91% avec celui de la souris, indiquant que la séquence en acides aminés de ce récepteur a été conservée au cours de l'évolution [323].

La distribution du récepteur APJ est pratiquement ubiquitaire au sein de l'organisme. Malgré des différences d'expression inter-espèces (Homme, rat, souris), il a été montré que l'expression de l'ARNm d'APJ était présent dans l'ensemble du SNC, et plus particulièrement dans les noyaux hypothalamiques tels que le Noyau SupraOptique (SON), le PVN et l'ARC [321, 322, 324-326]. De plus des études chez le rat mettent en évidence que dans le SON, l'ARNm d'APJ est exprimé au niveau des neurones à vasopressine [327]. D'autre part, les transcrits de ce récepteur sont également présents dans de nombreux tissus périphériques de l'organisme, mais en quantité variable selon les organes, que ce soit chez le rat ou chez l'humain. En effet, son expression est particulièrement élevée dans les poumons, le cœur, la thyroïde et le tissu adipeux. Des taux plus modérés ont été mesurés au niveau du rein, de l'intestin, du pancréas, de la rate, du muscle squelettique et du foie [328, 329].

2) L'apeline

Comme nous l'avons évoqué, malgré sa forte homologie avec le récepteur à l'angiotensine II, APJ ne se lie pas à cette dernière [321]. Ainsi, le récepteur APJ restera « orphelin » jusqu'en 1998, année de la découverte de son premier ligand endogène nommé apeline pour APJ Endogenous Ligand [330]. Le gène de l'apeline est localisé sur le chromosome humain X et code pour un prépropeptide de 77 acides aminés dont la séquence est fortement conservée entre les espèces [324]. En effet, les 13 derniers acides aminés de l'apeline sont identiques chez les mammifères suggérant l'importance de ce domaine pour l'activité biologique du peptide.

a) Maturation de l'apeline

Le prépropeptide de 77 acides aminés, nommé préproapeline va subir plusieurs étapes de clivage participant à la maturation de l'apeline (**Figure 25**). Tout d'abord des endopeptidases clivent ce précurseur en proapeline, comportant 55 acides aminés. Cette proapeline, après une succession de clivages enzymatiques dans la partie C-terminale du peptide, génère plusieurs formes actives d'apeline, dont l'apeline 36, l'apeline 17, et l'apeline 13, et l'apeline 13 pyroglutaminée (pyr-Ape13) [330]. L'ajout du résidu glutamate à l'extrémité de la pyr-Ape13 lui apporte une plus grande stabilité [331] en lui permettant de retarder la dégradation enzymatique que les autres formes subissent rapidement. En effet, la demi-vie de l'apeline 36 est estimée à moins de 5 minutes [332]. Les différentes formes actives de l'apeline sont toutes capables de se lier à APJ, mais ont chacune leur propre efficacité selon la réponse biologique considérée. A titre d'exemple, il ressort que la forme apeline 13 est la plus vasoactive, et que de façon générale, les formes courtes sont les plus actives sur la sphère cardiovasculaire [333].

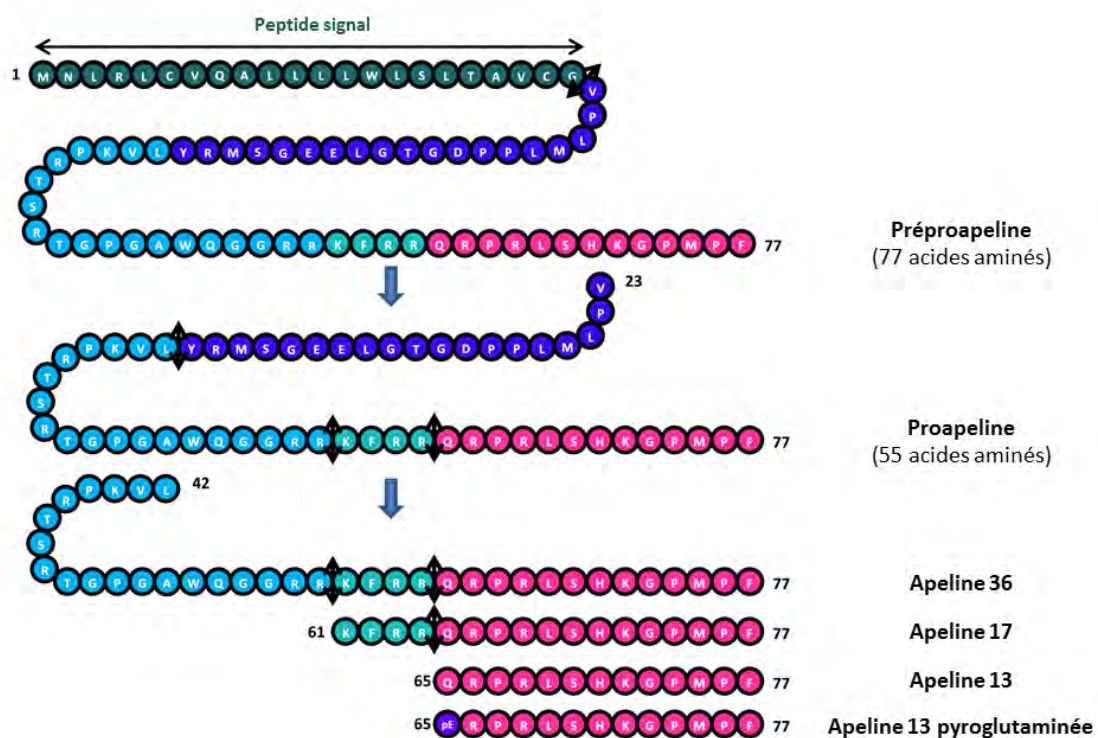


Figure 25: Maturation de l'apeline (adapté de Chavez-Almagro et al. [334]).

La préproapeline est clivée en proapeline par des endopeptidases au niveau de sites riches en acides-aminés basiques (flèche noire). La proapeline, après une succession de clivages enzymatiques dans la partie C-terminale du peptide (flèches noires), génère plusieurs formes actives d'apeline, dont l'apeline 36, l'apeline 17, et l'apeline 13. L'apeline 13 peut être modifiée par l'ajout d'un résidu glutamate à l'extrémité N-terminale.

b) *Distribution tissulaire de l'apeline*

Les différentes formes de l'apeline sont présentes en proportions variables, selon les organes qui l'expriment. Ainsi, il a été montré que l'apeline 36 est la forme prédominante dans les poumons, les testicules et l'utérus chez le rat [335]. Chez l'Homme, le cœur contient plus de pyr-Ape13 comparativement aux autres formes d'apeline [336]. Dans le plasma, il est surtout retrouvé l'apeline 17 et la pyr-Ape13, chez l'Homme comme chez le rat [337-339].

D'une façon générale, au même titre que son récepteur, l'apeline est retrouvée exprimée dans un grand nombre de tissus. Au niveau central elle est notamment exprimée dans l'hypothalamus. A ce niveau elle est libérée en tant que neurotransmetteur par les neurones à POMC de l'ARC [340], mais également par les neurones à vasopressine [341] et à ocytocine [342, 343]. Au niveau périphérique, elle est exprimée au niveau de la rate, de l'intestin, du pancréas, du rein, des gonades, du cœur, du poumon et du tissu adipeux blanc [335]. De plus, Boucher et al. ont montré que l'apeline était non seulement produite, mais aussi sécrétée par le tissu adipeux, faisant d'elle une adipokine [344].

c) *Régulation de la production de l'apeline*

La production d'apeline est régulée par plusieurs facteurs. Ainsi, l'insuline régule positivement l'expression d'apeline dans les adipocytes murins et humains [344-347]. Ces résultats sont confirmés *in vivo* puisque la destruction des cellules β pancréatiques produisant l'insuline, suite à un traitement à la streptozotocine, provoque la diminution de l'expression de l'apeline par les adipocytes murins [344]. De plus, l'analyse de plasma de patients sains et diabétiques révèle l'existence d'une corrélation positive entre l'apelinémie et l'insulinémie [345]. Le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) représente un autre facteur régulant l'expression de l'apeline. En effet, l'injection ip de TNF- α provoque l'augmentation de l'expression des ARNm de l'apeline dans les adipocytes ainsi que de son taux plasmatique [348]. Cependant, d'autres cytokines induites en situations inflammatoires régulent également positivement l'expression d'apeline. C'est notamment le cas lors de maladies inflammatoires intestinales. En effet, l'analyse de coupes coliques provenant de patients atteints de colite ulcéreuse ou de la maladie de Crohn, ainsi que d'un modèle murin de colite induite (traitement Dextran Sodium Sulfate) montrent une forte augmentation de l'expression d'apeline par les cellules épithéliales coliques par rapport au tissu sain [349]. Par la suite, la même équipe a pu démontrer que l'InterLeukine 6 (IL-6) et l'InterFéron- γ (IFN- γ), deux cytokines pro-inflammatoires associées à ces pathologies intestinales, étaient responsables de l'augmentation de la production

d'apeline observée [350]. D'autre part, des travaux récents mettent en évidence que l'acide eicosapentaénoïque, un acide gras poly-insaturé de la famille des oméga 3, stimulait l'expression et la sécrétion d'apeline par les adipocytes [351].

3) La signalisation apeline-APJ

a) Protéines G impliquées dans les effets de l'apeline

Les premières études visant à caractériser le récepteur APJ démontrent que son activation provoque l'inhibition de la production d'AMPc induite par la forskoline, suggérant son couplage à une protéine de type G_i [330, 352]. Cela a ensuite été confirmé par l'utilisation de la toxine pertuxique, une toxine bloquant le couplage des protéines G_i à leur récepteur [329, 353] (**Figure 27**).

Cependant, selon le type cellulaire, le récepteur APJ peut être couplé à d'autres protéines G. En effet, la modélisation tridimensionnelle d'APJ prédit une forte affinité pour la protéine G_q [354] (**Figure 26**). A ce titre, l'inhibition de la signalisation de cette protéine G, *via* l'inhibition de la phospholipase C, la PKC, ou des transporteurs Na^+/H^+ et Na^+/Ca^+ , empêche les effets contractiles de l'apeline sur le cœur isolé de rat [355].

Enfin, plus récemment, il a été montré que l'activation d'APJ menait à une augmentation de l'activation du Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF2) dans les cellules endothéliales HUVEC. Cette activation est indépendante de G_q et G_i , mais dépendante d'une protéine de type $G_{\alpha_{13}}$, qui est pour la première fois associée à des effets de l'apeline [356] (**Figure 26**).

b) Voies de signalisation

En aval de l'activation de ces protéines G, l'apeline stimule de nombreuses cascades de transduction qui participent à la régulation de différentes fonctions cellulaires clés (pour revue voir [334] (**Figure 26**)).

L'apeline active principalement les voies de signalisation des Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) et/ou de la Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt. Il va en résulter la prolifération, la survie, la migration, et différentes fonctions métaboliques dans les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les neurones, les adipocytes, les myocytes, les cellules tumorales et les ostéoblastes [334].

D'autre part, des travaux menés *in vitro* et *ex vivo* ont établi que l'apeline pouvait aussi activer des protéines largement impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique telles que l'AMPK et la eNOS [357-359].

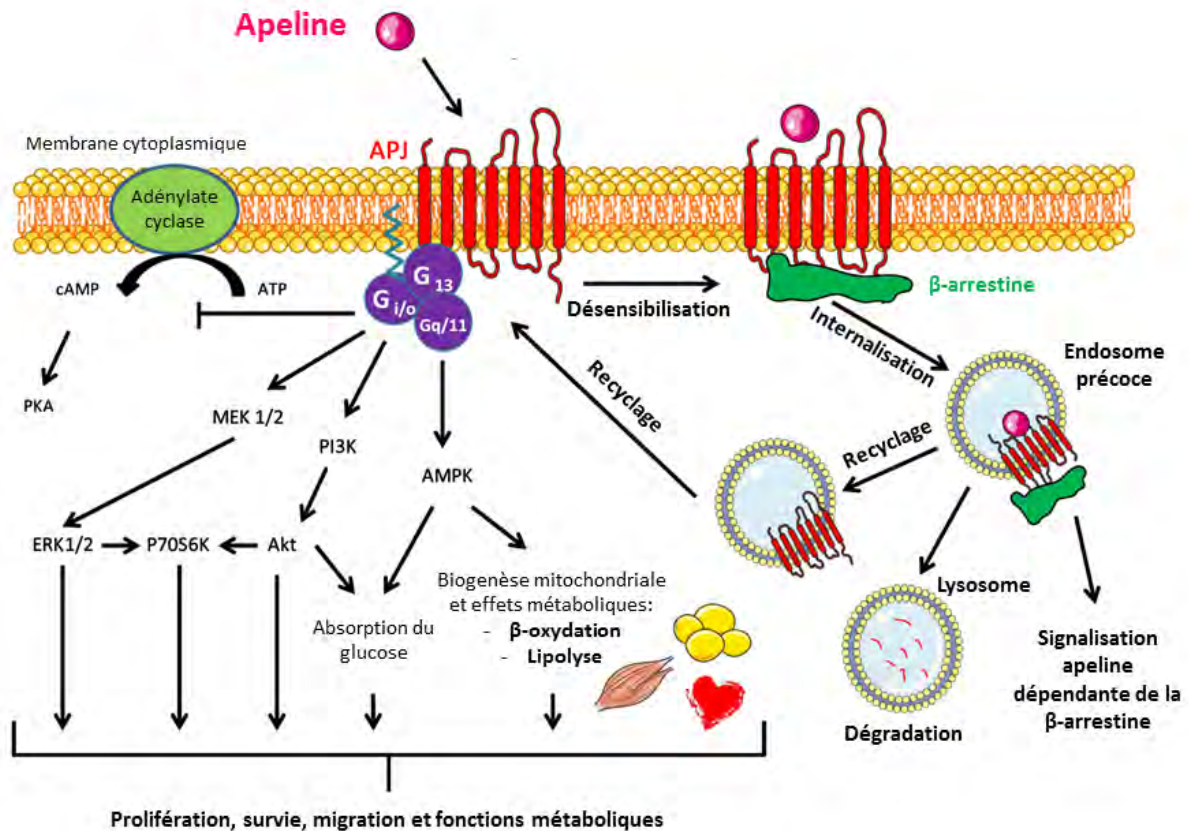


Figure 26: Signalisation apeline-APJ (adapté de Chavez-Almagro et al. [334]).

Suivant le type cellulaire, APJ peut être couplé à différents types de protéines G ($G_{i/o}$, $G_{q/11}$, G_{13}). En aval de l'activation des protéines G, l'apeline inhibe la production d'AMPc et stimule les voies MAPK, PI3K/Akt et l'AMPK stimulant la prolifération, la survie, la migration et/ou diverses fonctions métaboliques. Par ailleurs, l'activation d'APJ induit le recrutement des β -arrestines, provoquant la désensibilisation et l'internalisation du récepteur. Au cours de cette internalisation, la β -arrestine peut également engendrer une nouvelle cascade de transduction de manière indépendante des protéines G. Par la suite, le récepteur peut être rapidement recyclé à la membrane plasmique ou dégradé.

Ainsi, le couple apeline-APJ est impliqué dans de nombreuses voies de signalisation, lui conférant une multitude de rôles biologiques. A savoir une implication dans l'angiogenèse [360], un rôle anti-inflammatoire dans le contrôle de l'immunité [361], une action sur la sphère cardiaque [355, 362] et gastro-intestinale [363-366] (voir point III-). De plus, comme nous allons l'aborder dans

la prochaine partie de ce manuscrit, notre équipe a pu mettre en évidence le rôle clef de ce peptide dans le contrôle du métabolisme glucidique [367].

II- Rôle de l'apeline dans le contrôle du métabolisme glucidique

Les travaux de Yue et al. ont mis évidence que les animaux n'exprimant pas l'apeline présentaient une insulino-résistance, une hyperinsulinémie et une diminution du transport de glucose au sein du muscle squelettique [359]. De plus, notre équipe a démontré que l'apeline faisait partie de la famille des adipokines, et que sa concentration plasmatique était augmentée en condition d'obésité, aussi bien chez l'Homme que chez la souris [344]. Dès lors, l'ensemble de ces études ont permis d'envisager un rôle de ce peptide au sein du métabolisme énergétique, et plus particulièrement au sein du métabolisme glucidique.

1) Rôle de l'apeline périphérique dans le contrôle du métabolisme glucidique

Comme nous l'avons évoqué, l'insuline stimule l'expression de l'apeline par les adipocytes murins *in vitro* [344]. De plus, l'apeline est aussi capable de réguler la sécrétion d'insuline. En effet, non seulement le récepteur APJ est présent sur les cellules β pancréatiques, mais aussi, l'injection d'apeline par voie veineuse entraîne une diminution de la sécrétion d'insuline au cours d'un test de tolérance au glucose, chez des souris saines et des souris obèses [368]. Dans la même étude, il a été montré que des îlots pancréatiques isolés traités à l'apeline produisaient moins d'insuline en réponse à un bolus de glucose, suggérant donc un effet direct de l'apeline sur la cellule β [368].

Parallèlement à son action inhibitrice sur la sécrétion d'insuline, l'apeline diminue la glycémie et améliore la tolérance au glucose [357]. De plus, lors d'un clamp euglycémique-hyperinsulinémique, la perfusion d'apeline tout le long de l'expérience induit une augmentation de l'entrée de glucose dans le tissu adipeux blanc et les muscles, chez les souris normales et obèses/diabétiques [357, 358]. Les effets de l'apeline sur le muscle passent par une activation de la eNOS, puisque chez les souris déficientes pour cette dernière, l'apeline perd son effet sur le transport de glucose dans le muscle soléaire [357]. Aussi, des études *in vitro* et *ex vivo* sur le muscle ont montré que le traitement avec l'apeline augmente également leur transport de glucose basal *via* une augmentation de la phosphorylation d'Akt [357, 359]. Cependant, cet effet de l'apeline est indépendant de l'insuline, suggérant que celle-ci serait capable de potentialiser l'effet de l'insuline dans le transport de glucose, mais qu'elle posséderait également un effet propre. Cette hypothèse a

été effectivement confirmée suite à une étude de notre équipe montrant que l'apeline induit la phosphorylation de l'AMPK dans le muscle isolé [357]. Au niveau du tissu adipeux, l'apeline augmente le transport de glucose en activant une voie AMPK/PI3K/Akt [358, 369]. Par ailleurs, notre équipe a mis en évidence un rôle de la signalisation apeline-APJ dans l'absorption intestinale de glucose [363]. Cet aspect sera détaillé dans le point III-2.

Ainsi, en inhibant d'une part la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques, et en stimulant d'autre part le transport de glucose dans les tissus périphériques, l'apeline permet d'améliorer la sensibilité à l'insuline. A ce titre, des études réalisées chez des animaux insulino-résistants ont démontré que suite à un gavage ou une injection ip de glucose, un traitement à l'apeline entraînait une diminution de l'insulinémie et de la glycémie. Par conséquent, l'apeline améliore la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline chez ces animaux [358, 363, 370]. Confortant ce rôle anti-diabétique de l'apeline, un traitement ip à l'apeline de 2 semaines chez des souris insulino-résistantes restaure la sensibilité à l'insuline, tandis que des souris invalidées pour cette dernière sont intolérantes au glucose, hyperinsulinémiques et insulino-résistantes [359].

2) Rôle de l'apeline centrale dans le contrôle du métabolisme glucidique

Comme nous l'avons mentionné, le couple apeline-APJ est également présent dans l'hypothalamus. A ce niveau, l'étude de Duparc et al. a montré que l'injection icv d'apeline chez la souris nourrie diminuait la glycémie *via* l'activation de la eNOS hypothalamique [302]. Chez les animaux présentant un DT2, les taux hypothalamiques d'apeline sont fortement augmentés, au même titre que les taux plasmatiques [340]. Ainsi, l'injection icv de forts taux d'apeline, similaires à ceux retrouvés dans l'hypothalamus d'animaux obèses/diabétiques, à une souris normale, entraîne une hyperglycémie et une hyperinsulinémie à jeun, 2 caractéristiques d'un DT2 [302]. L'étude de Drougard et al. a montré que cette dose d'apeline n'impliquait par l'activation de la eNOS, mais agissait *via* une production d' H_2O_2 hypothalamique ainsi que l'activation du SNS, aboutissant à une augmentation de la production de glucose par le foie [371]. En effet, chez ces souris cette dose centrale d'apeline stimule à la fois la glycolyse et la néoglucogenèse hépatique. Ce même traitement exacerbe l'hyperglycémie à jeun d'animaux obèses/diabétiques, en stimulant seulement la glycolyse hépatique, la néoglucogenèse étant déjà sur-activée en condition de résistance à l'insuline [302, 371]. Cette observation démontre qu'à la différence de la leptine, il n'y aurait pas de phénomène de résistance hypothalamique à l'apeline dans le cadre d'un DT2. Au contraire, des forts taux d'apeline hypothalamiques ne semblent pas impliqués dans la mise en place de cette pathologie.

III- L'apeline dans le tractus gastro-intestinal

L'apeline a été identifié pour la première fois par Tatemoto et al. à partir d'extraits d'estomac de bovins, suggérant un potentiel rôle du système apeline-APJ dans le tractus GI [330].

1) Expression du couple apeline-APJ dans le tractus gastro-intestinal

L'apeline est exprimée tout le long du tractus GI chez l'Homme et chez le rat, avec cependant une expression maximale dans l'estomac, et une moindre expression dans l'intestin (duodénum, jéjunum, iléon, côlon) [366]. De plus, au niveau intestinal, les taux d'ARNm sont plus élevés dans l'iléon comparativement aux autres segments intestinaux [366]. Enfin, l'analyse de l'expression de l'apeline dans le tractus GI a révélé que son expression protéique était faible en périnatal pour augmenter progressivement au cours du temps [372]. Au niveau stomacal, l'apeline est exprimée dans la muqueuse, par les cellules gastriques exocrines telles que les cellules à mucus, ainsi que par les cellules EEs [366, 373]. Au niveau intestinal, notre équipe a pu mettre en évidence que l'apeline était exprimée par les cellules épithéliales jéjunales, et plus particulièrement par les entérocytes [363].

Le récepteur APJ quant à lui, est fortement exprimé au cours du développement embryonnaire puis diminue progressivement [372]. Cependant, des immunohistochimies réalisées chez le rat montrent que son expression protéique est conservée chez l'adulte au niveau gastrique, ainsi qu'au niveau intestinal dans les cellules à mucus, les cellules des cryptes et les enterocytes [366, 372]. Le récepteur APJ est également présent dans les cellules musculaires lisses tout le long du tractus GI, et sur les vaisseaux sanguins entériques [366, 372].

2) Fonctions du système apeline-APJ dans le tractus gastro-intestinal

Différentes études ont par la suite étudié les fonctions du système apelinergique dans le tractus GI. Ainsi, sur des glandes gastriques de lapin *ex vivo*, l'apeline est capable d'inhiber la sécrétion d'histamine de manière à diminuer la sécrétion d'acide gastrique induite par la gastrine [374]. A l'inverse, une étude plus récente apporte des données contradictoires. En effet, dans cette étude, l'injection iv d'apeline augmente la production et la sécrétion d'histamine chez le rat, stimulant ainsi la sécrétion d'acide gastrique [365].

Etant sécrétée dans la lumière digestive, l'apeline a également un effet paracrine sur les cellules EEs, entraînant la libération de certaines hormones GI. *In vitro*, le traitement d'une lignée cellulaire entéroendocrine avec de l'apeline stimule la sécrétion de CCK selon une voie MAPK dépendante [366]. De plus, une étude récente a non seulement confirmé *in vivo* l'augmentation de la CCK en réponse à une injection iv d'apeline, mais aussi, que cette injection pouvait également stimuler la sécrétion de GLP-1 [375]. L'ensemble de ces résultats soulignent une fois de plus le rôle de l'apeline dans la régulation du métabolisme glucidique.

A ce titre, notre équipe a mis en évidence l'implication du système apeline/APJ dans l'absorption intestinale de glucose. Dans cette étude, Dray et al. ont montré qu'un gavage oral de glucose induisait rapidement la sécrétion d'apeline dans la lumière intestinale chez la souris [363]. Dans la même étude, il a été observé qu'un gavage oral d'apeline stimulait l'expression des transporteurs GLUT-2 à la membrane apicale des entérocytes au niveau jéjunal, *via* l'activation de l'AMPK. Cela se traduit par une augmentation de l'absorption intestinale de glucose. Dès lors, il semblerait que l'arrivée de glucose dans l'intestin stimule sa propre absorption, en induisant la sécrétion d'apeline par les entérocytes.

Objectifs et travaux de thèse

I- Objectifs

Au début de ce travail de thèse, plusieurs études avaient identifié l'intestin grêle, siège de l'absorption du glucose, en tant que premier organe impliqué dans le contrôle de l'homéostasie glucidique lors d'un repas. En particulier, il a été démontré que la détection entérique de glucose permettait de cibler, *via* un relai hypothalamique, les muscles squelettiques ainsi que le foie en vue de capter le glucose circulant [299, 300]. Par la suite, l'équipe a montré que la stimulation des senseurs entériques au glucose induisait une libération de NO hypothalamique, un neurotransmetteur connu pour participer au contrôle de l'utilisation périphérique de glucose [301]. De plus, notre groupe a également démontré qu'une altération de la détection entérique du glucose, associée à une réponse neuronale hypothalamique anormale, participait à la mise en place d'un DT2 [300, 301].

En plus de ces problèmes de détection de nutriments, les patients obèses et diabétiques souffrent de troubles de la motilité intestinale (en particulier d'une hypercontractilité intestinale), associée à une atteinte du SNE dans les parties proximales de l'intestin [122]. A ce titre, il a également été montré qu'une stimulation de la contractilité intestinale était associée à une augmentation de l'absorption de glucose [376]. D'un point de vue régulation, le SNE communique en permanence avec le SNC *via* des voies nerveuses afférentes et efférentes. Dès lors, l'ensemble de ces observations laissent à penser que des modifications de la contractilité intestinale (sous le contrôle du SNE) puissent être détectées par mécanodétection, et soient à l'origine d'un message nerveux afférent jusqu'à l'hypothalamus participant au même titre que la chémodétection glucidique, au contrôle du métabolisme glucidique. Parmi les facteurs capables de cibler le SNE pour modifier la contractilité intestinale, notre équipe a montré que l'apeline était libérée par l'entérocyte dans la partie proximale de l'intestin, et qu'à ce niveau elle contrôlait l'absorption intestinale du glucose [363]. De plus, notre laboratoire a également mis en évidence que ce peptide bioactif contrôlait l'utilisation du glucose *via* une action directe sur les tissus périphériques (muscles, tissus adipeux) [357], mais également en agissant sur l'activité de neurones hypothalamiques [302]. Cependant, il n'était pas encore connu si l'apeline était également capable de cibler les neurones du SNE, et donc de moduler la contractilité intestinale.

Mes différents objectifs de thèse ont été :

1) D'étudier les effets de l'apeline sur l'activité contractile duodénale, et les conséquences qui en résultent sur l'absorption intestinale de glucose.

Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si l'apeline était capable de cibler les neurones du SNE pour moduler la contractilité duodénale. Nous avons ainsi cherché à déterminer si les neurones entériques exprimaient son récepteur, et si l'activation de ce dernier permettait de modifier leur activité. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux 2 populations neuronales majeures composant le SNE, à savoir les motoneurones exprimant la ChAT et ceux exprimant la nNOS, connus pour respectivement stimuler et inhiber les contractions intestinales [122]. En parallèle, nous avons étudié les effets de l'apeline, à différentes concentrations, sur la contractilité duodénale *ex vivo* et l'activité électrique duodénale *in vivo* chez des souris saines et nourries. L'activité électrique duodénale correspond à l'activité du SNE mais aussi à celle des cellules musculaires lisses, de plus, cette activité est étroitement associée à l'activité mécanique [377]. Enfin, nous avons voulu savoir si cette modification d'activité contractile engendrée par l'apeline pouvait impacter l'absorption duodénale de glucose.

2) D'étudier les conséquences de cette modification d'activité contractile duodénale sur l'activité hypothalamique

Dans un deuxième temps, nous avons évalué les conséquences de ces changements d'activité contractile induits par l'apeline, sur l'activité hypothalamique. Parmi tous les acteurs moléculaires hypothalamiques potentiels, nous nous sommes intéressés au NO, puisqu'il s'agit d'un neurotransmetteur connu pour être libéré suite à la stimulation des senseurs entériques au glucose [301], et pour participer au contrôle de l'utilisation périphérique de glucose [302].

3) De déterminer le lien entre la contractilité duodénale et l'utilisation périphérique de glucose via ce relai hypothalamique.

Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer si une charge orale d'apeline couplée à du glucose radioactif pouvait impacter l'entrée de ce dernier dans le muscle, le tissu adipeux et le foie. Nous avons focalisé nos recherches sur l'utilisation de glucose par le muscle, le foie et le tissu adipeux étant donné qu'il s'agit des 3 tissus principaux impliqués dans le contrôle du métabolisme glucidique.

- 4) D'évaluer si cet axe « contractilité duodénale - hypothalamus - utilisation périphérique de glucose » pouvait représenter une cible thérapeutique chez des animaux obèses/diabétiques.**

Toute l'étude détaillée ci-dessus sur la contractilité duodénale, l'activité hypothalamique et l'utilisation périphérique de glucose, a été reproduite dans un modèle de souris rendues diabétiques de type 2 suite à un régime hyperlipidique.

II- Résultats

ARTICLE : L'apeline cible les contractions intestinales pour contrôler le métabolisme glucidique via un relai central

Effets de l'apeline sur l'activité contractile duodénale, conséquences sur l'absorption intestinale de glucose.

Tout d'abord, des expériences d'immunohistochimie ont révélé que le **récepteur à l'apeline était exprimé par les neurones du SNE**. Cette première observation a permis de renforcer l'hypothèse que cette molécule pourrait cibler le SNE dans le but de moduler la contractilité duodénale. Pour répondre à cette question, nous avons tout d'abord mesuré les effets de l'apeline, à différentes concentrations, sur la contractilité duodénale *ex vivo* et l'activité électrique duodénale *in vivo* chez des souris saines et nourries. Cette expérience a permis de **sélectionner 2 concentrations d'apeline ayant des effets opposés** sur ces 2 paramètres. A savoir que **l'apeline à 100 nM entraîne une stimulation de l'activité duodénale**, alors qu'en revanche, une **concentration d'apeline plus importante, à 1 µM, déclenche une diminution de celle-ci**. En parallèle, nous avons pu montrer que ces 2 concentrations d'apeline ciblaient 2 populations neuronales entériques différentes, nous permettant d'expliquer leurs effets opposés sur l'activité contractile duodénale. Ainsi, l'apeline à 100nM exerce son effet stimulateur sur la contractilité duodénale *via* une **libération d'acétylcholine par les neurones ChAT**, alors que l'apeline à 1 µM entraîne une inhibition de cette dernière à travers une **libération de NO par les neurones nNOS**. Enfin, nous avons observé que la stimulation de la contractilité duodénale par l'apeline à 100 nM était associée à une **augmentation de l'absorption intestinale de glucose**.

Conséquences de cette modification d'activité contractile duodénale sur l'activité hypothalamique.

Les conséquences hypothalamiques de cette modification d'activité contractile duodénale engendrée par l'apeline ont alors été étudiées. Ainsi, **l'injection ig d'apeline à 100 nM**, qui entraînait une stimulation de la contractilité duodénale, déclenche une **diminution de la fréquence de libération de NO hypothalamique**. Cet effet étant perdu suite à un traitement à la capsaïcine (un neurotoxique qui inactive sélectivement les fibres afférentes du SNA), cette communication entre le duodénum et l'hypothalamus s'établirait *via* **un message nerveux afférent**. En revanche, **l'administration ig d'apeline à 1 µM** qui entraînait une diminution de la contractilité duodénale, permet de **restaurer cette libération de NO hypothalamique** à un niveau basal.

Détermination du lien entre la contractilité duodénale et l'utilisation périphérique de glucose via ce relai hypothalamique.

Pour cela nous avons mesuré l'entrée de glucose dans le muscle, le tissu adipeux et le foie en réponse à un gavage oral d'apeline couplée à du glucose radioactif. Il en résulte que **le gavage oral d'apeline à 100 nM**, qui augmentait les contractions duodénales et diminuait la libération de NO hypothalamique, est également associée à une **moindre entrée de glucose spécifiquement dans le muscle**. En revanche, **l'administration orale d'apeline à 1 µM**, qui entraînait une diminution de la contractilité duodénale, et restaurait la libération de NO hypothalamique à un niveau basal, permet également de **restaurer cette entrée de glucose dans le muscle**.

L'axe « contractilité duodénale - hypothalamus - utilisation périphérique de glucose » comme cible thérapeutique chez des animaux obèses/diabétiques ?

Ayant démontré l'implication de cet axe « contractions duodénales-hypothalamus » dans l'homéostasie glucidique, et sachant que les personnes et animaux atteints d'un **DT2 souffrent d'une hypercontractilité intestinale**, nous avons émis **l'hypothèse qu'un ralentissement des contractions duodénales chez des souris diabétiques de type 2** pourrait, par conséquent, **améliorer leur statut diabétique**. Pour cela, nous avons utilisé des animaux soumis à un régime obésitogène et diabétogène durant une période de 3 mois (**souris HFD**). Dans un premiers temps nous avons montré qu'un **traitement aigu à l'apeline 1 µM contrebalançait l'hypercontractilité duodénale** observée chez ces souris, *via* une **augmentation de la libération de NO duodéal**. De plus, la diminution de la contractilité duodénale observée en réponse à l'apeline 1 µM corrèle non seulement avec une **diminution de l'absorption intestinale de glucose**, mais aussi avec une **augmentation de la libération de NO hypothalamique** chez ces souris HFD. Enfin, nous avons démontré que cette modulation de l'axe intestin-cerveau par l'apeline était associée avec une **meilleure utilisation du glucose par le muscle** chez ces souris diabétiques.

Dans un deuxième temps, afin de tester si cette motilité duodénale pourrait être considérée comme une cible thérapeutique potentielle pour traiter le DT2, nous avons **traité des souris HFD, quotidiennement, pendant une semaine, avec une charge orale d'apeline à 1 µM**. Nous avons pu montrer que cette stimulation chronique par des fortes concentrations d'apeline chez ces souris DT2 permettait, non seulement de **restaurer leur contractilité duodénale** au même niveau que celle de souris saines, mais aussi d'**améliorer leur tolérance au glucose** ainsi que leur **index de résistance à l'insuline**.



OPEN ACCESS

ORIGINAL ARTICLE

Apelin targets gut contraction to control glucose metabolism via the brain

Audren Fournel,^{1,2,3} Anne Drougard,^{1,2,3} Thibaut Duparc,^{2,4} Alysso Marlin,^{1,2,3} Stuart M Brierley,^{5,6,7} Joel Castro,⁵ Sophie Le-Gonidec,^{1,2,3} Bernard Masri,⁸ André Colom,^{1,2,3} Alexandre Lucas,^{1,2,3} Perrine Rousset,^{3,9} Nicolas Cenac,^{3,9} Nathalie Vergnolle,^{3,9} Philippe Valet,^{1,2,3} Patrice D Cani,^{2,4} Claude Knauf^{1,2,3}

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310230>)

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to

Professor Patrice D Cani, Université Catholique de Louvain (UCL), Louvain Drug Research Institute, LDRI, Metabolism and Nutrition research group, WELBIO, WELBIO (Walloon Excellence in Life sciences and BIOTEchnology), Av. E. Mounier, 73 B1.73.11, Brussels B-1200, Belgium; Patrice.cani@uclouvain.be
Professor Claude Knauf, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Université Paul Sabatier, CHU Rangueil, 1 Avenue Jean Poulhès, BP84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France; Claude.knauf@inserm.fr

Received 24 June 2015

Revised 2 September 2015

Accepted 22 September 2015

ABSTRACT

Objective The gut–brain axis is considered as a major regulatory checkpoint in the control of glucose homeostasis. The detection of nutrients and/or hormones in the duodenum informs the hypothalamus of the host's nutritional state. This process may occur via hypothalamic neurons modulating central release of nitric oxide (NO), which in turn controls glucose entry into tissues. The enteric nervous system (ENS) modulates intestinal contractions in response to various stimuli, but the importance of this interaction in the control of glucose homeostasis via the brain is unknown. We studied whether apelin, a bioactive peptide present in the gut, regulates ENS-evoked contractions, thereby identifying a new physiological partner in the control of glucose utilisation via the hypothalamus.

Design We measured the effect of apelin on electrical and mechanical duodenal responses via telemetry probes and isotonic sensors in normal and obese/diabetic mice. Changes in hypothalamic NO release, in response to duodenal contraction modulated by apelin, were evaluated in real time with specific amperometric probes. Glucose utilisation in tissues was measured with orally administered radiolabeled glucose.

Results In normal and obese/diabetic mice, glucose utilisation is improved by the decrease of ENS/contraction activities in response to apelin, which generates an increase in hypothalamic NO release. As a consequence, glucose entry is significantly increased in the muscle.

Conclusions Here, we identify a novel mode of communication between the intestine and the hypothalamus that controls glucose utilisation. Moreover, our data identified oral apelin administration as a novel potential target to treat metabolic disorders.

INTRODUCTION

The gut–brain axis is of crucial importance in the control of energy homeostasis. The detection or 'sensing' of intestinal lipids¹ and glucose² activates extrinsic afferent nerves in the gut wall, which inform the hypothalamus about the presence of nutrients in the digestive tract. The subsequent modulation of hypothalamic neuronal activity in response to these peripheral signals leads to modification of metabolic functions including thermogenesis,³ food intake and glucose utilisation in tissues.⁴

Recent studies demonstrate the importance of gut nutrient sensing in the control of glucose

Significance of this study

What is already known on this subject?

- Circulating apelin is a bioactive peptide that exerts pleiotropic actions in various organs (brain, muscle, adipose tissue) to control glucose utilisation and glycaemia.
- The gut-to-brain axis is of crucial importance in the control of glucose homeostasis and is profoundly altered during metabolic diseases such as type 2 diabetes.
- Enteric nervous system (ENS) is under the influence of various bioactive factors such as leptin, which is able to be transcytosed from the lumen to the gut wall.

What are the new findings?

- Luminal apelin is able to be transcytosed through the intestine to reach intraduodenal structures.
- Apelin controls ENS neurotransmitter release, that is, acetylcholine and nitric oxide, associated to variations of duodenal contraction.
- Apelin triggers ENS-induced duodenal contraction, leading to muscle glucose absorption via hypothalamic relay.
- Chronic oral administration of apelin improves glucose tolerance in closed correlation to a decrease in duodenal motility in normal and obese/diabetic mice.

How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

- This study provides unequivocal evidences that modulation of the ENS/contraction of the duodenum is a new physiological system controlling peripheral glucose utilisation via the brain. More importantly, oral apelin administration could be considered as a promising therapeutic target to treat insulin resistance state.

homeostasis.⁵ Alteration of nutrient detection in the duodenum and/or jejunum⁶ disturbs hypothalamic responses that could contribute to the establishment of increased hepatic glucose production⁷

To cite: Fournel A, Drougard A, Duparc T, *et al.* Gut Published Online First: [please include Day Month Year] doi:10.1136/gutjnl-2015-310230

and insulin resistance,² characteristic features of type 2 diabetes. The identification of new molecular mechanisms that are able to modify the gut–brain axis is of major significance in discovering new and successful therapeutic strategies. For example, leptin, which is secreted in the luminal part of the intestine in response to nutrients, can modify the activity of phosphatidylinositol 3 kinase in the jejunum to decrease hepatic glucose production.⁷ In addition to leptin, apelin is another potential target that exerts pleiotropic effects in the whole body. Notably, apelin is recognised as a bioactive peptide implicated in the control of glucose metabolism.⁸ In the central nervous system (CNS), apelin is a neurotransmitter able to target hypothalamic neurons to control glycaemia.⁹ In the periphery, apelin is an adipokine that improves insulin sensitivity of muscles from normal and obese/diabetic mice.⁸ Recent data show that apelin is also present and released in the luminal part of the intestine to stimulate glucose absorption.¹¹

In the GI tract, the enteric nervous system (ENS) is involved in various physiological functions including modulation of intestinal contraction. The ENS is essentially composed of excitatory (choline acetyl transferase (ChAT)) motor neurons or inhibitory motor neurons (neuronal nitric oxide synthase (nNOS)) that stimulate or inhibit intestinal contractility and motility.¹² These ENS neurons are known to express receptors for various factors such as leptin¹³ and glucagon-like peptide-2 (GLP-2).¹⁴ In the later stage of diabetes, alterations of ENS in the proximal part of the intestine (which is being affected first) are associated with an intestinal hypercontractility.¹² Furthermore, several studies have demonstrated that during diabetes there is a loss of inhibitory neurons and an increase in cholinergic innervations in the proximal part of the intestine.¹² Whether the duodenum contraction-controlled by ENS is implicated in the control of glucose homeostasis via the brain is totally unknown.

Here, we investigate whether GI apelin can modify the activity of the ‘ENS/contraction’ couple to control whole-body glucose utilisation via the brain. Overall, our study unravels a new mode of communication involving the mechanical contractility of the duodenum, which could be considered as a potential therapeutic target to improve tissue glucose utilisation via the brain during type 2 diabetes.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Male C57BL/6J mice (Charles River Laboratory, l’Arbresle, France) had free access to food and water. Mice were fed on normal chow or high-fat diet (HFD) containing 20% protein, 35% carbohydrate and 45% fat (Research Diets, New Brunswick, New Jersey, USA). These mice became obese and insulin resistant after 3 months of HFD.⁹ Data have been recorded in fed mice, corresponding to the phase where intestinal segmental waves are generated to increase the rate of nutrients absorption.¹⁵

Acute injections (apelin, apelin receptor (APJ) antagonist, NOS inhibitor, agonist of β -adrenergic receptors, antagonist of nicotinic receptors and capsaicin)

Protocol are described in online supplementary methods section.

Chronic administration of apelin

In other experimental sets of mice, 100 μ L of [Pyr]apelin-13 at a concentration of 1 μ M or 100 μ L of H₂O were orally loaded (oral gavage), once a day for 1 week.

Intragastric and intracerebroventricular surgical procedures, telemetry, isotonic contractions, immunohistochemistry, transcytosis, acetylcholine release, glucose and apelin absorption, glucose utilisation, qPCR, metabolic parameters, insulin and apelin assays, oral glucose tolerance test
Protocols are described in online supplementary methods section.

Cell culture and fluorescence microscopy

HEK-293T cells were cultured as previously described¹⁶ to test the functionality of apelin-TAMRA. Protocol is described in detail in online supplementary methods section. Apelin-TAMRA is a functional apelin molecule that is able to bind and activate its receptor APJ (see online supplementary figure S1).

Ex vivo duodenal real-time NO measurement

Mice were euthanased in fed conditions. After dissection, duodenum fragments were washed in Krebs–Ringer bicarbonate/glucose buffer (pH 7.4) in an atmosphere of 95% O₂–5% CO₂ and then immersed in Eppendorf tubes containing 400 μ L of the same medium. After a 10 min recovery period, the spontaneous NO release was measured at 37°C for 20 min by using an NO-specific amperometric probe (ISO-NOPF, 100 μ m diameter, 5 mm length, World Precision Instruments, Aston Stevenage, UK) implanted directly in the duodenum. Data are expressed as the change (Δ) in NO release from basal conditions.⁹

In vivo hypothalamic real-time NO measurement

Mice in fed conditions were anaesthetised with isoflurane. A 1 cm midline incision was made across the top of the skull, and the animal was placed on a stereotaxic apparatus, as described previously.⁶ Results are presented as mean \pm SEM. During amperometric measurement, animals received H₂O or drugs via an intragastric injection of 10 μ L/min rate for 10 min using a syringe pump. We previously demonstrated that H₂O is the vehicle of choice for glucose administration.² Furthermore, we have also demonstrated that intragastric perfusion of H₂O did not modify c-Fos expression (a marker of neuronal activity) in the hypothalamus compared with NaCl (0.9%). Therefore, all control groups were infused with water, as previously described in detail.²

Statistical analysis

The data are expressed as mean \pm SEM. Differences between the experimental groups were assessed where appropriate using unpaired Student’s and one-way or two-way analysis of variance, followed by post hoc Bonferroni test. Data were analysed using GraphPad Prism V5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA). The results were considered statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Apelin acts on ENS neurons to control duodenal contractions

The duodenum is the first intestinal site of nutrient sensing⁵ and apelin’s effect on glucose absorption.¹¹ Using immunohistochemistry, we found that the apelin receptor APJ is expressed on ChAT and nNOS neurons (figure 1A). To determine whether apelin is able to undergo transcytosis through the intestine, we used apelin-TAMRA, a functional apelin molecule able to bind to the apelin receptor APJ (see online supplementary figure S1). We observed that apelin is able to reach underlying structures

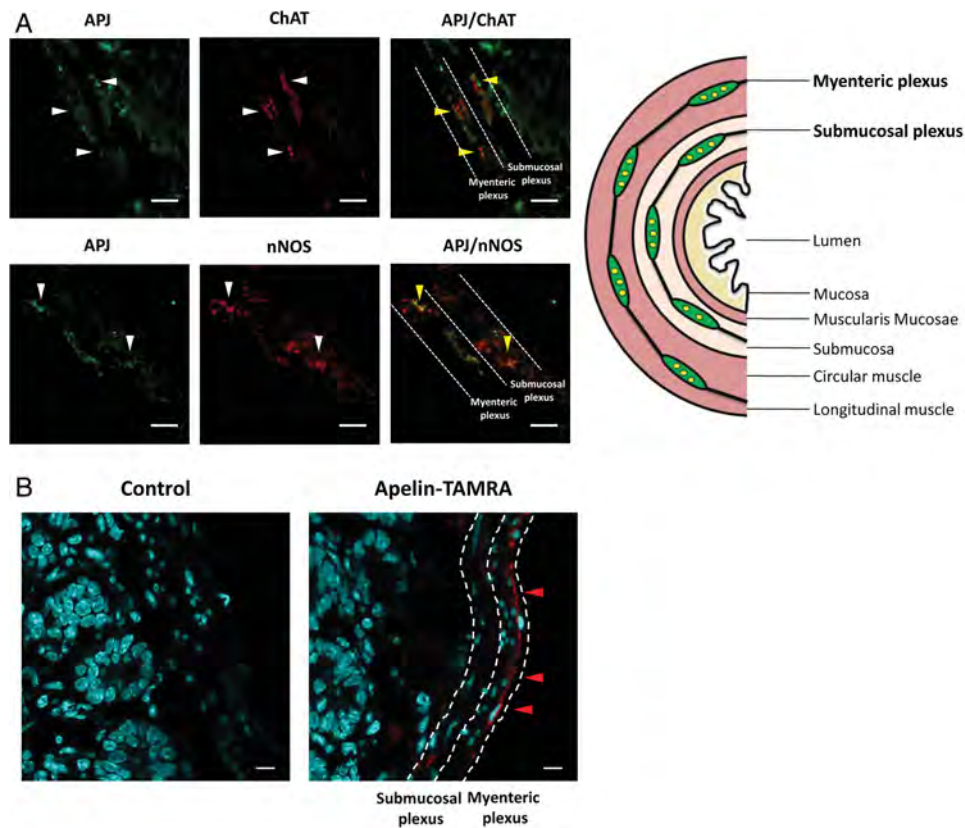


Figure 1 Apelin receptor (APJ) is expressed in enteric nervous system neurons. (A) Duodenal sections from mice stained with anti-APJ antibody (left panels, green: white arrows), anti-choline acetyl transferase (ChAT) or anti-neuronal nitric oxide synthase (nNOS) antibodies (middle panels, red: white arrows) and merge (right panels, yellow arrows). Pictures are representative of four mice per groups. Bars=10 μ m. Right panel: schematic representation of a transverse section through the duodenum. (B) Duodenal sections from mice perfused for 5 min with H₂O (Control) (left panel) or apelin-TAMRA (right panel). Apelin-TAMRA appears in red (red arrows). Pictures are representative of three mice per groups. Bars=10 μ m.

such as neuronal plexus (figure 1B), suggesting apelin, like other adipokines such as leptin,¹⁸ undergo transcytosis.

To assess whether apelin is able to control duodenal motility via the ENS, we used isotonic sensors to measure ex vivo mechanical contractions (see online supplementary figure S2A). Validation of the technique was obtained by using L-NG-nitroarginine methyl ester (L-NMMA) (an inhibitor of NOS enzymes) and isoproterenol (an adrenergic receptor agonist), which stimulated¹⁹ and inhibited²⁰ intestinal contractions, respectively (see online supplementary figure S2B). Application of apelin on ex vivo duodenal preparations increased the amplitude of intestinal contractions (10 pM to 100 nM) (figure 2A) but did not affect the frequency of contractions (see online supplementary figure S2C). The effects of apelin are specific to the duodenum since apelin did not modulate jejunum and ileum contractions (see online supplementary figure S2D). However, concentrations of apelin >1 μ M generated an amplitude of contraction profile similar to that observed at basal levels, suggesting the existence of a physiological switch from a stimulatory effect (10 pM to 100 nM) to basal and/or inhibitory state (1–10 μ M) (figure 2A). This last result suggested the existence of two different signalling pathways for the two doses, and all these effects are antagonised by F13A (see online supplementary figure S2E), an APJ receptor antagonist. To this aim, we choose to focus our intention on the closest doses (ie, 100 nM and 1 μ M) implicated in this physiological switch. Stimulatory effect of apelin on intestinal contractions needed ChAT neurons since hexamethonium, a nicotinic receptor

antagonist, blocked its effect (figure 2B). Moreover, stimulation of duodenal contraction by apelin 100 nM is associated with an increase of duodenal acetylcholine release (figure 2C) without dose-effect (see online supplementary figure S3A), whereas NO is not affected following the exposure to 100 nM of apelin (figure 2D). Apelin 1 μ M exerted the same effect than apelin 100 nM on duodenal acetylcholine release (figure 2C). Conversely, apelin 1 μ M increased real-time duodenal NO release, indicating that this concentration of apelin is dependant of nNOS neurons to modulate its effect on duodenal contractions (figure 2D). This effect was antagonised by the APJ antagonist F13A (see online supplementary figure S3B).

To assess whether this switch is observed in in vivo conditions, we measured electrical duodenal activity in real time via a novel method using electrodes surrounding the duodenum linked to telemetric system (see online supplementary figure S3C). Apelin was injected directly into the duodenum via an intragastric catheter, whereby the electrical activity of the duodenum could be closely associated to mechanical activity.²¹ We found that apelin 100 nM evoked a significant increase in duodenal electrical activity, while apelin 1 μ M decreased this activity (figure 2E). All effects were abolished by APJ antagonist, demonstrating the specificity of apelin action (see online supplementary figure S3D). Thus, apelin is able to modify duodenal contractions via a mechanism involving the ENS (figure 2F).

Duodenum and jejunum are the two parts of the proximal intestine that both participate to the control of glucose absorption in various animal species.^{22 23} Duodenum also expresses

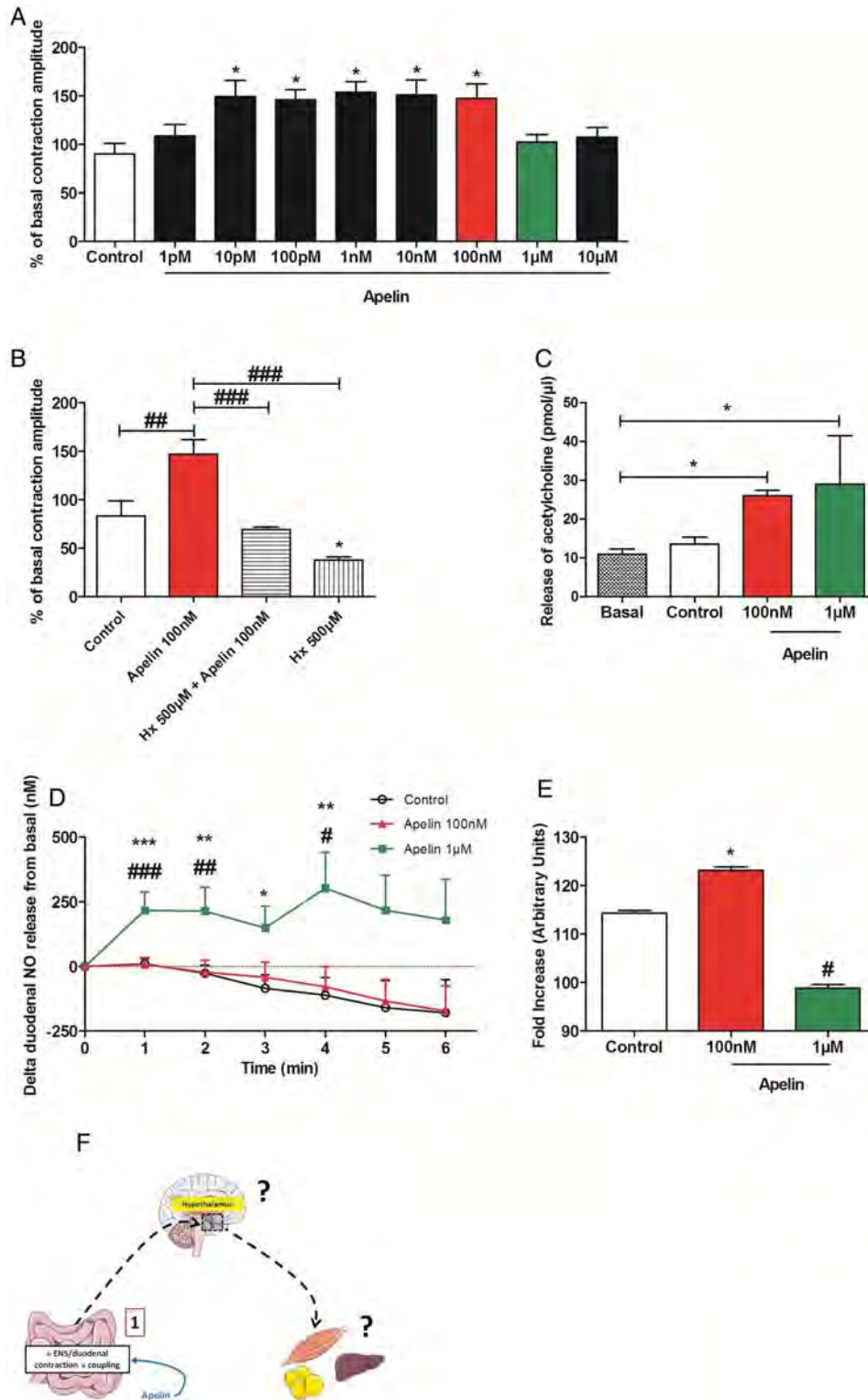


Figure 2 Apelin acts on the enteric nervous system to control duodenal contractions. (A) Ex vivo measurement of duodenal mechanical contraction amplitude in response to Krebs–Ringer solution (Control) or increasing concentrations of apelin (1 pM to 10 µM). n=5–6 per group. *p<0.05 vs Control. (B) Ex vivo measurement of duodenal mechanical contraction amplitude in response to Krebs–Ringer (Control), apelin 100 nM, hexamethonium (Hx) 500 µM alone or with apelin 100 nM. n=5–6 per group. *p<0.05 vs Control. ##p<0.01, ###p<0.001. (C) Ex vivo measurement of duodenal acetylcholine release in basal condition and in response to Krebs–Ringer (Control), apelin 100 nM or apelin 1 µM. n=4 per group. *p<0.05. (D) Ex vivo measurement of duodenal nitric oxide (NO) release in response to Krebs–Ringer (Control), apelin 100 nM or apelin 1 µM. n=5–8 per group. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs Control. #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 vs apelin 100 nM. (E) In vivo measurement of duodenal electrical activity in response to H₂O (Control), apelin 100 nM or apelin 1 µM. n=4–5 per group. *p<0.001 vs Control and versus apelin 1 µM. #p<0.001 vs Control and versus apelin 100 nM. (F) Schematic representation of the results: apelin modulates ENS activity causing a modification of duodenal contractions.

intestinal glucose transporters and sensors.^{24–27} Previous studies have shown that stimulation of intestinal motility is associated with a rise in nutrient absorption.¹⁵ Our data show that apelin 100 nM increased duodenal glucose absorption as opposed to apelin 1 μ M (figure 3A). No significant variation of apelin absorption was observed in our experimental model (figure 3B), but the level of apelin in the duodenal wall was significantly increased in apelin-treated duodenum fragments (see online supplementary figure S6A). In *in vivo* conditions, gut apelin instillation did not modify apelin concentrations in the portal vein (figure 3C). These last results reinforce the concept of the specific action of apelin in ENS on duodenal wall.

Duodenal apelin controls hypothalamic NO release

NO is a central hypothalamic actor that controls glucose homeostasis.²⁸ Moreover, alteration of intestinal glucose sensing linked to the gut–brain axis is associated to abnormal NO hypothalamic response in type 2 diabetes.⁶ Whether duodenal contractions are able to modify hypothalamic NO release is unknown. By using specific probes implanted in the hypothalamus of mice, we showed that decrease duodenal contraction by isoproterenol leads to an increase of hypothalamic NO release (see online supplementary figure S4A), demonstrating that intestinal motility is able to control hypothalamic activity. Using the

same technique, gut administration of apelin 100 nM decreased hypothalamic NO release while apelin 1 μ M allowed a return to basal NO levels (figure 4A). Importantly, this effect is blocked by the APJ antagonist, F13A (see online supplementary figure S4B, C). Moreover, blockade of nicotinic receptors with hexamethonium or destruction of afferent nerve endings with capsaicin abolishes the effect of gut apelin on hypothalamic NO release (figure 4B–D, see online supplementary figure S4D, E).

Here, our data prove the existence of a mode of communication between the gut and the brain, that is, duodenal contractility following apelin evoked signalling is able to modify hypothalamic NO release (figure 4E).

Duodenal apelin controls muscle glucose utilisation via hypothalamic NO

To measure the consequences of modification of duodenal contractions on glucose utilisation via the brain, we measured glucose entry in different tissues in response to oral gavage of apelin and radiolabeled glucose tracers in mice. Intragastric apelin 100 nM decreased glucose entry in the muscle, but not in liver nor in adipose tissue (figure 5A–C). Similar to the effects observed on mechanical and electrical activities in the duodenum, apelin 1 μ M did not change basal glucose entry in the muscle. To further investigate whether brain release of NO is

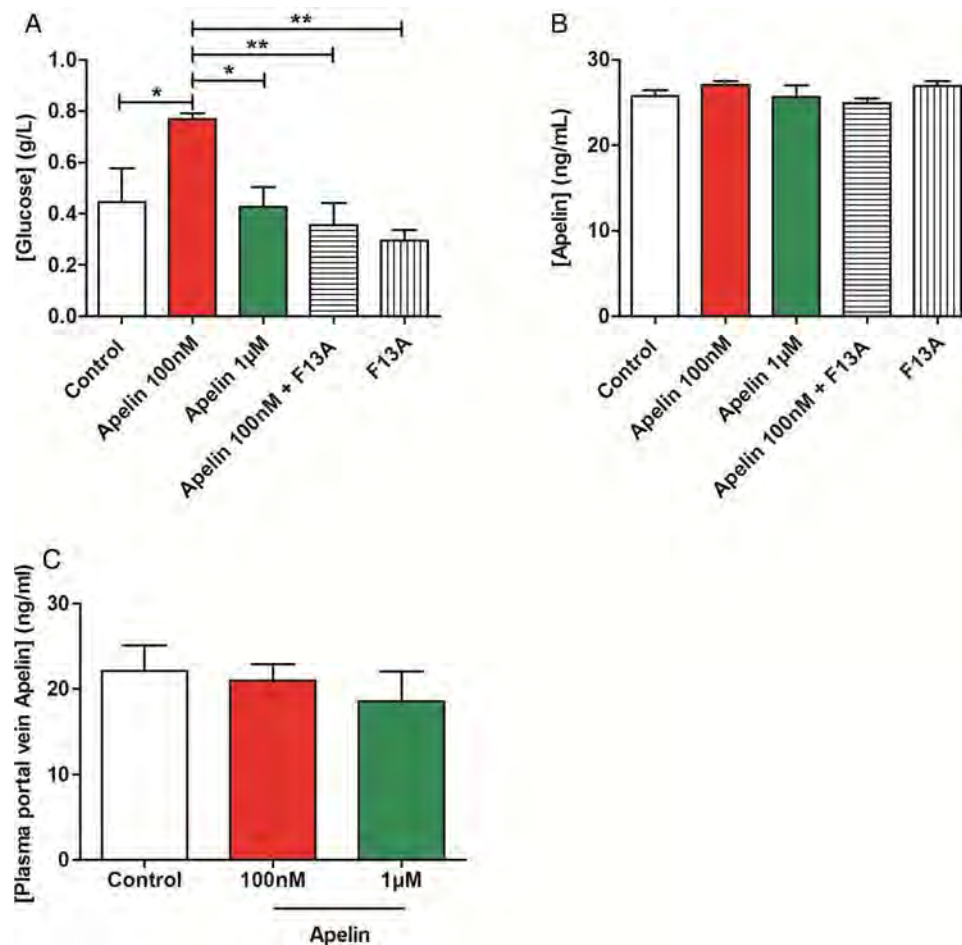


Figure 3 Apelin modulates duodenal glucose absorption. (A) Ex vivo glucose absorption in duodenal everted sacs in response to Krebs–Ringer (Control), apelin 100 nM, apelin 1 μ M, F13A alone or with apelin 100 nM. n=5–7 per group. *p<0.05, **p<0.01. (B) Ex vivo apelin absorption in duodenal everted sacs in response to Krebs–Ringer (Control), apelin 100 nM or 1 μ M, and F13A alone or F13A plus apelin 100 nM. n=4–6 per group. (C) *In vivo* measurement of plasma apelin in portal vein, in response to oral gavage of H₂O (Control), apelin 100 nM or apelin 1 μ M. n=5–6 per group.

mechanistically involved in the effect observed following intragastric apelin 1 μM treatment on glucose muscle entry, we have blocked NO release in the brain by using intracerebroventricular injection of L-NMMA. We found that blocking NO release in the brain decreases glucose entry in the muscle (see online supplementary figure S5A–C), thereby showing the key role of brain NO on the apelin-gut to brain to muscle axis.

Together, our data show that apelin 100 nM increases duodenal contractility and decreases muscle glucose utilisation (figure 5D) via a hypothalamic NO relay.

Chronic apelin gavage increases glucose tolerance via a decrease in duodenal motility

We hypothesised that a chronic stimulation by high level of apelin could provoke a decrease in duodenal contractility and could be associated with an improved glucose tolerance. To test whether chronic apelin treatment could modify basal duodenal contractility, and subsequently glucose utilisation, we measured basal mechanical activity in the duodenum of mice orally treated with apelin (1 μM) for 1 week. Here, we show that chronic oral treatment with apelin increased apelin

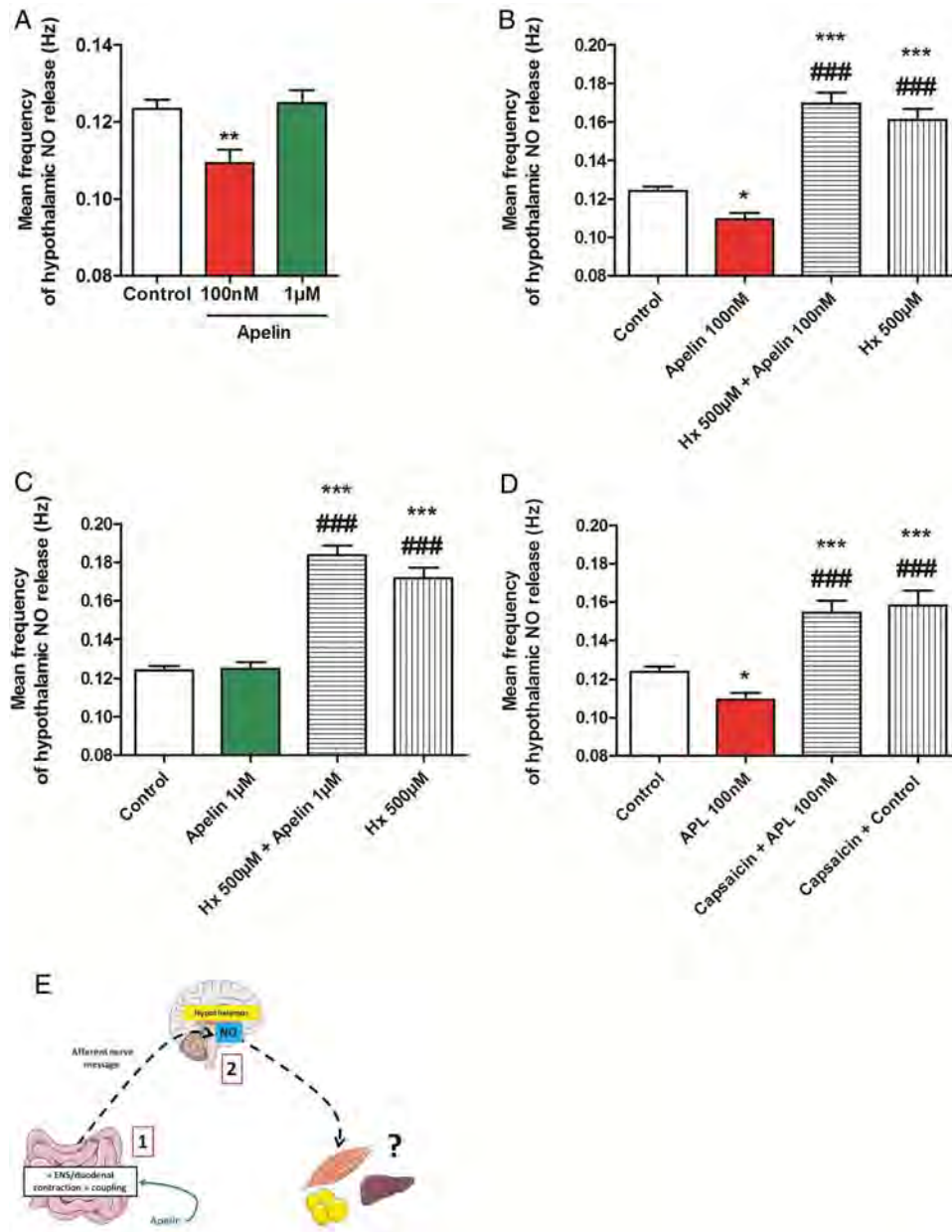


Figure 4 Duodenal apelin controls the gut motility-to-brain axis. (A) In vivo effect of intragastric perfusion of H₂O (Control), apelin 100 nM or apelin 1 μM , on nitric oxide (NO) hypothalamic release frequency. n=5–7 per group. **p<0.01 vs Control. (B) In vivo effect of intragastric perfusion of H₂O (Control), apelin 100 nM, hexamethonium (Hx) 500 μM alone or with apelin 100 nM, on NO hypothalamic release frequency. n=5–8 per group. *p<0.01, ***p<0.001 vs Control. ###p<0.001 vs apelin 100 nM. (C) In vivo effect of intragastric perfusion of H₂O (Control), apelin 1 μM , Hx 500 μM alone or with apelin 1 μM , on NO hypothalamic release frequency. n=5–8 per group. ***p<0.001 vs Control. ###p<0.001 vs apelin 1 μM . (D) In vivo effect of intragastric perfusion of H₂O (Control) and apelin 100 nM in mice pretreated or not by capsaicin on NO hypothalamic release frequency. n=4–7 per group. *p<0.01, ***p<0.001 vs Control. ###p<0.001 vs apelin 100 nM. (E) Schematic representation of the results: by modifying duodenal contractility, apelin modulates NO hypothalamic release.

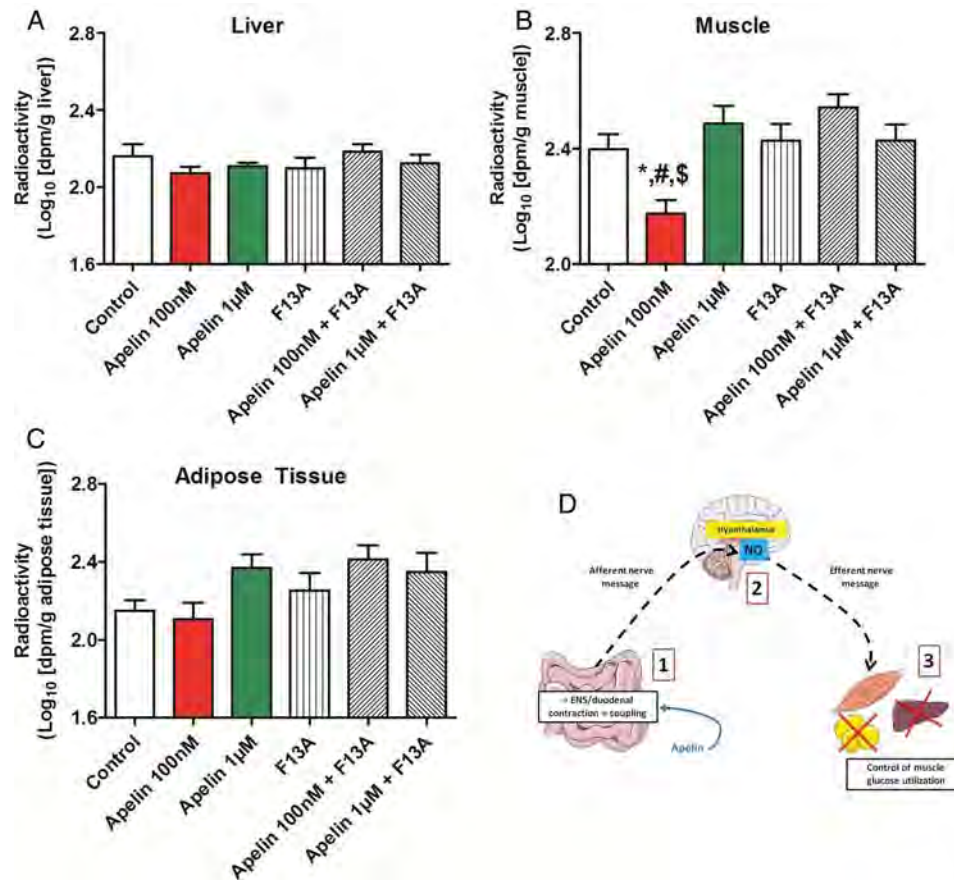


Figure 5 Duodenal apelin modulates muscle glucose utilisation. In vivo measurement of glucose entry in liver (A), muscle (B) and adipose tissue (C) in response to oral gavage of radiolabeled glucose in combination with H₂O (Control), apelin 100 nM alone or with F13A, apelin 1 µM alone or with F13A and F13A alone. n=9–11 per group. *p<0.05 vs Control and versus F13A. #p<0.01 vs apelin 1 µM and versus apelin 1 µM+F13A. §p<0.001 vs apelin 100 nM+F13A. (D) Schematic representation of the results: duodenal apelin controls muscle glucose utilisation via a hypothalamic relay.

concentration in the duodenum, but not in the jejunum and ileum; this observation reinforces the fact that the duodenum is a major target of transcytosed apelin (see online supplementary figure S6B). Chronic apelin treatment decreased basal duodenal contractility (figure 6A), increased glucose tolerance (figure 6B) and insulin release in response to glucose (figure 6C). Moreover, this was associated with an increase of glucose transporter type 4 (GLUT 4) mRNA expression (figure 6D) and glucose entry in the muscle (figure 6E). No significant variation was observed regarding glucose entry in the liver and adipose tissue (see online supplementary figure S6C, D). This improvement of glucose tolerance was not associated with modification of body weight (control=25.2±0.8 g vs apelin 1 µM=23.3±0.9 g).

Apelin restores normal duodenal motility and improves glucose tolerance in obese/diabetic mice

Similar to that observed in plasma and various tissues (eg, adipose tissue, muscle), we show that apelin mRNA level was significantly increased in the duodenum of HFD mice, but not in the jejunum and in the ileum (see online supplementary figure S7A). APJ mRNA expression was not modified in the proximal part of the intestine in HFD mice compared with control mice (see online supplementary figure S7B). First, we measured duodenal contraction in HFD mice in response to acute apelin 1 µM. We found that apelin 1 µM counterbalanced the hypercontractility of duodenum generated by HFD

treatment in ex vivo and in vivo conditions (figure 7A, B and online supplementary figure S7C). This effect was associated with an increase of duodenal NO release (figure 7C) similar to that observed in normal mice (figure 2D). Then, the decrease of duodenal contractility is correlated with, first, a decrease intestinal glucose absorption (figure 7D), without effect on apelin absorption (figure 7E), and second, an increase in hypothalamic NO release in HFD apelin-treated mice (figure 7F and online supplementary figure S7D). This modulation of gut–brain axis by apelin is associated with an improved glucose utilisation in muscle (figure 7G–I).

To test whether targeting the duodenal motility via apelin could be considered as a potential therapeutic target to treat type 2 diabetes, we measured the impact of a chronic (1 week) oral gavage of apelin in HFD mice. First, we found that chronic oral apelin administration improved fed glycaemia, fasted insulinemia and homeostasis model assessment insulin resistance of HFD mice (figure 8A). Second, chronic oral apelin treatment decreased basal duodenal motility (figure 8B) associated with an improved glucose tolerance (figure 8C) and insulin resistance index (figure 8D) in HFD mice. Third, chronic apelin treatment increased GLUT4 mRNA expression in the muscle (figure 8E).

DISCUSSION

Circulating apelin is well recognised as a factor involved in the control of glucose homeostasis by modulating glucose utilisation acting directly on tissues (adipose tissue, muscle, intestine). In

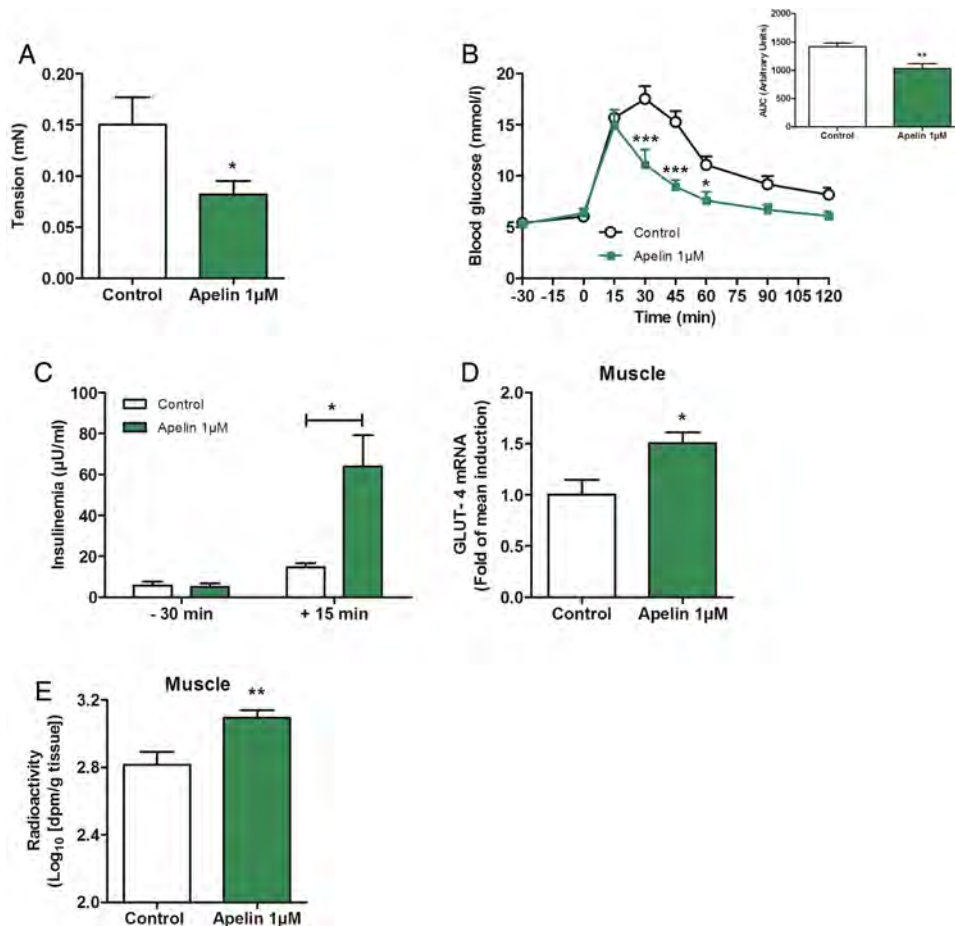


Figure 6 Chronic oral gavage of apelin 1 μM increases glucose tolerance via a decrease in duodenal contractility. (A) Ex vivo measurement of duodenal mechanical contraction in mice orally gavaged for 1 week with H₂O (Control) or apelin 1 μM . n=4–5 per group. *p<0.05 vs Control. (B) Oral glucose tolerance test (OGTT) in 6 h fasted mice, orally gavaged for 1 week with H₂O (Control) or apelin 1 μM . n=4–5 per group. *p<0.05, ***p<0.001 vs Control. The adjacent graph represents the average area under the curve. (C) OGTT-associated insulinemia in 6 h fasted mice, orally gavaged for 1 week with H₂O (Control) or apelin 1 μM . n=4–5 per group. *p<0.05. (D) Relative expression of glucose transporter type 4 mRNA in muscle of mice orally gavaged for 1 week with H₂O (Control) or apelin 1 μM . n=9–10 per group. *p<0.05 vs Control. (E) In vivo measurement of glucose entry in muscle in response to oral gavage of radiolabeled glucose, in mice orally gavaged for 1 week with H₂O (Control) or apelin 1 μM . n=7 per group. **p<0.01 vs Control.

the brain, apelin exerts a dual effect depending on the nutritional state and its levels present in the hypothalamus. We have previously demonstrated that low dose of apelin administered intracerebroventricularly improves glycaemia in fed mice.⁹ This effect could be linked to the slight and continuous increase in plasma apelin observed during the dark period (corresponding to the fed state). All these data suggest that a physiological rise of apelin in the whole body exerts beneficial effect on glucose metabolism as previously observed after an acute intravenous injection.¹⁰ Here, we show that apelin has a dual effect on ENS neurons similar to that observed in the CNS. In particular, we show that apelin induces modulations of duodenal contractility and subsequently modifies hypothalamic activity via variations of hypothalamic NO release to control muscle glucose utilisation. Thus, a parallel could be made between apelin's action on ENS and CNS neurons. In the brain, the effects of apelin on hypothalamic-releasing factors are different depending on the dose administered. Low dose of apelin stimulates NO release, while central high dose of apelin (which has deleterious action on glucose metabolism⁹) releases hydrogen peroxide instead of NO.²⁹ In the duodenum, a similar differential effect on NO release is observed, suggesting that the recruitment of duodenal

nNOS neurons in response to apelin is dependent on the dose injected. In fact, apelin is able to stimulate acetylcholine release at 100 nM and 1 μM , but this potential stimulatory effect of apelin on duodenal contractions is counterbalanced by the action of apelin 1 μM on duodenal NO release. For these reasons, apelin 1 μM effect on duodenal contractions is similar to control in normal mice. This hypothesis is supported by data obtained in HFD mice since apelin 1 μM stimulates duodenal NO release to decrease duodenal hypercontractility. We cannot totally rule out the possibility that apelin 1 μM exerts downregulation of APJ expression in our experimental models similar to that observed in the hypothalamus of obese rats,³⁰ but our data tend to limit this possibility. First, we show that apelin mRNA expression is increased in the duodenum of HFD mice, without modification of APJ mRNA expression. This result supports data from the literature, suggesting that peripheral increase expression of apelin could represent an adaptive pathway to counterbalance insulin resistance.⁸ Second, duodenal fragments release NO in response to apelin 1 μM , but not 100 nM, reinforcing the existence of two different molecular actors to respectively block and stimulate duodenal contractions. Then, our data suggest that ENS neurons are potential targets of

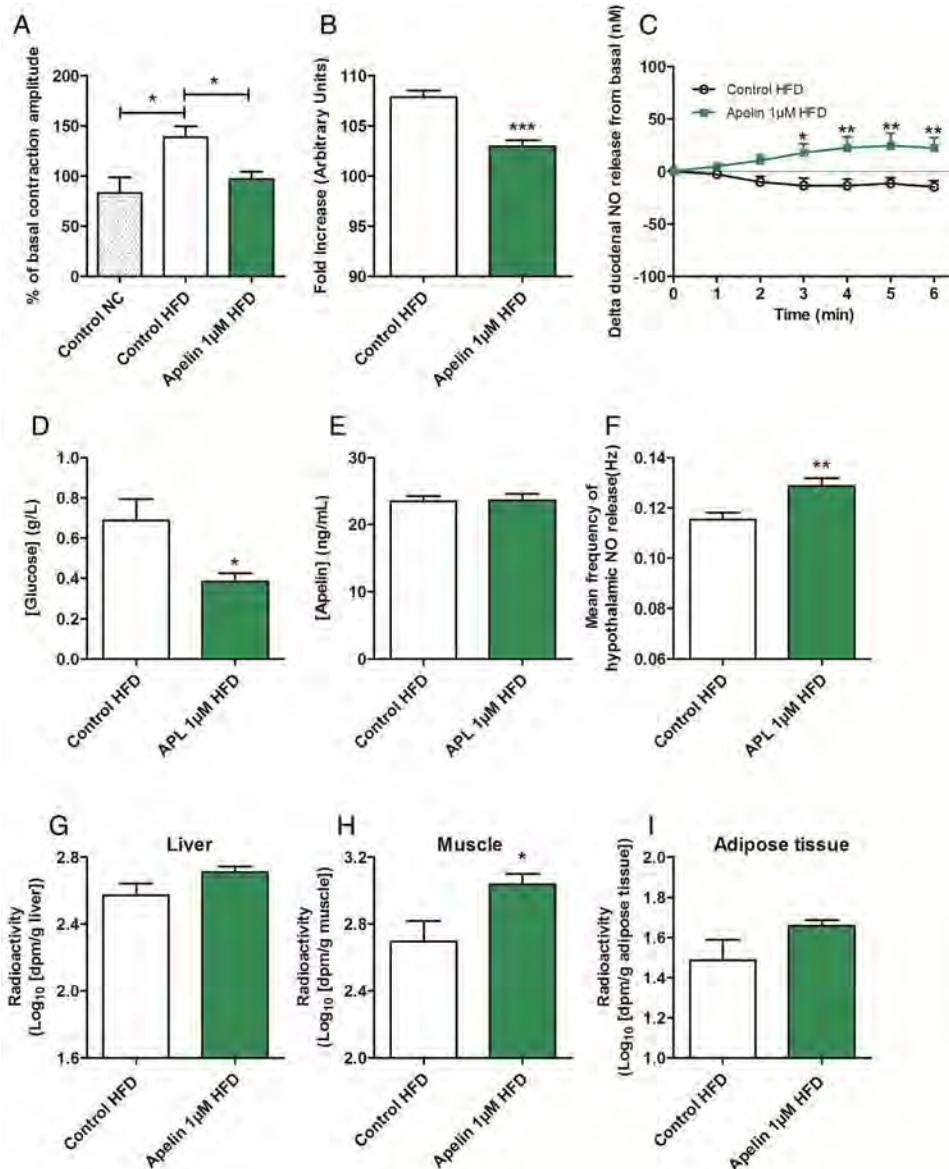


Figure 7 Apelin 1 μM decreases duodenal contractility and improves glucose utilisation in obese/diabetic mice. (A) Ex vivo measurement of duodenal mechanical contraction amplitude in response to Krebs–Ringer (Control) (in normal chow or high-fat diet (HFD) mice) and apelin 1 μM (in HFD mice). $n=5-6$ per group. $*p<0.05$. (B) In vivo measurement of duodenal electrical activity in response to H_2O (Control HFD) and apelin 1 μM . $n=4-7$ per group. $***p<0.001$ vs Control HFD. (C) Duodenal nitric oxide (NO) release in response to Krebs–Ringer (Control HFD) or apelin 1 μM . $n=4-7$ per group. $*p<0.05$, $**p<0.01$ vs Control HFD. (D) Ex vivo glucose absorption in duodenal everted sacs in response to Krebs–Ringer (Control HFD) and apelin 1 μM . $n=4-6$ per group. $*p<0.05$ vs Control HFD. (E) Ex vivo apelin absorption in duodenal everted sacs in response to Krebs–Ringer (Control HFD) and apelin 1 μM . $n=6$ per group. (F) In vivo effect of intragastric perfusion of H_2O (Control HFD) and apelin 1 μM on NO hypothalamic release frequency. $n=6$ per group. $**p<0.01$ vs Control HFD. In vivo measurement of glucose entry in liver (G), muscle (H) and adipose tissue (I) in response to oral gavage of radioactive glucose in combination with H_2O (Control HFD) and apelin. $n=4-6$ per group. $*p<0.05$ vs Control HFD.

apelin action on duodenal motility since (1) apelin modulates duodenal acetylcholine and NO release, (2) apelin stimulatory effect is blocked by hexamethonium and (3) apelin receptor APJ is expressed on ENS neurons. As apelin receptor APJ is expressed in the intestinal wall, we can speculate that apelin may also exert effects on other intestinal cells. Thus, we cannot exclude the potential existence of a direct action of apelin on intestinal smooth muscles.

In the present study, we proposed a new and physiologically relevant mode of communication between the gut and the brain that controls glucose utilisation. Specifically, our data suggest that peripheral glucose utilisation can be controlled by duodenal

contractility via a hypothalamic relay. In physiological conditions, our data suggest that apelin exerts differential effect on ENS neurons during digestion. Therefore, we propose the following model, at the beginning of food intake, apelin has a stimulatory effect (1) on intestinal glucose absorption via actions on GLUT2 translocation¹¹ and (2) on duodenal motility. This stimulatory effect on intestinal contraction leads to a hypothalamic NO blockade that decreases glucose utilisation in tissues in order to avoid a potential hypoglycaemia. At the end of the meal, high levels of apelin target nNOS neurons to (1) slow down duodenal waves and stop glucose absorption, (2) restore hypothalamic NO release and (3) increase muscle

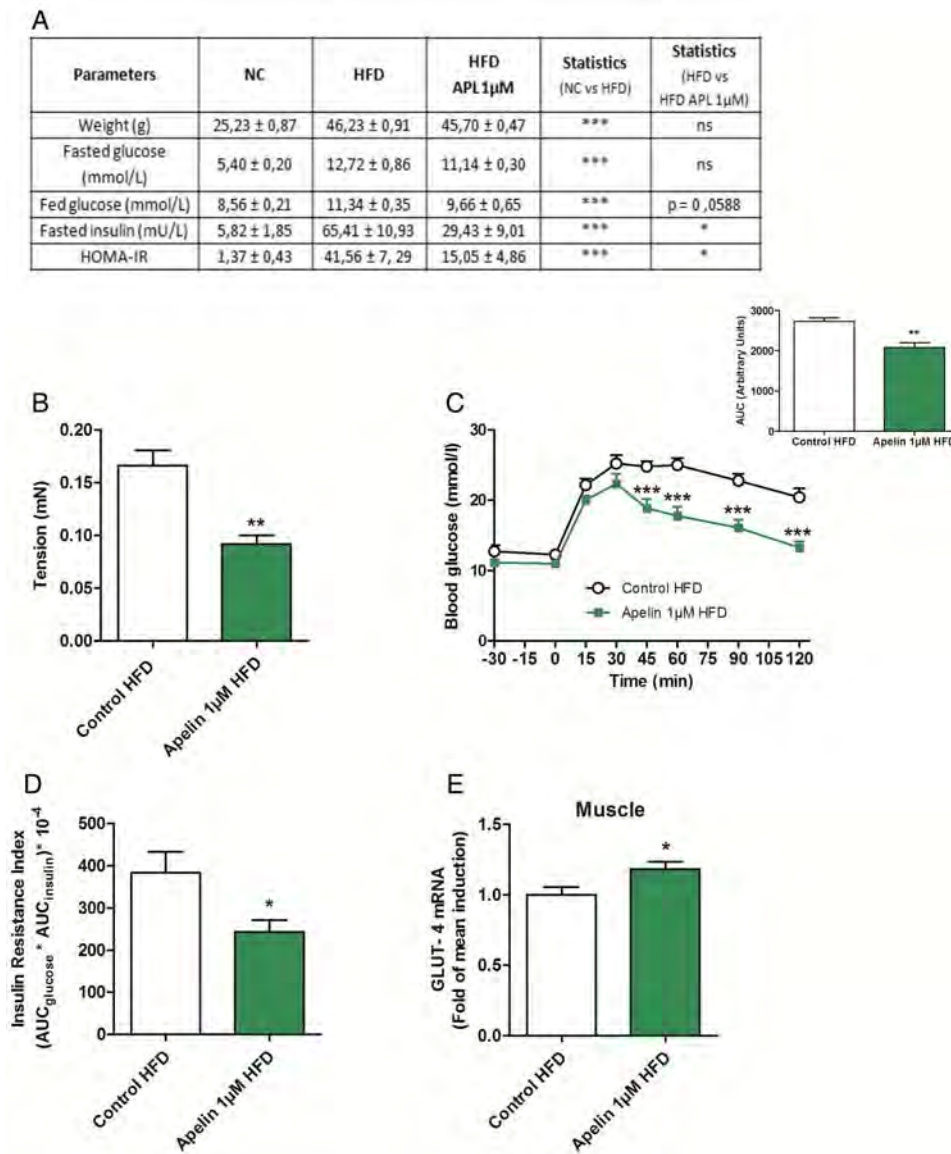


Figure 8 Apelin 1 μ M treatment increases glucose tolerance via a decrease in duodenal contractility. (A) Effects of high-fat diet (HFD) on metabolic parameters in mice orally gavaged for 1 week with H₂O (Control HFD) or apelin 1 μ M. n=6 per group. (B) Ex vivo measurement of duodenal mechanical contraction in HFD mice orally gavaged for 1 week with H₂O (Control HFD) or apelin 1 μ M. n=6 per group. **p<0.01 vs Control HFD. (C) Oral glucose tolerance test (OGTT) in 6 h fasted HFD mice, orally gavaged for 1 week with H₂O (Control HFD) or apelin 1 μ M. n=6 per group. **p<0.01, ***p<0.001 vs Control HFD. The adjacent graph represents the average area under the curve (AUC). (D) OGTT-associated insulin resistance index in 6 h fasted HFD mice, orally gavaged for 1 week with H₂O (Control HFD) or apelin 1 μ M. n=6 per group. *p<0.05 vs Control HFD. (E) Relative expression of glucose transporter type 4 (GLUT-4) mRNA in muscle of HFD mice orally gavaged for 1 week with H₂O (Control HFD) or apelin 1 μ M. n=9–10 per group. *p<0.05 vs Control. HOMA-IR, homeostasis model assessment insulin resistance; NC, normal chow.

glucose utilisation. The association between central NO and peripheral glucose utilisation has been previously demonstrated by our group since an increase in hypothalamic NO release stimulates peripheral vascular flux, leading to glucose entry in muscle.²⁸

Such regulations of glucose homeostasis implicating the gut-brain axis and an intestinal sensor during the digestion have clearly been established. We have previously demonstrated that intestinal glucose sensing during hyperglycaemia generates an increase in hepatic glycogenesis to prevent the next period of fasting via a central relay.¹⁷ This phenomenon implicates a hypothalamic GLP-1 pathway; GLP-1 is, similar to apelin, an intestinal hormone present in the brain and playing an

important role as a neurotransmitter.² All these data implicating intestinal hormonal sensing and mechanosensing highlight the importance of the ‘gut-to-brain-to-peripheral’ axis in the control of glucose metabolism.

Type 2 diabetes is associated with insulin resistance. We have previously demonstrated that alteration of intestinal glucose sensing participates to the insulin resistance state observed in obese/diabetic mice.^{2, 6} In fact, intestinal inflammation and oxidative stress are associated with abnormal glucose sensing, leading to aberrant hypothalamic NO release.⁶ This alteration of glucose detection could be associated with disturbance of mechanodetection. Accordingly, it has been shown that type 2 diabetes is associated with a decrease of nNOS neuronal

population in the ENS¹² generating an increase of intestinal motility.^{12 31} Intestinal hypermotility could first induce an increase in duodenal glucose absorption, leading to fed hyperglycaemia, and second, according to our results, it may cause insulin resistance via the brain. Here, we have shown that high levels of apelin are able to restore basal duodenal contraction, specifically in the proximal portion of the intestine in normal and obese/diabetic mice. Targeting the ENS neurons to modulate gut contraction via apelin or another molecular target represents an invaluable tool to decrease duodenal contraction, which could have a real potential interest for new therapeutic strategies to treat type 2 diabetes comorbidities such as hyperglycaemia and insulin resistance. Our data support this hypothesis since chronic oral apelin ameliorates glucose tolerance in HFD mice.

Numerous factors could reach the ENS neurons to modulate their activities. Some of them could have a plasma origin, and others could act from the intestinal lumen to the ENS via transcytosis as in the case of leptin.¹⁸ Apelin is known to be released in the lumen by enterocytes in response to glucose to aid glucose absorption.¹¹ In this study, we show that transcytosis of apelin in the duodenum controls glucose absorption via an ENS-dependent mechanism. Therefore, our data highlight a novel mode of regulation of glucose homeostasis involving an intestinal factor. The importance of gut hormones such as GLP-1 in the control of glucose metabolism is well established³² and represents an innovative approach to treat metabolic disorders. In addition to their direct effects on insulin-sensitive tissues, the potential actions of these factors on 'ENS/contraction-to brain-to peripheral' axis could bring new possibilities and combinations to improve diabetic state. Actually, type 2 diabetic strategies aim to target GLP-1, which is released by L-cells located in the ileum. Another originality of our work is to target the first site of nutrients detection, that is, the duodenum, which is now considered, like jejunum,⁷ as a future target to restore glucose homeostasis during diabetes.⁵ Nutrient sensing, which is largely altered in type 2 diabetes,⁵ could be compensated by modulation of duodenal contraction as a therapeutic action to suppress hyperglycaemia. This hypothesis is supported by the work of Sandoval *et al*,³³ which demonstrates that internal mechanical manipulation of the duodenum after fasting generates gut hormones release. We speculate that modulation of intestinal contractions by apelin or other factors could involve a hormonal-mediated signal in addition to the capsaicin-sensitive afferent nervous signal demonstrated in the present study.

In conclusion, we provide evidence that interactions between the ENS, duodenal contractility and the brain are of crucial importance to control glucose utilisation in physiological conditions. Moreover, we demonstrate that intestinal apelin is a key actor playing a major role in this system. Besides, numerous possibilities exist in terms of (1) potential other molecular factors (eg, hormones) targeting this system or (2) potential effects on physiological functions (eg, food intake, lipid metabolism); our study illustrates the mechanisms of action of intestinal apelin and its impact on glucose homeostasis. Future explorations are warranted to demonstrate the role of this axis to treat metabolic diseases in humans.

Author affiliations

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Toulouse Cedex 4, France

²NeuroMicrobiota, European Associated Laboratory (EAL) INSERM/UCL

³Université Paul Sabatier, Toulouse, France

⁴Université Catholique de Louvain (UCL), Louvain Drug Research Institute, LDRI, Metabolism and Nutrition research group, WELBIO (Walloon Excellence in Life sciences and BIotechnology), Brussels, Belgium

⁵Visceral Pain Group, Centre for Nutrition and Gastrointestinal Diseases, Discipline of Medicine, University of Adelaide, South Australia Health and Medical Research Institute (SAHMRI), Adelaide, South Australia, Australia

⁶Department of Gastroenterology and Hepatology, Royal Adelaide Hospital, Adelaide, South Australia, Australia

⁷Discipline of Physiology, Faculty of Health Sciences, The University of Adelaide, Adelaide, South Australia, Australia

⁸Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1037, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), CHU Rangueil, Toulouse, Cedex 4, France

⁹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1043, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP), CHU Purpan, Toulouse, Cedex 03, France

Acknowledgements We thank Sophie Allart and Astrid Canivet for technical assistance at the cellular imaging facility of INSERM UMR 1043, Toulouse, the Service Phénotypage UMS US006/INSERM for telemetric measurements, and Simon Nicolas and Isabelle Castan-Laurell for helpful discussion.

Contributors AF and AD contributed equally. AF, AD, TD, AM, SMB, JC, SL-G, BM, AC, AL, PR, NC, PDC and CK acquired data. AF, AD, PDC and CK have performed the study concept and design. AF, AD, PDC and CK analysed and interpreted the data. AF, AD, TD, SMB, JC, NC, NV, PV, PDC and CK wrote the manuscript.

Funding This work was supported by the Fonds de la Recherche Scientifique—FNRS for the FRFS-WELBIO under grant: WELBIO-CR-2012S-02R. This work was supported in part by the Funds InBev-Baillet Latour (Grant for Medical Research 2015). The authors thank the Societe Francaise de Nutrition (SFN) and the Fondation Recherche Médicale (FRM) (Grant ING20150532586) for financial support. PDC is the recipient of grants from FNRS (convention J.0084.15, convention 3.4579.11), PDR (Projet de Recherche, convention: T.0138.14), FRM (Fondation Recherche Médicale) and ARC (Action de Recherche Concertée—Communauté française de Belgique convention: 12/17-047). PDC is also a recipient of an ERC Starting Grant 2013 (European Research Council, Starting grant 336452-ENIGMO). NV is recipient of an ERC (Consolidator Grant, PIPE). SMB is an NHMRC Australia R. D Wright Biomedical Fellow.

Competing interests None declared.

Ethics approval Experiments were conducted according to the European Community regulations concerning the protection of experimental animals and were approved by the local Animal Care and Use Committee.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Open Access This is an Open Access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

REFERENCES

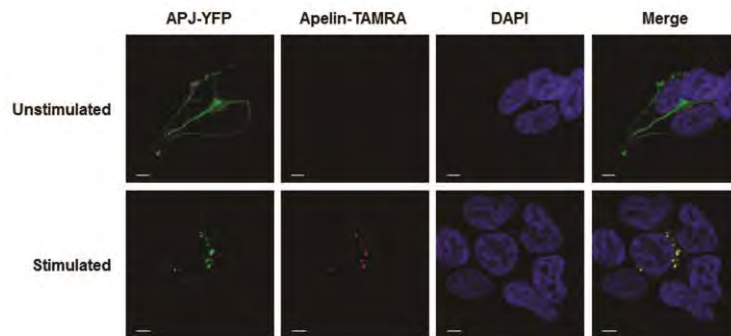
- Blouet C, Schwartz GJ. Duodenal lipid sensing activates vagal afferents to regulate non-shivering brown fat thermogenesis in rats. *PLoS ONE* 2012;7:e51898.
- Knauf C, Cani PD, Kim DH, *et al*. Role of central nervous system glucagon-like Peptide-1 receptors in enteric glucose sensing. *Diabetes* 2008;57:2603–12.
- Clapham JC. Central control of thermogenesis. *Neuropharmacology* 2012;63:111–23.
- Coll AP, Yeo GS. The hypothalamus and metabolism: integrating signals to control energy and glucose homeostasis. *Curr Opin Pharmacol* 2013;13:970–6.
- Breen DM, Rasmussen BA, Cote CD, *et al*. Nutrient-sensing mechanisms in the gut as therapeutic targets for diabetes. *Diabetes* 2013;62:3005–13.
- Duparc T, Naslain D, Colom A, *et al*. Jejunum inflammation in obese and diabetic mice impairs enteric glucose detection and modifies nitric oxide release in the hypothalamus. *Antioxid Redox Signal* 2011;14:415–23.
- Rasmussen BA, Breen DM, Duca FA, *et al*. Jejunal leptin-PI3K signaling lowers glucose production. *Cell Metab* 2014;19:155–61.
- Castan-Laurell I, Dray C, Knauf C, *et al*. Apelin, a promising target for type 2 diabetes treatment? *Trends Endocrinol Metab* 2012;23:234–41.
- Duparc T, Colom A, Cani PD, *et al*. Central apelin controls glucose homeostasis via a nitric oxide-dependent pathway in mice. *Antioxid Redox Signal* 2011;15:1477–96.
- Dray C, Knauf C, Daviaud D, *et al*. Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 2008;8:437–45.
- Dray C, Sakar Y, Vinel C, *et al*. The intestinal glucose-apelin cycle controls carbohydrate absorption in mice. *Gastroenterology* 2013;144:771–80.
- Chandrasekharan B, Srinivasan S. Diabetes and the enteric nervous system. *Neurogastroenter Motil* 2007;19:951–60.

Neurogastroenterology

- 13 Reichardt F, Krueger D, Schemann M. Leptin excites enteric neurons of guinea-pig submucous and myenteric plexus. *Neurogastroenterol Motil* 2011;23:e165–70.
- 14 Bjerknes M, Cheng H. Modulation of specific intestinal epithelial progenitors by enteric neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:12497–502.
- 15 Sababi M, Bengtsson UH. Enhanced intestinal motility influences absorption in anaesthetized rat. *Acta Physiol Scand* 2001;172:115–22.
- 16 Masri B, Salahpour A, Didriksen M, et al. Antagonism of dopamine D2 receptor/beta-arrestin 2 interaction is a common property of clinically effective antipsychotics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:13656–61.
- 17 Knauf C, Cani PD, Perrin C, et al. Brain glucagon-like peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage. *J Clin Invest* 2005;115:3554–63.
- 18 Cammisotto PG, Gingras D, Bendayan M. Transcytosis of gastric leptin through the rat duodenal mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:G773–9.
- 19 Zizzo MG, Mule F, Serio R. Duodenal contractile activity in dystrophic (mdx) mice: reduction of nitric oxide influence. *Neurogastroenterol Motil* 2003;15:559–65.
- 20 Zizzo MG, Mule F, Serio R. Inhibitory responses to exogenous adenosine in murine proximal and distal colon. *Br J Pharmacol* 2006;148:956–63.
- 21 Postorino A, Mancinelli R, Racanicchi C, et al. Spontaneous electromechanical activity in the rat duodenum in vitro. *Arch Int Physiol Biochim* 1990;98:35–40.
- 22 Riesenfeld G, Sklan D, Bar A, et al. Glucose absorption and starch digestion in the intestine of the chicken. *J Nutr* 1980;110:117–21.
- 23 Camacho RC, Denny JC, Pencek RR, et al. Portal venous hyperinsulinemia does not stimulate gut glucose absorption in the conscious dog. *Metabolism* 2004;53:1290–5.
- 24 Kim HR, Park SW, Cho HJ, et al. Comparative gene expression profiles of intestinal transporters in mice, rats and humans. *Pharmacol Res* 2007;56:224–36.
- 25 Lohrenz AK, Duske K, Schonhosen U, et al. Glucose transporters and enzymes related to glucose synthesis in small intestinal mucosa of mid-lactation dairy cows fed 2 levels of starch. *J Dairy Sci* 2011;94:4546–55.
- 26 Pfannkuche H, Gabel G. Glucose, epithelium, and enteric nervous system: dialogue in the dark. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2009;93:277–86.
- 27 Shirazi-Beechey SP, Moran AW, Batchelor DJ, et al. Glucose sensing and signalling; regulation of intestinal glucose transport. *Proc Nutr Soc* 2011;70:185–93.
- 28 Cabou C, Cani PD, Campistron G, et al. Central insulin regulates heart rate and arterial blood flow: an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism altered during diabetes. *Diabetes* 2007;56:2872–7.
- 29 Drougard A, Duparc T, Brenachot X, et al. Hypothalamic apelin/reactive oxygen species signaling controls hepatic glucose metabolism in the onset of diabetes. *Antioxid Redox Signal* 2014;20:557–73.
- 30 Clarke KJ, Whitaker KW, Reyes TM. Diminished metabolic responses to centrally-administered apelin-13 in diet-induced obese rats fed a high-fat diet. *J Neuroendocrinol* 2009;21:83–9.
- 31 Carrier GO, Aronstam RS. Increased muscarinic responsiveness and decreased muscarinic receptor content in ileal smooth muscle in diabetes. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;254:445–9.
- 32 Everard A, Cani PD. Gut microbiota and GLP-1. *Rev Endocr Metab Disord* 2014;15:189–96.
- 33 Sandoval D, Dunki-Jacobs A, Sorrell J, et al. Impact of intestinal electrical stimulation on nutrient-induced GLP-1 secretion in vivo. *Neurogastroenterol Motil* 2013;25:700–5.

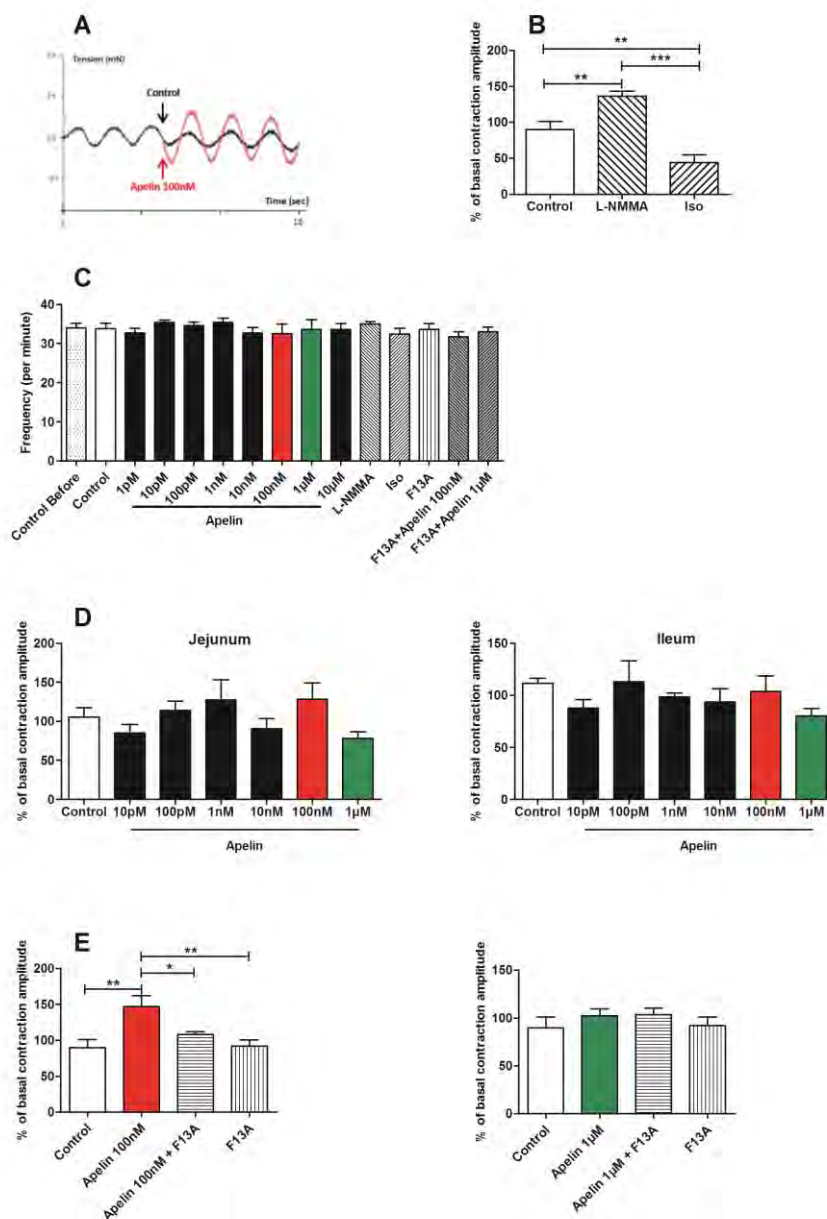
Supplementary legends

Supplemental figure S1. Apelin-TAMRA is functional and induces apelin receptor internalization. HEK-293T cells transiently expressing YFP tagged APJ were incubated for 1 hour with: no drug (Unstimulated) or 100nM Apelin-TAMRA (Stimulated). Representative images of each condition showing native YFP fluorescence (left panels, green), TAMRA fluorescence (middle left panels, red), DAPI (middle right panels, blue) and Merge (right panels). Representative pictures of each condition are shown (n=4). Bars = 10 μ m.



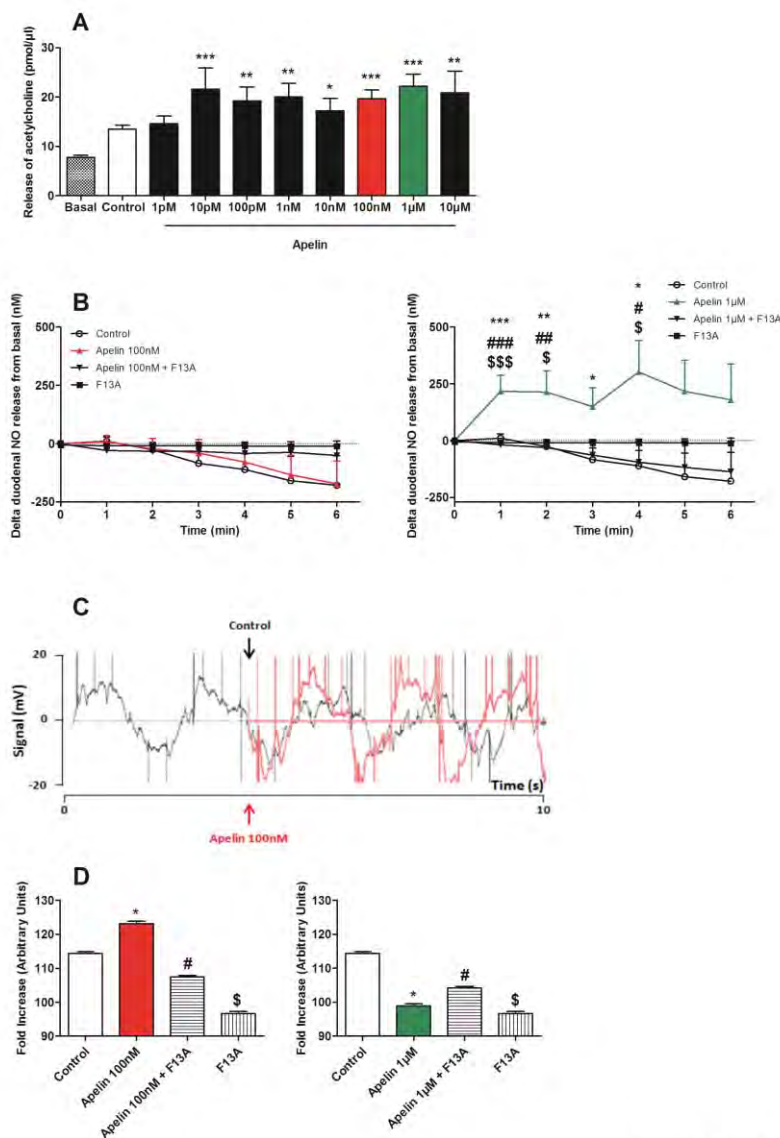
**Supplementary
figure S1**

Supplemental figure S2. Apelin modulates duodenal contractions. (A) Representative recording of duodenal mechanical contractions in response to Krebs-Ringer (Control) or Apelin 100nM. (B) Ex vivo measurement of duodenal mechanical contractions amplitude in response to Krebs-Ringer (Control), L-NMMA or Iso (Isoproterenol). n=5-6 per group. **P<0.01, ***P<0,001. (C) Ex vivo measurement of duodenal mechanical contractions frequency before injection (Control Before) and in response to Krebs-Ringer (Control), increasing concentrations of Apelin (1pM-10μM), L-NMMA, Iso (Isoproterenol) and F13A alone or F13A plus Apelin (100nM or 1μM). n=4-6 per group. (D) Ex vivo measurement of jejunal (left panel) and ileal (right panel) mechanical contractions amplitude in response to Krebs-Ringer (Control) or increasing concentrations of Apelin (10pM-1μM). n=4-7 per group. (E) Ex vivo measurement of duodenal mechanical contractions amplitude in response to H2O (Control), Apelin 100nM (left panel) or 1μM (right panel), F13A or combination of Apelin plus F13A. n=5-6 per group. *P<0.05, **P<0.01.



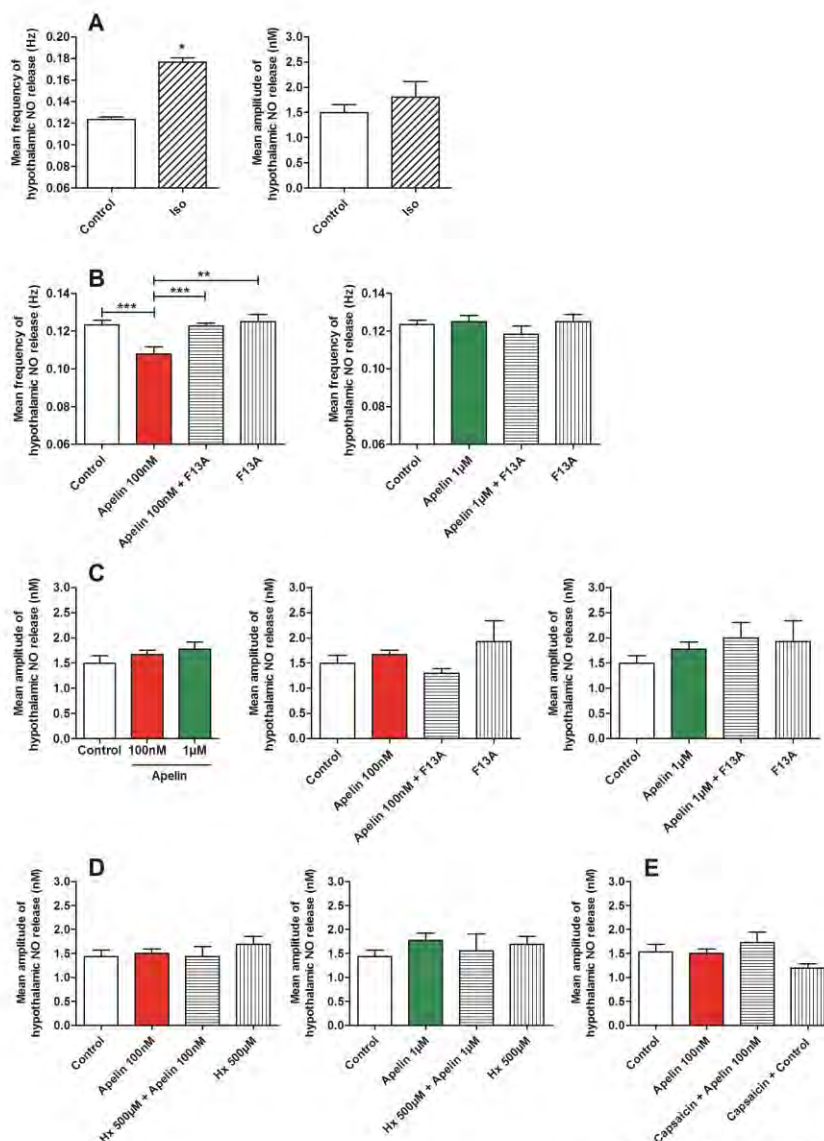
Supplementary
figure S2

Supplemental figure S3. Apelin acts on the ENS to modulate duodenal contractions. (A) Ex vivo measurement of duodenal acetylcholine release in basal condition and in response to Krebs-Ringer (Control) or increasing concentrations of Apelin (1pM-10µM). n = 5-13 per group. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs. Basal. (B) Duodenal NO release in response to Krebs-Ringer (Control), Apelin 100nM (left panel) or 1µM (right panel), F13A or combination of Apelin plus F13A. n=5-8 per group. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. Control. #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001 vs. F13A. §P<0.05, §§§P<0.001 vs. F13A + Apelin 1µM. (C) Representative recording of duodenal electrical activity in response to Krebs-Ringer (Control) or Apelin 100nM. (D) In vivo measurement of duodenal electrical activity in response to H2O (Control), Apelin 100nM (left panel) or 1µM (right panel), F13A or combination of Apelin plus F13A. n=4-7 per group. Left panel: *P<0,001 vs. Control, vs. Apelin 100nM + F13A and vs. F13A. #P<0.001 vs. Control, vs. Apelin 100nM and vs. F13A. §P<0.001 vs. Control, vs. Apelin 100nM and vs. Apelin 100nM + F13A. Right panel: *P<0,01 vs. Control, vs. Apelin 1µM + F13A and vs. F13A. #P<0.01 vs. Control, vs. Apelin 1µM and vs. F13A. §P<0.01 vs. Control, vs. Apelin 1µM and vs. Apelin 1µM + F13A.



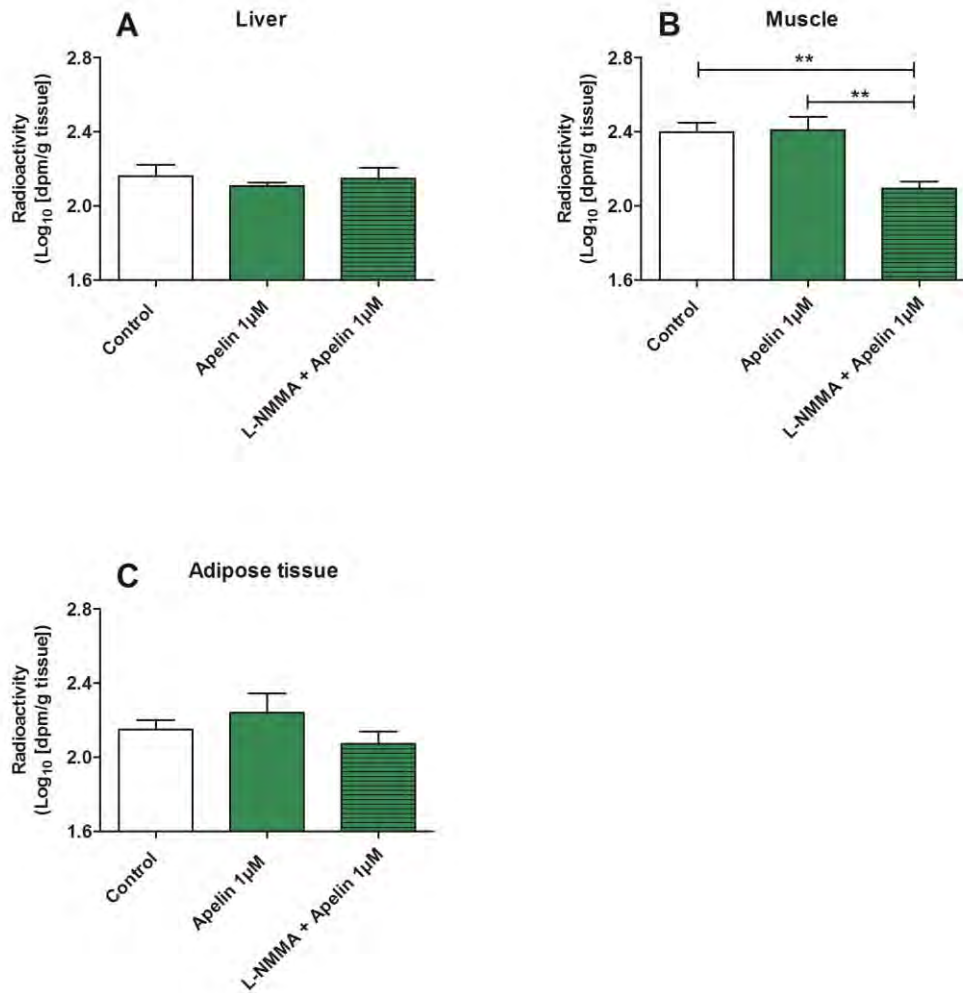
Supplementary figure S3

Supplemental figure S4. Duodenal apelin modulates NO release in the hypothalamus. (A) In vivo effect of intragastric perfusion of H₂O (Control) or Isoproterenol (Iso) on NO hypothalamic release frequency (left panel) and amplitude (right panel). n=5-7 per group. *P<0.05 vs. Control. (B) In vivo effect of intragastric perfusion of H₂O (Control), Apelin 100nM (left panel) or 1μM (right panel), F13A or combination of Apelin plus F13A. n=4-7 per group. **P<0,01, ***P<0,001. (C) In vivo effect of intragastric perfusion of H₂O (Control), Apelin 100nM alone or with F13A, Apelin 1μM alone or with F13A, or F13A alone, on hypothalamic NO release amplitude. n=4-7 per group. (D) In vivo effect of intragastric perfusion of H₂O (Control), Apelin 100nM (left panel) or 1μM (right panel), Hexamethonium 500μM (Hx 500μM) or combination of Apelin plus Hexamethonium 500μM, on hypothalamic NO release amplitude. n=5-8 per group. (E) In vivo effect of intragastric perfusion of H₂O (Control) and Apelin 100nM in mice pretreated or not by Capsaicin on hypothalamic NO release amplitude. n=4-7 per group.



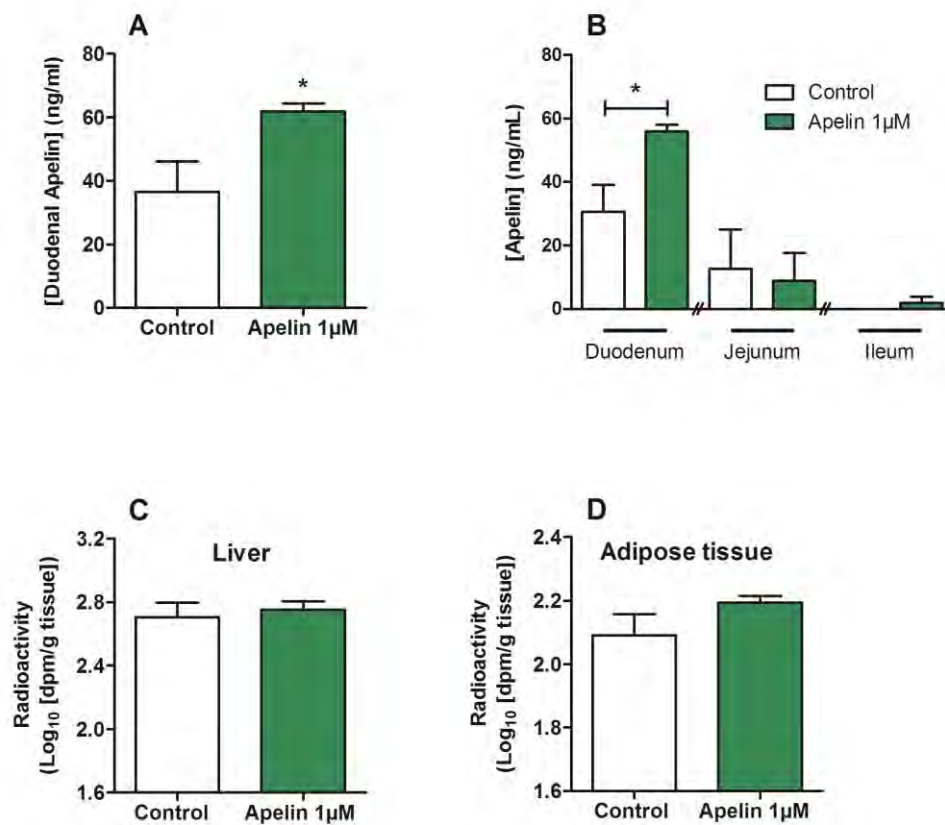
Supplementary figure S4

Supplemental figure S5. Hypothalamic NO mediates the effects of intestinal Apelin in muscle glucose utilization. In vivo measurement of glucose entry in liver (A), muscle (B) and adipose tissue (C) in response to oral gavage of radioactive glucose in combination with H₂O (Control) or Apelin 1 μ M after an icv injection of aCSF (Control) or L-NMMA. n=8-12 per group. **P<0.01.



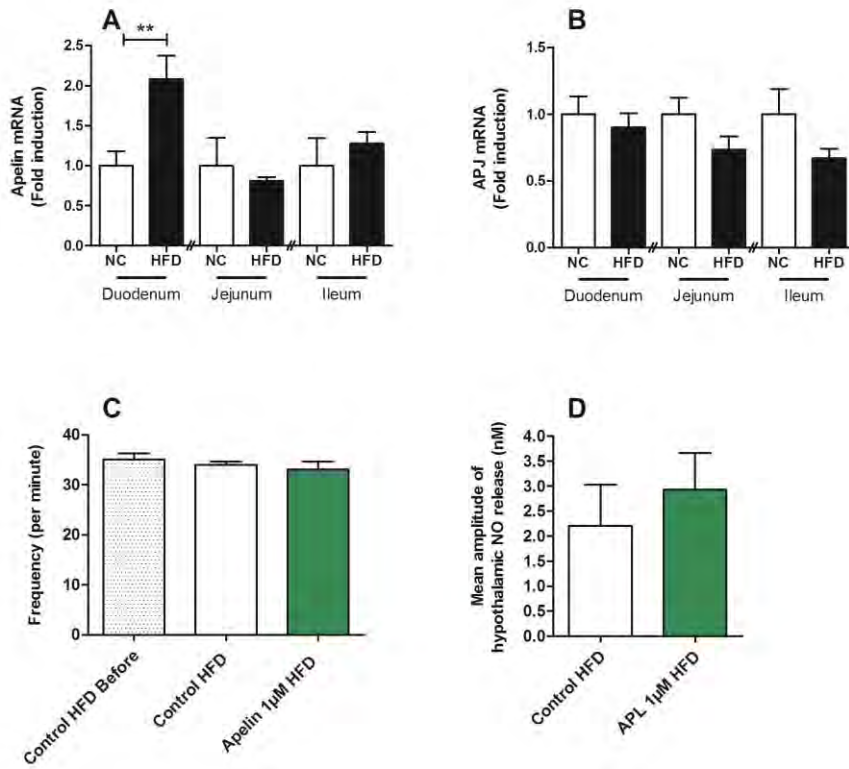
Supplementary figure S5

Supplemental figure S6. (A) Ex vivo measurement of duodenal Apelin of everted duodenal sacs incubated in Krebs-Ringer with 10g/L of glucose alone (Control), or with Apelin 1 μ M. n=5 per group. *P<0.05 vs. Control. (B) In vivo measurement of duodenal, jejunal and ileal Apelin in response to oral gavage of glucose with H₂O (Control) or Apelin 1 μ M. n=4 per group. *P < 0.05. In vivo measurement of glucose entry in liver (C) and adipose tissue (D) in response to oral gavage of radioactive glucose, in mice orally gavaged for one week with H₂O (Control) or Apelin 1 μ M. n=7 per group. *P<0.05 vs. Control.



Supplementary
figure S6

Supplemental figure S7. Relative expression of Apelin (A) and APJ (B) mRNA in duodenum, jejunum and ileum of NC or HFD mice. n=5-6 per group. **P<0.01. (C) Ex vivo measurement of duodenal mechanical contraction frequency before injection (Control HFD Before) and in response to Krebs-Ringer (Control HFD) or Apelin 1 μ M in HFD mice. n=5-6 per group. (D) In vivo effect of intragastric perfusion of H2O (Control HFD) or Apelin 1 μ M, on NO hypothalamic release amplitude in HFD mice. n=4-6 per group.



Supplementary figure S7

Supplementary methods

Intragastric surgical procedures

Under anesthesia (Isoflurane), a catheter was surgically inserted into the stomach. Briefly, a 4mm laparotomy was performed on the left side of the abdomen, and the stomach was gently extracted. One centimeter of a Teflon catheter was inserted into the stomach and secured by surgical glue (Histoacryl; 3M Health Care, St. Paul, MN). The other extremity of the catheter was tunneled under the skin and exteriorized at the back of the neck [1]. After a 1-week recovery period, hypothalamic NO amperometric measurements were performed in mice.

Intracerebroventricular surgical procedures

Under anesthesia (Isoflurane) an indwelling intra cerebroventricular (icv) catheter (Alzet Brain Perfusion Kit 3, 1-3 mm, Charles River, -1mm lateral to the sagittal suture, -0.2mm posterior to the bregma and -1.7mm below the skull surface) was implanted [2].

Acute injections

Apelin. For *in vivo* acute perfusions, 100 μ L of [Pyr]apelin-13 (Bachem, UK), the most active and stable apelin isoform [3, 4], at a concentration of 100nM and 1 μ M, were injected orally or by the intragastric catheter. For *ex vivo* acute perfusions, [Pyr]apelin-13 was injected directly into the survival medium in order to obtain final concentrations from 1pM to 10 μ M.

Apelin receptor (APJ) antagonist. For *in vivo* acute perfusions, 100 μ L of an APJ antagonist, F13A (Polypeptide) [5], at a concentration of 1g/L [6], were administered orally or by the

intra-gastric catheter. F13A was injected alone or with apelin 100nM or 1 μ M. For *ex vivo* acute perfusions, F13A was injected directly in the survival medium in order to obtain final concentration of 1g/L. F13A was injected alone or with apelin 100nM or 1 μ M.

Nitric Oxide Synthase (NOS) inhibitor. For *in vivo* acute perfusions, 2 μ L of NOS inhibitor, L-NG-monomethyl Arginine citrate (L-NMMA, Sigma), at a concentration of 100 μ M were injected directly to the icv catheter completed to 2 μ L of artificial cerebrospinal fluid (aCSF) [2]. The L-NMMA infusion was started 30 min before the apelin oral gavage. For *ex vivo* perfusions, L-NMMA was injected directly in the survival medium in order to obtain final concentration of 100 μ M [2].

Agonist of β -adrenergic receptors. For *in vivo* acute perfusions, 100 μ L of Isoproterenol (Sigma), at a concentration of 0.1 μ M, were administered by the intra-gastric catheter. For *ex vivo* perfusions, Isoproterenol, was injected directly in the survival medium in order to obtain final concentration of 0.1 μ M [7].

Antagonist of nicotinic receptors. For *in vivo* acute perfusions, 100 μ L of Hexamethonium (Sigma), at a concentration of 500 μ M, were administered by the intra-gastric catheter. Hexamethonium was injected alone or with apelin 100nM or 1 μ M. For *ex vivo* perfusions, Hexamethonium, was injected directly in the survival medium in order to obtain final concentration of 500 μ M [8]. Hexamethonium was injected alone or with apelin 100nM.

Capsaicin. Subcutaneous injection at the neck level of Capsaicin (Sigma) was made in two injections: 50mg/kg and 75mg/kg 24h apart under anesthesia, 7 days before the intra-gastric administration of apelin 100nM or control (water). The efficacy of capsaicin pretreatment to ablate sensory nerves was tested just before the sacrifice of the animals, as previously described [9].

Telemetry

Under anesthesia, a needle attached to a catheter was placed in the stomach for intragastric injection (H₂O or drugs including apelin). Two electrodes were sutured 5mm from each other, on the proximal duodenum, 1.5cm caudal to the pylorus. The signal, corresponding to the electrical activity of duodenum, was received by an RMC-1 receiver (DSI) placed under the cage. The signal obtained during 40min of continuous recording was analyzed off-line to obtain the integral of the rectified signal over the 100ms integration interval. The electric signal was allowed to stabilize during 5min. The next 5 minutes were considered as basal signal, and subsequently the mice received H₂O or drugs by intragastric injection of 100μl at a rate of 10μl/min using a syringe pump.

Isotonic contractions

Mice were euthanized in fed conditions. After dissection, duodenum, jejunum and ileum segments were washed in Krebs-Ringer bicarbonate/glucose buffer (pH 7.4) in an atmosphere of 95% O₂ - 5% CO₂. Segments of intestine were then incubated in oxygenated Krebs-Ringer solution for 30 minutes at 37°C and then attached to the isotonic transducer (Lever Transducer, B40 type 373, Hugo Sachs Elektronik) and immersed in Falcon tubes containing 25mL of the same medium maintained at 37°C. The load applied to the lever was 2g (20mN). Isotonic contractions were recorded on BDAS software (Hugo Sachs Elektronik) following the transducer displacement. After attaching of intestine segments, basal contractions were recorded for 10 minutes. Subsequently, 100μL of Krebs-Ringer solution or specific drugs were added in survival medium and contractions were recorded for 10 minutes. Amplitudes were recorded for 10 minutes at 10-second intervals and their average

was compared to the average basal contractions. Contractions amplitudes are presented as percentage relative to the basal response whilst contraction frequencies are presented as number of contraction per minute [7]. For the one-week chronic apelin gavage protocol, basal contractions were recorded for 5 minutes and are presented as average basal contractions.

Immunohistochemistry

Immediately after dissection, duodenal tissues were fixed in 4% formalin solution (Sigma) for 24h and maintained at 4°C in 70% ethanol until paraffin embedding. Ten-micrometer-thin sections were incubated with goat anti-nNOS (1/200, ab1376, Abcam), goat anti-ChAT (1/100, AB144P, Millipore) and rabbit anti-APJ (1/100, ab140508, Abcam) primary antibodies for 12 hours at 4°C. After washing with PBS 1X, sections were incubated with Cyanine 3-labeled anti-Goat (1/50, 395570, Interchim) and Dylight 488-labeled anti-rabbit (1/100, FES062, Interchim) secondary antibodies for 2 hours at 4°C. Sections were washed with PBS 1X and then incubated with DAPI (D8417, Sigma) (1/1000 in PBS 1X) for 1h at 4°C. After a final washing step, sections were mounted with Mounting media (Sigma). Samples were imaged with a Zeiss LSM 710 confocal microscope (Jena, Germany) using the 63X oil objective (NA 1,4).

Transcytosis

Mice were anesthetized with isoflurane. A small longitudinal incision of the abdomen was made and a loop of the duodenum was exposed. The duodenum was clamped below the

pyloric sphincter and another clamp was installed downstream to the first one in order to delineate a chamber of 2cm long. H₂O or Apelin-TAMRA (1μM; Apelin 13 conjugated to the fluorescent dye TAMRA (5-Carboxytetramethylrhodamine) on its N-terminal part was from Proteogenix (Oberhausbergen, France) was then injected inside the duodenal chamber. Apelin-TAMRA is a functional apelin molecule, which is able to bind to the apelin receptor APJ. Five minutes after the injection, duodenal tissues were collected. Duodenal tissues were included in formalin solution (SIGMA) for 24h, then in 20% sucrose solution for 48h and frozen at -80°C in Tissue-Tek (Polyfreeze, Sigma). Ten-micrometer-thin cryostat sections were made. Sections were washed with PBS 1X and then incubated with DAPI (D8417, Sigma) (1/1000 in PBS 1X) for 1h at 4°C. After a final washing step, sections were mounted with Mounting media (Sigma).

Cell culture and fluorescence microscopy

HEK-293T cells were purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) and cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2mM L-glutamine, 100U/ml penicillin and 100μg/ml streptomycin (Gibco, Saint Aubin, France) in a 5%CO₂ humidified incubator at 37°C. For transient transfection, 3x10⁶ cells were seeded in a 100mm dish. 12 hours later, cells were transfected with 1μg of pEYFP-hAPJ using Calcium Phosphate protocol as previously described [10]. The day after, the cells were detached and seeded on fibronectin coated glass slides in 12-well dishes (2x10⁵ cells/well). 48 hours post transfection, cells were stimulated or not with apelin-TAMRA (100nM) for 1 hour at 37°C and then fixed for 15 min. in 4% paraformaldehyde in PBS. Slides were mounted in fluorescent mounting medium

(Dako, Carpinteria, CA, USA) and images were taken using a Zeiss LSM-780 confocal microscope using a 63X objective. Apelin-TAMRA is a functional apelin molecule which is able to bind and activate its receptor APJ (supplementary figure S1).

Acetylcholine release

Mice were euthanized in fed conditions. After dissection, duodenum fragments were washed in Krebs-Ringer bicarbonate/glucose buffer (pH 7.4) in an atmosphere of 95% O₂ - 5% CO₂ and then immersed in Eppendorf tubes containing 400µL of the same medium. After 30 minutes, 300µL of medium were collected and immediately frozen for basal release of acetylcholine quantification. Then 300µL of Krebs-Ringer or drugs were added in Eppendorf tubes containing duodenum fragments. After 30 minutes, 300µL of medium were collected and immediately frozen for acetylcholine release quantification. Acetylcholine release was measured with commercially available ELISA kit (Abcam).

Oral glucose tolerance test (OGTT)

Six-hour-fasted mice were orally loaded with glucose (3g/kg of body weight). Blood was collected from the tail vein at -30, 0, 15, 30, 60, 90, and 120min and glycemia measured with a gluco-meter (Accu-Chek Active, Roche) [1].

Insulin assay

Serum insulin was measured using an ultra-sensitive mouse insulin ELISA (Merckodia).

Apelin assay

For *in vivo* experiments, six-hour-fasted mice were orally loaded with glucose (3g/kg of body weight) alone or with drugs. Mice were euthanized 5 minutes after this oral gavage and duodenum, jejunum and ileum were harvested and immediately frozen for subsequent apelin quantification studies. For *ex vivo* experiments, two-hour fasted mice were euthanized. The duodenum was then harvested, washed, everted, and filled with in a Krebs-Ringer solution without glucose. Everted duodenal sacs were incubated in Krebs-Ringer with 10g/L of glucose alone or with drugs, for 2 minutes at 37°C. Tissues were then collected and immediately frozen for subsequent apelin quantification studies. Apelin was measured with a commercially available ELISA kit (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA).

Glucose and apelin absorption

Two-hour fasted mice were euthanized. The duodenum was then harvested, washed, everted, and filled with in a Krebs-Ringer solution without glucose. Everted duodenal sacs were incubated in Krebs-Ringer with 10g/L of glucose alone or with drugs, for 2 minutes at 37°C. The media of each sac and was then collected and immediately frozen for subsequent apelin and glucose quantification studies. For portal vein experiments, mice were euthanized 10 minutes after an oral gavage of H₂O or drugs. Blood was harvested from the portal vein. Serum was then collected and immediately frozen for subsequent apelin quantification studies. Apelin was measured with a commercially available ELISA kit (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA). Glucose was measured using glucose RTU™ kit (bioMérieux).

Glucose utilization

Two-hours-fasted mice were orally loaded with 50 μ L of [3-³H]glucose (Perkin Elmer) and 100 μ L of H₂O or drugs. Thirty minutes after the oral load, mice were euthanized and blood, liver, muscle and adipose tissue were collected, precisely weighed and immediately frozen. Tissues were dissociated in NaOH 1M (50, 200 and 200 μ L for muscle, liver and adipose tissue respectively) during 1 hour at 55°C. Samples were centrifuged at 7000g during 5 minutes. Fifty μ L were taken from supernatant and added to 3mL of Emulsifier-Safe™ (Perkin-Elmer). The radioactivity was counted as dpm. Data are presented according to following formula $\text{Log}_{10}(\text{dpm/g tissue})$.

Metabolic parameters

Insulin resistance index was determined by multiplying the area under the curve (-30 min and 15 min) of both blood glucose and plasma insulin obtained after an OGTT as previously described [11]. Homeostasis model assessment insulin resistance (HOMA-IR) was determined by using the following adjusted formula: $\text{HOMA-IR} = \text{fasting Glucose (mmol/L)} \times \text{fasting Insulin (mU/L)} / 22.5$.

qPCR

Total RNAs were extracted from muscle using the RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Total RNA (500 ng) was reverse transcribed for 60 min at 37°C using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, St Aubin, France) in the presence of random hexamers. Real-time PCR was performed on 12.5 ng cDNA and 100–900 nmol/l specific oligonucleotides

primers in a final volume of 20 µl using the Mesa blue qPCR Master Mix for Sybr (Eurogentec, Angers, France). Fluorescence was monitored and analysed in a StepOnePlus Real-Time PCR system instrument (Applied Biosystems, St Aubin, France). Beta2microglobulin RNA was used to normalize gene expression according to the following formula $2^{-(Ct_{\text{Beta2microglobulin}} - Ct_{\text{gene}})}$ where Ct corresponds to the number of cycles needed to generate a fluorescent signal above a predefined threshold. Sequences of the oligonucleotides primers are : Apelin sense 5'- GTTTGTGGAGTGCCACTG -3' and antisense 5'- CGAAGTTCTGGGCTTCAC -3' ; APJ sense 5'- GCTGTGCCTGTCATGGTGTT -3' and antisense 5'- CACTGGATCTTGGTGCCATTT -3' ; GLUT-4 sense 5'- CCGGATTCCATCCCACAAG -3' and antisense 5'- CATGCCACCCACAGAGAAGA -3' ; Beta2microglobulin sense 5'- CACTGACCGGCCTGTATGC -3' and antisense 5'- GGGTGGCGTGAGTATACTTGAATT -3'.

Bibliography associated to supplementary methods

- 1 Knauf C, Cani PD, Ait-Belgnaoui A, Benani A, Dray C, Cabou C, *et al.* Brain glucagon-like peptide 1 signaling controls the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and reduces energy expenditure. *Endocrinology* 2008;149:4768-77.
- 2 Duparc T, Colom A, Cani PD, Massaly N, Rastrelli S, Drougard A, *et al.* Central apelin controls glucose homeostasis via a nitric oxide-dependent pathway in mice. *Antioxid Redox Signal* 2011;15:1477-96.
- 3 Dray C, Knauf C, Daviaud D, Waget A, Boucher J, Buleon M, *et al.* Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 2008;8:437-45.
- 4 Dray C, Sakar Y, Vinel C, Daviaud D, Masri B, Garrigues L, *et al.* The intestinal glucose-apelin cycle controls carbohydrate absorption in mice. *Gastroenterology* 2013;144:771-80.
- 5 Lee DK, Saldivia VR, Nguyen T, Cheng R, George SR, O'Dowd BF. Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action. *Endocrinology* 2005;146:231-6.
- 6 Drougard A, Duparc T, Brenachot X, Carneiro L, Gouaze A, Fournel A, *et al.* Hypothalamic apelin/reactive oxygen species signaling controls hepatic glucose metabolism in the onset of diabetes. *Antioxid Redox Signal* 2014;20:557-73.

- 7 Zizzo MG, Mule F, Serio R. Duodenal contractile activity in dystrophic (mdx) mice: reduction of nitric oxide influence. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 2003;15:559-65.
- 8 Spencer NJ, Bywater RA, Klemm MF. Effects of sympathetic nerve stimulation on membrane potential in the circular muscle layer of mouse distal colon. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 1998;10:543-52.
- 9 Steinhoff M, Vergnolle N, Young SH, Tognetto M, Amadesi S, Ennes HS, *et al.* Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med* 2000;6:151-8.
- 10 Masri B, Salahpour A, Didriksen M, Ghisi V, Beaulieu JM, Gainetdinov RR, *et al.* Antagonism of dopamine D2 receptor/beta-arrestin 2 interaction is a common property of clinically effective antipsychotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:13656-61.
- 11 Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, *et al.* Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:9066-71.

III- Discussion et perspectives

Ainsi, l'ensemble de ce travail a permis de mettre en évidence un nouveau mode de communication entre l'intestin et le cerveau dans le contrôle de l'homéostasie glucidique. En effet, nous avons pu montrer que moduler les contractions duodénales en modifiant l'activité du SNE permettait non seulement d'impacter l'absorption intestinale de glucose, mais également d'activer un axe duodénum-hypothalamus aboutissant au contrôle de l'utilisation périphérique de glucose. Dès lors, ce couplage « SNE-contraction duodénale » représente une cible thérapeutique prometteuse dans le traitement de maladies métaboliques telles que le DT2.

1) Apeline et SNE

Lors de ce travail, les premiers résultats obtenus nous ont permis de démontrer que l'apeline pouvait moduler l'activité du couplage SNE/contractions duodénales chez des souris saines. En effet, l'étude de la contractilité duodénale en termes d'activité contractile avec un capteur isotonique (*ex vivo*), et d'activité électrique par télémetrie (*in vivo*) montre qu'en fonction de sa concentration, l'apeline exerce un effet opposé sur cette contractilité duodénale. A savoir que l'apeline à 100 nM provoque une stimulation de l'activité mécanique et électrique duodénale, alors qu'en revanche, l'apeline à 1 µM entraîne une diminution de l'activité électrique duodénale permettant de restaurer l'activité contractile à un niveau basal. L'ensemble de ces résultats sont spécifiques de l'apeline, puisqu'ils sont bloqués par le F13A, un antagoniste du récepteur APJ de l'apeline [378]. Par ailleurs, ces effets de l'apeline sont restreints au duodénum, étant donné que cette dernière n'impacte pas la motricité du jéjunum et de l'iléon.

Concernant la cible cellulaire de l'apeline dans l'intestin, nos résultats d'immunohistochimie, montrent que les 2 populations neuronales majeures du SNE, les neurones stimulateurs à ChAT et les neurones inhibiteurs à nNOS [122], expriment le récepteur APJ à l'apeline. Afin de s'assurer que l'apeline luminale soit capable d'atteindre les plexi neuronaux entériques pour se lier à son récepteur présent à ce niveau, nous avons utilisé de l'apeline-TAMRA, une apeline fonctionnelle couplée à un fluorochrome rouge capable de se lier au récepteur à l'apeline APJ. Nous avons observé que l'apeline-TAMRA injectée dans la lumière, traverse les différentes structures intestinales pour atteindre les neurones du SNE. Cette expérience suggère ainsi, qu'au même titre que d'autres protéines telles que la leptine [379] ou l'insuline [380], l'apeline luminale peut se lier à son récepteur présent sur les neurones entériques *via* un phénomène de transcytose. D'un point de vue moléculaire, l'effet stimulateur *versus* inhibiteur de l'apeline sur l'activité contractile duodénale en

fonction de sa concentration, suggère l'implication de 2 voies de signalisation différentes. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons mesuré la libération d'acétylcholine et de NO sur des fragments de duodénums *ex vivo*. L'apeline, qu'elle soit à 100 nM ou à 1 μ M, stimule la libération d'acétylcholine. Cependant, seule l'apeline à 1 μ M stimule également la libération de NO, contrebalançant ainsi son potentiel effet stimulateur sur la contractilité duodénale. Dès lors, ces résultats expliquent pourquoi l'apeline 1 μ M permet un retour des contractions duodénales à un niveau basal. Nous ne pouvons pas totalement exclure le fait que l'apeline à 1 μ M puisse exercer une désensibilisation du récepteur APJ, expliquant ses effets similaires aux effets contrôles. Cependant, cette dernière observation montrant une augmentation de la libération de NO en réponse à l'apeline à 1 μ M mais pas à 100 nM, renforce l'existence de 2 acteurs moléculaires différents bloquant et stimulant respectivement les contractions duodénales. Par ailleurs, l'apeline circulante est maintenant bien reconnue en tant qu'acteur moléculaire majeur impliqué dans le contrôle du métabolisme glucidique, *via* une action directe sur les tissus périphériques (tissu adipeux, muscle, intestin) [357, 358, 363], mais également en agissant sur l'activité de neurones hypothalamiques [302, 371]. Dans cette étude, nous montrons un effet opposé de l'apeline sur le SNE *via* le recrutement de 2 acteurs moléculaires différents, l'acétylcholine ou le NO. Ce double effet de l'apeline en fonction de sa concentration est comparable à celui précédemment observé dans le SNC. En effet, notre groupe a précédemment démontré que de faibles concentrations d'apeline injectées en icv amélioraient la glycémie d'animaux nourris *via* une libération de NO hypothalamique [302]. A l'inverse, l'injection icv de forts taux d'apeline, similaires à ceux retrouvés dans l'hypothalamus d'animaux obèses/diabétiques, à une souris normale, entraînent une hyperglycémie et une hyperinsulinémie à jeun, 2 caractéristiques d'un DT2 [302, 371]. Notre équipe a également montré que cette dose d'apeline n'impliquait par la libération de NO, mais agissait *via* une production d'H₂O₂ hypothalamique [371]. Dans le duodénum, nous observons également un effet opposé de l'apeline sur la libération de NO, renforçant le fait que le recrutement des neurones à nNOS en réponse à cette molécule, serait dépendant de la dose injectée.

L'ensemble de ces résultats, à savoir la présence d'APJ sur les neurones du SNE et la libération de leurs neurotransmetteurs en réponse à l'apeline, suggèrent ainsi une action directe de l'apeline sur ces neurones. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'ajout d'hexaméthonium, un antagoniste des récepteurs nicotiques bloquant l'influx excitateurs entre les neurones entériques [381], en présence d'apeline, bloque l'effet stimulateur de cette dernière sur les contractions duodénales *ex vivo*. Cependant, un effet direct de l'apeline sur les muscles lisses intestinaux ne peut pas être totalement exclu étant donné que le récepteur APJ est présent au niveau des 2 couches musculaires lisses de la paroi intestinale [372]. Néanmoins, compte tenu des résultats précédents obtenus avec l'hexaméthonium, cet effet direct potentiel de l'apeline serait

minoritaire par rapport à l'effet sur le SNE. Un moyen de répondre à cette hypothèse serait d'utiliser des cellules musculaires lisses intestinales en culture, et de déterminer leur capacité à se contracter en réponse à l'ajout d'apeline [382].

2) Contractions duodénales et homéostasie glucidique

a) *Absorption intestinale de glucose*

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés aux conséquences de cette modification d'activité contractile duodénale, engendrée par l'apeline, sur l'absorption intestinale de glucose. L'essentiel de l'absorption des monosaccharides s'opère dans le duodénum et dans la partie proximale du jéjunum [205-207]. De plus, notre équipe avait précédemment démontré que le glucose amplifiait son propre transport de la lumière intestinale vers la circulation sanguine, en augmentant la sécrétion luminale d'apeline au niveau du duodénum et du jéjunum. En effet, dans la même étude, il a été montré que dans la lumière intestinale, l'apeline régulaient les flux de carbohydrates à travers les entérocytes *via* une augmentation de la translocation du transporteur GLUT-2 sur la bordure en brosse [363]. Par ailleurs, des études précédentes ont démontré que la stimulation de la motilité intestinale était associée avec une augmentation de l'absorption intestinale de glucose. Nos résultats montrent que la stimulation de la contractilité duodénale par l'apeline à 100 nM est associée à une augmentation de l'absorption duodénale de glucose. A l'inverse, l'apeline à 1 μ M, qui restaurait cette contractilité duodénale à des niveaux contrôles, rétablit cette absorption duodénale de glucose. Dès lors, l'ensemble de ces résultats suggèrent que l'apeline impacterait l'entrée de glucose dans l'organisme en agissant non seulement sur la translocation de GLUT-2 à la membrane apicale des entérocytes, ainsi que sur la motilité duodénale. Cette hypothèse devra être vérifiée en évaluant cette potentielle translocation de GLUT-2 dans notre modèle, ainsi qu'en mesurant l'absorption duodénale de glucose en réponse à nos 2 concentrations d'apeline (inhibant et stimulant les contractions duodénales) en présence d'un inhibiteur de ce transporteur tel que la cytochalasine B.

L'absorption intestinale de glucose fait intervenir 2 transporteurs, GLUT-2 que nous venons de mentionner qui permet la diffusion facilitée du glucose, et SGLT-1 qui assure son transport actif. Concernant l'implication de SGLT-1 dans notre modèle, l'équipe a précédemment démontré que l'apeline provoquait une diminution de l'expression de ce transporteur au niveau de la bordure en brosse, au profit de la translocation de GLUT-2 à ce niveau [363]. SGLT-1 étant rapidement saturable pour des concentrations de glucose de 30 à 50 mM, la translocation de GLUT-2 à la membrane

apicale de l'entérocyte permettrait la diffusion facilitée du glucose à l'intérieur de celui-ci et donc une potentialisation de son absorption intestinale [199, 200, 363]. Cependant, rien ne nous empêche d'exclure une potentielle implication de SGLT-1 dans l'absorption de glucose provoquée par la stimulation des contractions duodénales dans notre modèle expérimental. En effet, très récemment, il a été démontré le rôle de ce transporteur dans les effets métaboliques bénéfiques observés lors d'un *bypass* gastrique dit Roux-en Y, une stratégie thérapeutique associant une restriction gastrique et un système de dérivation du duodénum et la partie proximale du jéjunum du circuit alimentaire, permettant de réduire l'absorption des nutriments. Dans cette étude, les auteurs ont pu montrer que cette chirurgie bariatrique entraînait une dérivation de la bile, provoquant ainsi une diminution de l'absorption de glucose SGLT-1 dépendante dans la partie restante du tube digestif [383]. Dès lors, l'implication de SGLT-1 dans l'augmentation de l'absorption du glucose observée dans notre modèle, suite à une stimulation des contractions duodénales, devra également être identifiée. Pour cela, les expériences mesurant l'absorption duodénale de glucose en réponse à nos 2 concentrations d'apeline (inhibant et stimulant les contractions duodénales) devront être reproduites en présence de phloridzine, un inhibiteur de ce transporteur.

b) Axe intestin-hypothalamus-utilisation périphérique de glucose

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'effet de cette modification d'activité contractile duodénale engendrée par l'apeline, sur la libération de NO hypothalamique. L'axe intestin-hypothalamus et son implication dans le contrôle du métabolisme glucidique a été démontrée *in vivo* par notre équipe. A savoir qu'une injection de glucose dans le tractus digestif, à une dose stimulant uniquement les senseurs entériques au glucose (sans augmenter la glycémie périphérique), augmente l'utilisation du glucose musculaire [300] *via* une libération de NO hypothalamique [301]. Nos résultats montrent que l'effet de l'apeline dans le tube digestif va également impacter la libération de NO au niveau hypothalamique. En effet, la mesure *in vivo* de la libération hypothalamique de NO nous a permis de montrer une diminution de la sécrétion de ce gaz en réponse à une perfusion d'apeline à 100 nM (qui stimulait les contractions duodénales) dans le tube digestif. Cette libération de NO hypothalamique étant restaurée suite à la perfusion *ig* d'apeline à 1 μ M (qui entraînait un retour des contractions duodénales à un niveau basal). Nos résultats suggèrent également que cette communication entre le duodénum et l'hypothalamus s'établirait *via* un message nerveux afférent puisque ces effets sont perdus suite à un traitement à la capsaïcine (un neurotoxique qui inactive sélectivement les fibres afférentes du SNA).

Le NO étant un acteur moléculaire clef impliqué dans la régulation centrale de l'homéostasie glucidique, cette modulation de libération de NO hypothalamique par l'apeline duodénale suggère également une modification de l'utilisation périphérique de glucose. A titre d'exemple, il a déjà été démontré que le fait de bloquer les NO synthases au niveau central entraînait des perturbations périphériques telles qu'une hyperglycémie et une insulino-résistance [139]. De plus, l'association entre le NO central et l'utilisation périphérique de glucose avait déjà été démontrée dans la littérature puisqu'une augmentation de la libération de NO hypothalamique stimule les flux vasculaires périphériques, entraînant une entrée de glucose dans le muscle [123]. Effectivement, nous montrons qu'une charge orale de glucose et d'apeline à 100 nM, qui augmentait les contractions intestinales et diminuait la libération de NO hypothalamique, entraîne une moindre entrée de glucose dans le muscle. En revanche, tous ces paramètres sont restaurés suite à une charge orale d'apeline à 1 μ M. De plus, nos résultats nous permettent de renforcer l'hypothèse d'un relai hypothalamique dans cet effet de l'apeline duodénale sur l'utilisation musculaire de glucose. Premièrement, nous avons mesuré l'absorption intestinale d'apeline après sa perfusion dans la lumière intestinale *ex vivo*, ainsi que son passage dans la veine porte après un gavage oral *in vivo*. Nos résultats n'ont montré aucune variation de l'absorption intestinale d'apeline, avec cependant une augmentation significative de ses taux dans la paroi intestinale des fragments de duodénum traités par cette molécule. De plus, dans des conditions *in vivo*, une charge orale d'apeline ne modifie pas sa concentration dans la veine porte. Dès lors, ces résultats renforcent le concept d'une action spécifique de l'apeline au niveau du SNE contenu dans la paroi intestinale, au détriment d'une action directe de cette molécule sur le muscle. Deuxièmement, une perfusion icv de L-NMMA (un inhibiteur des NOS) bloquant ainsi la libération de NO central [302], diminue l'entrée de glucose au niveau musculaire en réponse à un traitement oral à l'apeline. Ce résultat montre ainsi le rôle clef du NO central dans les effets de l'apeline duodénale sur l'utilisation du glucose par le muscle. Dès lors, l'ensemble de ces observations laissent à penser que des modifications de la contractilité intestinale (sous le contrôle du SNE) puissent être détectées par mécanodétection, et soient à l'origine d'un message nerveux afférent jusqu'à l'hypothalamus participant au même titre que la chémodétection glucidique, au contrôle du métabolisme glucidique.

Néanmoins, les mécanorécepteurs impliqués dans ce mécanisme de régulation restent à être identifiés. Comme nous l'avons mentionné au cours de l'introduction de ce manuscrit, le SNE contrôle de façon autonome l'activité des muscles intestinaux. Ceci est notamment possible grâce à l'existence de neurones entériques mécanosensitifs appelés MEN (pour Mechanosensitive Enteric Neurons), et à leur capacité à répondre à des déformations mécaniques de la paroi GI [384, 385]. Ces MEN répondent en particulier à des forces de compression ou de stretch, et selon la région intestinale, représentent jusqu'à 15-25% des neurones contenus dans le SNE [385]. Ces neurones

mécanosensitifs peuvent non seulement servir d'interneurones avec d'autres MEN, mais aussi avec des motoneurones [384, 385]. Ainsi, ces neurones mécanosensitifs peuvent à la fois détecter et contrôler l'activité des muscles lisses intestinaux. A l'heure actuelle, les mécanismes de cette mécanodétection, en terme de récepteurs et /ou canaux ioniques impliqués, restent peu clairs. Une des perspectives de ce travail est donc de déterminer si APJ, le récepteur à l'apeline, puisse être responsable de la mécanodétection décrite dans notre modèle expérimental. A ce titre, en 2012, une équipe a montré que le récepteur APJ à l'apeline pouvait agir en tant que mécanorécepteur au niveau cardiaque [386]. En effet des cardiomyocytes isolés déficients pour APJ sont moins sensibles au stretch que des cardiomyocytes sauvages. De plus, dans la même étude, les auteurs montrent que l'apeline, en se liant sur APJ, entraîne une réduction de l'hypertrophie cardiaque *via* l'activation de la protéine $G\alpha_i$, alors que le stretch va provoquer une hypertrophie cardiaque, *via* une voie APJ dépendante mais $G\alpha_i$ indépendante. Dès lors, ces résultats indiquent qu'APJ est un récepteur bifonctionnel capable d'intégrer à la fois des stimuli provenant de l'apeline endogène et du stretch mécanique, et d'y répondre par des voies de signalisations différentes. Ainsi, dans notre modèle expérimental, nous pouvons émettre l'hypothèse suivante : dans un premier temps, APJ présent sur les neurones entériques pourrait répondre à l'apeline que nous apportons par voie orale en entraînant une modification de la libération de NO et d'acétylcholine par ces neurones, le tout aboutissant à une modification de la contractilité duodénale. Dans un deuxième temps, cette modification d'activité mécanique duodénale pourrait, à son tour, être perçue par APJ en tant que mécanorécepteur, et être à l'origine du phénomène de mécanodétection observée dans notre axe de régulation. Cependant, cette hypothèse doit être vérifiée. Tout d'abord, il serait important d'identifier si les neurones entériques exprimant APJ font partis des MEN, en mesurant leurs réponses à des stimuli mécaniques, par mesure des flux calciques ou par électrophysiologie. Par la suite, l'utilisation de modèles KO pour l'apeline et pour son récepteur APJ, nous permettrait non seulement d'évaluer l'impact de ces 2 acteurs sur notre axe de régulation, mais aussi de déterminer si APJ peut également être considéré comme un mécanorécepteur au niveau intestinal.

c) Physiologie intégrée (Figure 27)

Compte tenu de l'ensemble de ces résultats, nous proposons l'hypothèse suivante. Au début du repas, l'apeline duodénale libérée par l'entérocyte en réponse au glucose favoriserait l'absorption du glucose *via* 2 mécanismes complémentaires, un mécanique (effet sur la motilité duodénale) et un pharmacologique (effet sur la translocation des transporteurs GLUT-2 à membrane apicale des entérocytes). Cet effet stimulateur de la contractilité duodénale entraîne une diminution de la

libération de NO hypothalamique aboutissant à une moindre utilisation de glucose par le muscle. Ainsi, dans un premier temps l'apeline permettrait de faciliter l'absorption intestinale de glucose, au détriment de son utilisation, dans le but d'éviter une potentielle hypoglycémie. Dans un second temps, notre équipe a montré une augmentation de la sécrétion d'apeline dans la lumière duodénale et jéjunale en réponse au glucose, suggérant une augmentation de ses taux intestinaux au cours du repas [363]. Dès lors, à la fin du repas, ces forts taux d'apeline permettraient de cibler les neurones à nNOS pour diminuer les contractions duodénales, et ainsi (1) stopper l'absorption intestinale de glucose afin de limiter l'hyperglycémie postprandiale, et (2) restaurer la libération de NO hypothalamique et la captation musculaire de glucose afin de préparer l'organisme à la période de jeûne inter-digestive qui arrive. De plus, notre équipe a également démontré que dans une période plus avancée des processus digestifs, les taux d'apeline circulants augmentaient de façon plus importante [302]. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que l'effet duodéal de l'apeline puisse être couplé à un effet direct de cette molécule sur le muscle pour y stimuler l'entrée de glucose.

Une telle régulation de l'homéostasie glucidique durant la digestion impliquant l'axe intestin-cerveau a déjà été clairement démontrée, mais suite à un phénomène de « glucosensing » intestinal. En effet, notre groupe a précédemment montré qu'au début d'un repas, la détection de glucose par l'intestin impactait le pancréas en provoquant une libération d'insuline, ainsi que les muscles squelettiques, en vue de les préparer à capter le glucose circulant, *via* un relai central [300]. A la fin du repas, c'est-à-dire en condition d'hyperglycémie postprandiale, se rajoute à la détection entérique de glucose, une détection directe de cette molécule par le cerveau [299]. En conséquence, un signal opposé à ceux déclenchés par les senseurs entériques au glucose sera envoyé aux muscles, aboutissant à une insulino-résistance musculaire transitoire. Ce mécanisme permettra alors de rediriger le glucose vers le foie afin de permettre sa mise en réserve sous forme de glycogène, et ainsi préparer la période de jeûne entre 2 repas. Tous ces effets impliquent une voie de signalisation dépendante du GLP-1 à la fois intestinal et hypothalamique. En effet, le GLP-1, tout comme l'apeline, est une hormone GI également présente dans le cerveau où elle joue un rôle important de neurotransmetteur. Dès lors, l'ensemble de ces résultats impliquant ces phénomènes de chémodétection et mécanodétection intestinales, mettent en lumière l'importance de l'axe intestin-cerveau-périphérie dans le contrôle du métabolisme glucidique dans des conditions physiologiques.

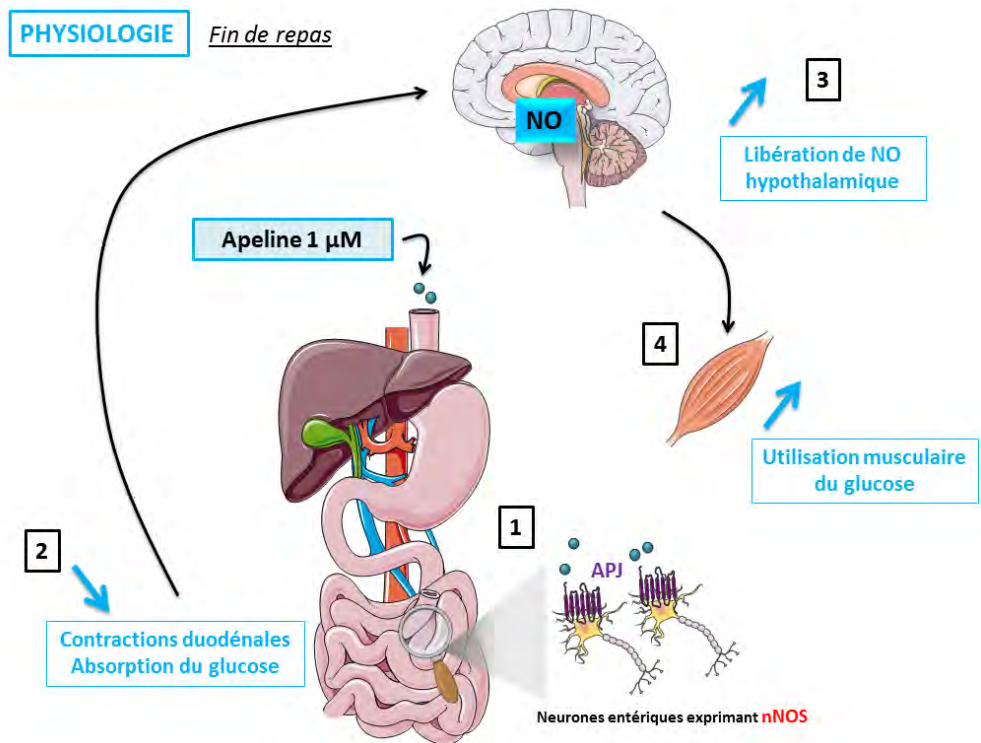
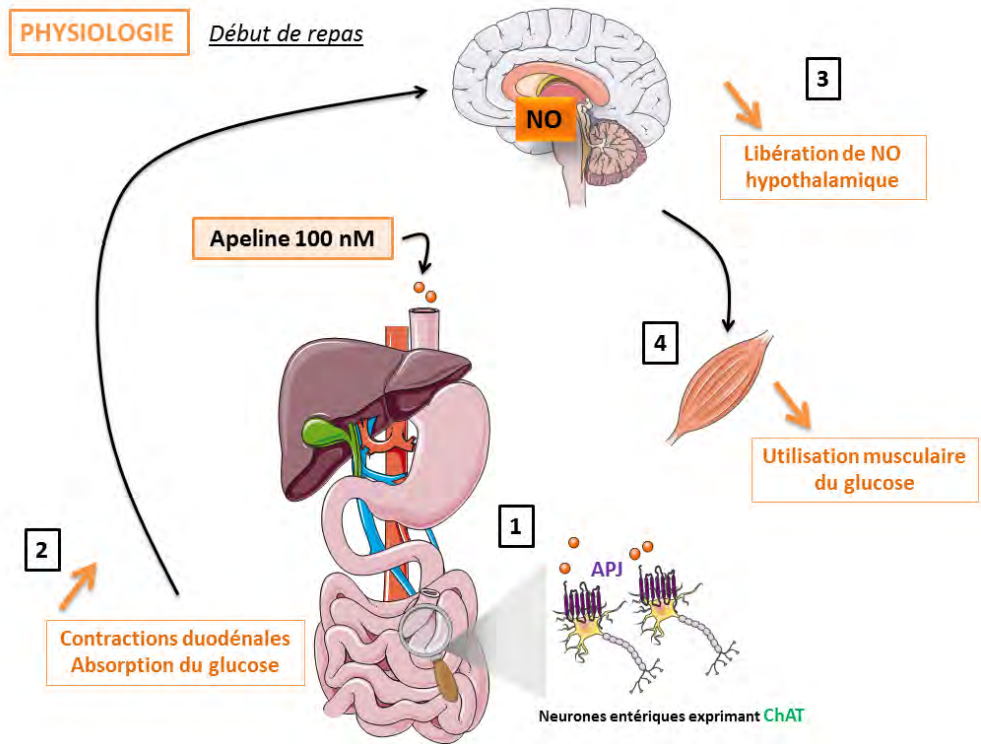


Figure 27 : Schéma récapitulatif de l'effet de l'apeline sur l'axe intestin-cerveau-périphérie.

3) Diabète de Type 2

Comme nous venons de le voir, la détection entérique de glucose est cruciale pour le maintien de l'homéostasie glucidique. Et effectivement, notre groupe a précédemment démontré qu'une altération de ce « glucosensing » intestinal participait à la mise en place de l'insulino-résistance caractérisant les souris obèse-diabétiques [300, 301]. Dès lors, au même titre que cette chémodétection défectueuse, la mécanodétection pourrait également être altérée dans des modèles animaux de DT2. A ce titre, dans le cadre de cette pathologie, il a été montré une atteinte du SNE, en particulier une dégénérescence des neurones à nNOS, conduisant à une hypercontractilité intestinale [122]. Ce trouble de la motilité intestinale étant observé à la fois chez des rongeurs, mais aussi chez des patients diabétiques de type 2. Cette hypercontractilité intestinale pourrait, premièrement, favoriser une absorption massive du glucose participant ainsi à l'hyperglycémie postprandiale observée chez les souris obèses/diabétiques. Deuxièmement, en accord avec nos résultats, elle pourrait être à l'origine d'un message aberrant jusqu'à l'hypothalamus, et serait ainsi responsable d'une captation musculaire de glucose défectueuse participant, elle aussi, à une élévation de la glycémie.

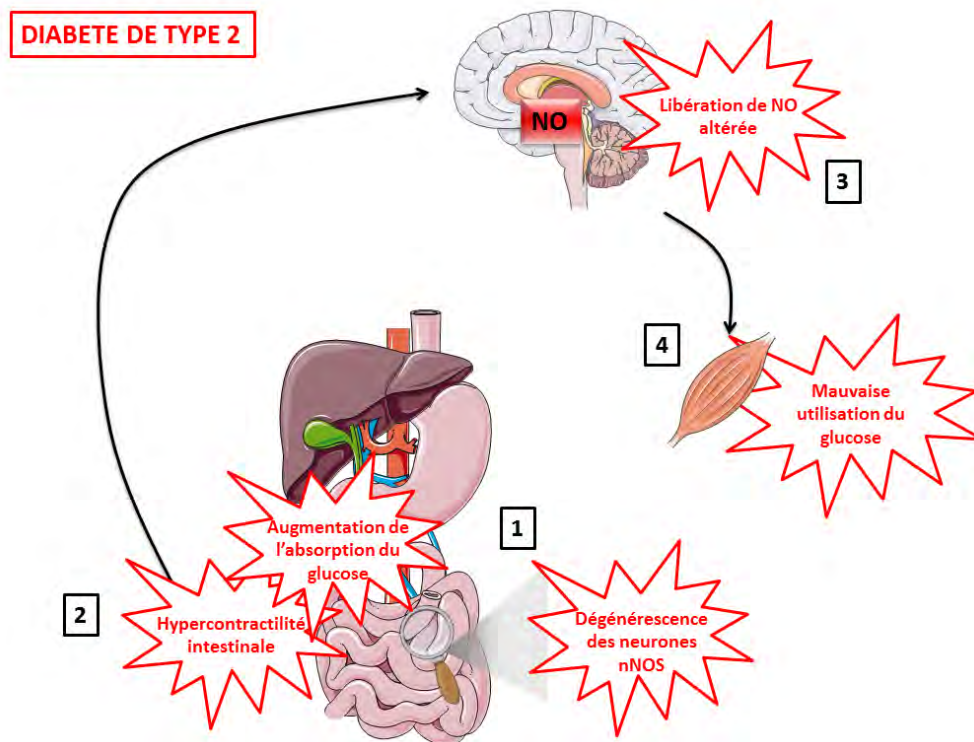


Figure 28 : Schéma récapitulatif des altérations observées sur l'axe intestin-cerveau-périphérie dans le cadre d'un Diabète de Type 2.

Par ailleurs, dans un contexte physiopathologique de DT2, il est également observé une augmentation des taux d'apeline au niveau plasmatique [302, 344] et au niveau central [340]. Comme nous l'avons mentionné, au niveau neuronal, ces forts taux d'apeline sont à l'origine d'effets délétères sur l'homéostasie glucidique *via* l'activation d'une voie d' H_2O_2 dépendante [302, 371]. Ainsi, il n'y a pas de résistance centrale à l'action de l'apeline au cours des maladies métaboliques, et nos précédents travaux suggèrent que les neurones répondent toujours à l'apeline mais avec des voies de signalisations différentes. De plus, au niveau périphérique, une injection aigue d'apeline à des souris obèses et diabétiques, conserve sa capacité à améliorer la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline [357].

Dès lors, l'ensemble de ces observations suggèrent que cibler les neurones du SNE par l'apeline, pour diminuer les contractions intestinales chez des animaux rendus obèses et diabétiques, pourrait améliorer leur statut métabolique *via* notre axe de régulation. Nos résultats permettent de supporter cette hypothèse puisque nous avons pu montrer que le traitement chronique de souris HFD par des fortes concentrations d'apeline permettait, non seulement de restaurer leur contractilité duodénale au même niveau que celle de souris saines, mais aussi d'améliorer leur tolérance au glucose ainsi que leur index de résistance à l'insuline. De plus, nous observons également une augmentation de l'expression de l'apeline, en termes d'ARNm, spécifiquement dans le duodénum des souris HFD. Ces résultats doivent tout d'abord être confirmés par un dosage ELISA afin de nous assurer que ces taux d'apeline soient bien augmentés chez les animaux HFD, au même titre que les taux plasmatiques [302, 344] et centraux [340]. Cependant, ils nous permettent tout de même d'émettre la même hypothèse qui avait été formulée concernant l'augmentation des taux circulants d'apeline chez les animaux [357]. A savoir que cette augmentation de l'expression de l'apeline chez les souris HFD, agirait comme un moyen de défense pour essayer de retarder l'apparition de l'insulino-résistance caractéristique du DT2. Cependant, dans des stades avancés de la pathologie, l'apeline endogène ne serait pas suffisante pour lutter contre cette insulino-résistance, expliquant la nécessité d'une charge orale d'apeline exogène pour l'amélioration du statut diabétique de ces souris.

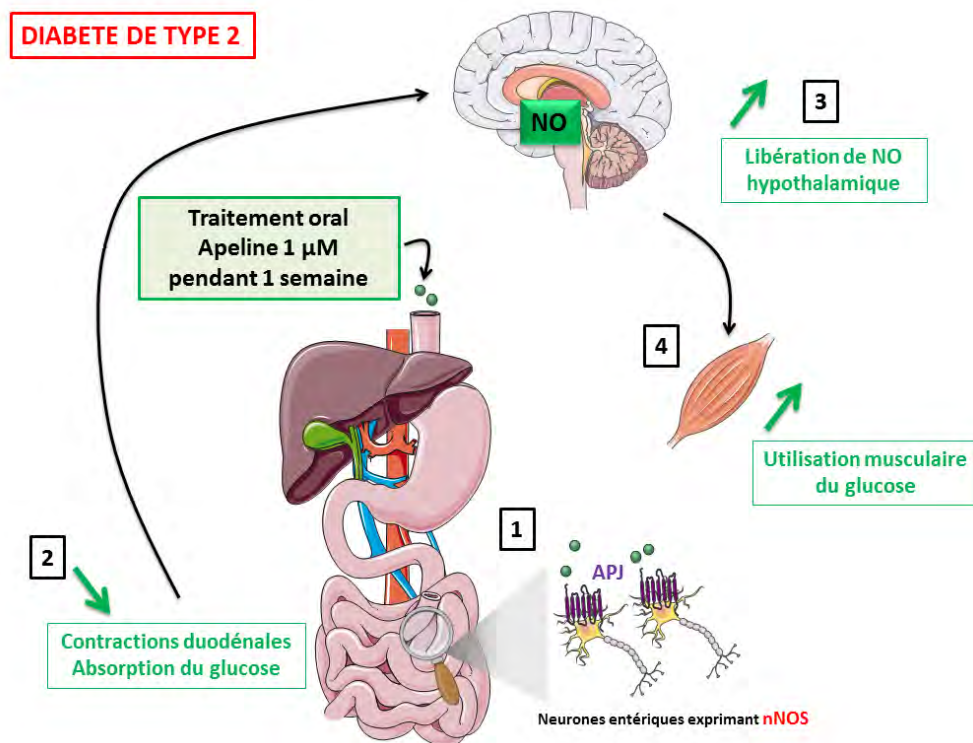


Figure 29 : Schéma récapitulatif des effets thérapeutiques d'un traitement oral par l'apeline 1 µM sur l'axe intestin-cerveau-périphérie lors d'un Diabète de Type 2.

4) Perspectives

Face à l'expansion du DT2, les traitements proposés aujourd'hui restent insuffisants, et leur administration est souvent accompagnée d'effets secondaires indésirables. Dans la perspective de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques, l'intestin a pris depuis une dizaine d'années, de plus en plus d'importance dans le traitement de cette pathologie. En effet, parmi les stratégies thérapeutiques existantes visant la sphère digestive, on retrouve les inhibiteurs des alpha-glucosidases intestinales et les chirurgies bariatriques visant à diminuer l'absorption intestinale de glucose, ainsi que les analogues du GLP-1 permettant une stimulation de la sécrétion d'insuline entraînant notamment, une augmentation de l'entrée de glucose dans le muscle. Dans notre travail, nous avons pu montrer que moduler les contractions duodénales, en modifiant l'activité du SNE par un traitement oral à l'apeline, permettait également d'impacter l'absorption intestinale de glucose. Néanmoins, l'avantage de cette stratégie thérapeutique est qu'elle ne nécessite pas d'intervention chirurgicale et comporte ainsi beaucoup moins de risque de complications comparativement à un bypass gastrique. De plus, nous avons pu montrer que cibler le couple « SNE-contractions duodénales » permettait également d'activer un axe duodénum-hypothalamus aboutissant au

contrôle de l'utilisation musculaire de glucose. Ainsi, comparativement aux stratégies thérapeutiques déjà existantes qui jouent soit sur le versant entrée du glucose dans l'organisme, soit sur le versant stockage par les tissus périphériques, notre axe de régulation va lui impacter les 2 versants *via* un relai central, constituant ainsi une approche thérapeutique innovante dans le traitement du DT2.

Une autre originalité de nos résultats est qu'ils sont spécifiques du duodénum. En effet, les antidiabétiques oraux les plus couramment utilisés visent à cibler le GLP-1 libéré au niveau de l'iléon. Or, le duodénum représente le premier site de détection des nutriments, et est maintenant considéré, tout comme le jéjunum [387], en tant que future cible pour améliorer le statut métabolique dans le cadre d'un DT2 [388]. Dans cette pathologie, comme nous l'avons détaillé dans l'introduction de ce manuscrit, cette détection entérique des nutriments est totalement altérée [388]. De plus, nous avons montré que le traitement chronique de souris HFD par de fortes concentrations d'apeline permettait de restaurer leur contractilité duodénale au même niveau que celle des souris saines, mais aussi d'améliorer leur statut diabétique. Dès lors, nous pouvons supposer que cette modulation des contractions intestinales par l'apeline, pourrait compenser ce défaut de détection intestinale des nutriments observée lors d'un DT2. En accord avec cette hypothèse, Sandoval et al. ont montré que la stimulation mécanique du duodénum provoquait la sécrétion de GLP-1 [389]. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que la modulation des contractions duodénales par l'apeline pourrait, en plus de provoquer des signaux nerveux afférents décrits dans ce travail, entraîner des signaux de nature hormonale. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de mesurer les taux de GLP-1 dans la veine porte suite à un gavage oral d'apeline. S'il s'avère que l'apeline, en modifiant les contractions duodénales, soit capable de libérer du GLP-1, des expériences utilisant un antagoniste de son récepteur (telle que l'exendine 9) devront être faites afin de déterminer la part de cette hormone dans l'activation de notre axe de régulation.

Ainsi, l'ensemble de ces observations suggèrent qu'une administration orale d'apeline pourrait être considérée comme une thérapeutique prometteuse dans le traitement du DT2. Cependant, plusieurs zones d'ombre subsistent. Tout d'abord, nous ne connaissons pas la voie de signalisation de cette molécule, impliquée dans la modulation des contractions intestinales. Nous avons pu montrer qu'APJ était présent au niveau des neurones entériques exprimant la nNOS et ceux exprimant la ChAT, et que la perfusion d'apeline sur un fragment de duodénum *ex vivo* déclenche, en fonction de sa concentration, une libération de NO et d'acétylcholine. Afin de détailler les mécanismes cellulaires impliqués, des expériences sur des neurones entériques en culture doivent être effectuées. Après isolation des neurones du SNE exprimant APJ et ajout d'apeline dans le milieu de culture, il serait intéressant d'identifier par western blot l'expression protéique, ainsi que l'activation des effecteurs du couple apeline/APJ. A titre d'exemple, plusieurs études de notre équipe

ont montré l'implication de l'AMPK, d'Akt ou encore de la eNOS, dans les effets de l'apeline sur l'homéostasie glucidique médiés par APJ [302, 345, 357].

Néanmoins, il est important de garder en tête que dans notre modèle, l'apeline, en fonction de sa concentration, va avoir un effet inhibiteur ou stimulateur de la contractilité intestinale, aboutissant à des effets opposés sur la glycémie. De plus, cette même dualité avait été observée par notre groupe en fonction des taux centraux d'apeline. A savoir que de faibles concentrations d'apeline injectées en icv amélioraient la glycémie d'animaux nourris *via* une libération de NO hypothalamique [302]. A l'inverse, l'injection icv de forts taux d'apeline, similaires à ceux retrouvés dans l'hypothalamus d'animaux obèses/diabétiques, à une souris normale, entraînent une hyperglycémie et une hyperinsulinémie à jeun, 2 caractéristiques d'un DT2 *via* une libération d'H₂O₂ [302, 371]. Dès lors, une des perspectives de ce projet est l'identification de nouveaux acteurs moléculaires capables de cibler notre système « SNE-contractions duodénales » n'ayant pas cette dualité d'effet, et constituant ainsi des outils thérapeutiques originaux et innovants pour traiter le DT2.

Parmi eux, notre équipe s'intéresse à la galanine. Il s'agit d'un neuropeptide retrouvé abondamment au niveau hypothalamique et dans les structures neuronales du tractus GI [390]. A ce niveau, son récepteur GAL-R1 couplé à une protéine du type G_{i/o} est exprimé par les neurones du SNE [391]. Concernant ses effets intestinaux, la galanine provoque une inhibition de la contraction des cellules musculaires lisses intestinales en bloquant la transmission cholinergiques des neurones à ChAT [392]. Concernant ses effets sur l'homéostasie glucidique, il a été montré chez le rat que la galanine induisait des effets bénéfiques sur la sensibilité à l'insuline des adipocytes suite à une injection icv [393], et du muscle lors d'une augmentation transitoire de ses taux plasmatiques [394]. Ayant de plus montré dans notre travail, qu'un ralentissement des contractions duodénales entraînait une amélioration du statut diabétique chez des souris HFD, l'ensemble de ces observations font de la galanine un candidat de choix dans l'approche thérapeutique ciblant le couple « SNE-contraction duodénale » que nous proposons dans ce travail.

Enfin, depuis une dizaine d'années, une autre cible intestinale dans la prise en charge du DT2 a été identifiée, il s'agit du microbiote intestinal. Tout d'abord, la comparaison des microbiotes issus de souris et d'humains obèses ou minces, a révélé que l'obésité était associée à de profondes modifications du microbiote intestinal, appelées dysbiose [149, 150]. De plus, le transfert de microbiote de souris obèses chez des souris axéniques (dépourvues de microbiote intestinal), conduit au développement d'une obésité chez ces dernières [153]. Il est maintenant clairement établi que le microbiote intestinal participe au développement de la masse grasse, de la résistance à l'insuline et de l'inflammation caractérisant l'obésité et le DT2 associé [151-156]. Dès lors, de nouvelles thérapies dans la prise en charge du DT2 ciblant ce microbiote se sont développées. Parmi elles, l'utilisation de

probiotiques et de prébiotiques permettant de moduler ce microbiote intestinal se sont avérées être des pistes thérapeutiques très prometteuses pour le traitement des maladies métaboliques [157]. A titre d'exemple, l'administration de *A.muciniphila*, une bactérie dont l'abondance est diminuée chez des souris obèses et diabétiques, améliore le profil métabolique de ces dernières (en termes de gain de masse grasse, d'inflammation et de résistance à l'insuline) [158]. Par ailleurs, le microbiote est capable de libérer de nombreux facteurs tels que le LPS, des peptidoglycane, des peptides et des lipides bioactifs, qui pourrait alors moduler l'activité des neurones entériques [395-397]. Dès lors, une perspective de notre groupe est d'étudier les conséquences d'une modulation de ce microbiote intestinal, par des approches pré- et probiotiques, sur le SNE et donc sur la contractilité intestinale, et ainsi d'évaluer si les effets bénéfiques déjà observés de ces approches sur l'homéostasie glucidique puissent être potentialisés par une action du microbiote sur notre axe de régulation.

IV- Conclusion générale

Au début de ma thèse, lorsque l'axe intestin-cerveau était évoqué dans le cadre du contrôle de l'homéostasie glucidique, les notions de détection entérique de glucose et de libération d'hormones gastro-intestinales venaient automatiquement à l'esprit. Cependant, l'aspect mécanique de cet organe contractile n'était peu, voir jamais, pris en considération. En effet, les contractions intestinales étaient principalement relayées à un rôle du transit du bol alimentaire le long du tractus digestif. Nos travaux ont donc permis de montrer pour la première fois, que cette activité mécanique intestinale, sous le contrôle du système nerveux entérique, pouvait également constituer un véritable signal permettant d'informer le cerveau de l'état nutritionnel de l'hôte. Cette mécanodétection représenterait ainsi un nouveau mode de communication entre ces 2 organes dans le but de maintenir la glycémie. Dès lors, ce travail de thèse place une nouvelle fois l'intestin comme chef d'orchestre dans la communication inter-organes, confirmant ainsi son rôle de « deuxième cerveau ».

Annexes

Au cours de ces 3 années de doctorat, j'ai également eu l'opportunité de participer à l'écriture d'une revue en rapport avec ma thématique de thèse, ainsi que de participer à plusieurs travaux de collaborations portant sur l'apeline et le métabolisme glucidique. Les publications issues de ces travaux sont présentées dans cette partie.

Le premier article est une revue publiée en 2016 dans la revue *American Journal of Physiology*. Cette revue récapitule comment les différents mécanismes de « glucosensing » se déroulant dans le tractus gastro-intestinal, peuvent influencer le métabolisme glucidique.

Le deuxième article a été publié en 2016 dans la revue *Placenta* par Sandy HANSSENS. Ces travaux mettent en évidence une altération du système apeline-APJ entre la mère et le fœtus dans le cadre d'une obésité maternelle.

Le troisième article a été publié en 2013 dans la revue *Antioxydant Redox Signaling* par Anne DROUGARD. Cette étude démontre l'implication de l'apeline hypothalamique dans la mise en place d'un Diabète de Type 2 via l'activation d'une voie peroxyde d'hydrogène hypothalamique - Système Nerveux Autonome - néoglucogenèse hépatique.

Les trois derniers articles sont des revues. La première a été publiée en 2015 dans *Frontiers in Neurosciences* par Anne DROUGARD. Elle aborde l'impact des espèces réactives de l'oxygène dans la régulation du métabolisme énergétique et de la prise alimentaire. La seconde a été publiée en 2013 dans *Hormone and Metabolic Research*, par Claude KNAUF, et récapitule les effets de l'apeline hypothalamique sur le métabolisme glucidique. La dernière a été publiée en 2013 dans *Obésité* par Anne DROUGARD et fait un bilan des acteurs moléculaires impliqués dans des communications inter-organes et leurs enjeux dans la mise en place d'une obésité et d'un Diabète de Type 2.

Glucosensing in the gastrointestinal tract: Impact on glucose metabolism

Audren Fournel,¹ Alysson Marlin,¹ Anne Abot,¹ Charles Pasquio,¹ Carla Cirillo,² Patrice D. Cani,³ and Claude Knauf¹

¹NeuroMicrobiota, European Associated Laboratory, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1220, Institut de Recherche en Santé Digestive (IRSD), Toulouse, France; ²Laboratory for Enteric NeuroScience (LENS), University of Leuven, Leuven, Belgium; and ³NeuroMicrobiota, European Associated Laboratory, Université Catholique de Louvain (UCL), Louvain Drug Research Institute (LDRI), Metabolism and Nutrition Research Group, WELBIO (Wallonia Excellence in Life sciences and BIOTEchnology), Brussels, Belgium

Submitted 11 January 2016; accepted in final form 25 February 2016

Fournel A, Marlin A, Abot A, Pasquio C, Cirillo C, Cani PD, Knauf C. Glucosensing in the gastrointestinal tract: Impact on glucose metabolism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 310: G645–G658, 2016. First published March 3, 2016; doi:10.1152/ajpgi.00015.2016.—The gastrointestinal tract is an important interface of exchange between ingested food and the body. Glucose is one of the major dietary sources of energy. All along the gastrointestinal tube, e.g., the oral cavity, small intestine, pancreas, and portal vein, specialized cells referred to as glucosensors detect variations in glucose levels. In response to this glucose detection, these cells send hormonal and neuronal messages to tissues involved in glucose metabolism to regulate glycemia. The gastrointestinal tract continuously communicates with the brain, especially with the hypothalamus, via the gut-brain axis. It is now well established that the cross talk between the gut and the brain is of crucial importance in the control of glucose homeostasis. In addition to receiving glucosensing information from the gut, the hypothalamus may also directly sense glucose. Indeed, the hypothalamus contains glucose-sensitive cells that regulate glucose homeostasis by sending signals to peripheral tissues via the autonomous nervous system. This review summarizes the mechanisms by which glucosensors along the gastrointestinal tract detect glucose, as well as the results of such detection in the whole body, including the hypothalamus. We also highlight how disturbances in the glucosensing process may lead to metabolic disorders such as type 2 diabetes. A better understanding of the pathways regulating glucose homeostasis will further facilitate the development of novel therapeutic strategies for the treatment of metabolic diseases.

glucosensing; glucose homeostasis; diabetes

GLUCOSE REPRESENTS ONE of the major sources of energy circulating throughout the body. The tight and continuous control of glycemia in the face of fluctuations in glucose absorption, storage, and production is crucial for all living organisms. Not surprisingly, the gastrointestinal tract constitutes the first anatomic site for the detection of nutrients, including glucose. Glucose detection involves specialized cells referred to as glucosensors (21, 44, 64). These cells, which are present in the oral cavity as well as the small intestine, pancreas, and portal vein, express various glucose transporters and G protein-coupled receptors (GPCRs) implicated in the physiological response to glucosensing (21, 44, 64). Glucosensing by these cells evokes complex neural and endocrine responses that control glucose metabolism. Moreover, glucose detection in the gastrointestinal tract also transmits afferent nervous impulses to the brain, which, in turn, controls peripheral glucose utilization. Indeed, the brain, specifically the hypothalamus, is a key player in the regulation of glucosensing mechanisms. In

addition to receiving information via the gut-brain axis, the hypothalamus also contains glucosensitive cells able to detect glucose (91). Upon the integration of these messages, the hypothalamus sends specific signals to the tissues involved in glucose metabolism via the autonomous nervous system (ANS).

Metabolic disorders such as type 2 diabetes (T2D) are considered as epidemics in industrialized countries where accessibility to food exceeds the actual energy need. Although the medical and technological knowledge of these disorders has improved tremendously, the pathogenesis of diabetes remains poorly understood, and efficient therapeutic tools are still lacking. In this respect, the success of gastric bypass surgery and new promising gut-derived pharmacological treatments, such as the use of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogs, highlights the importance of the gastrointestinal tract in regulating glucose homeostasis (23). Moreover, the so-called “gut-brain axis” is currently an intriguing topic in the search for new antidiabetic tools (23). Thus, a better understanding of the pathways involved in glucosensing inside and outside the gastrointestinal tract will likely contribute to the identification of future therapeutic targets for the treatment of

Address for reprint requests and other correspondence: C. Knauf, Inserm U1220, Université Paul Sabat, Batiment B-Pavillon Lefebvre-C..H.U. Purpan, BP 3028, Toulouse Cedex 3, 31024, France (e-mail: claude.knauf@inserm.fr).

diabetes. In this review, we focus on how the gastrointestinal tract and the hypothalamus regulate glucose metabolism under both physiological and pathological conditions.

GLUCOSENSING IN THE GASTROINTESTINAL TRACT

Glucosensing in the Oral Cavity

The oral cavity is the gateway to the digestive tract, where sugars from food are partially digested by salivary enzymes. The tongue is the first organ involved in the detection of sugars, glucose in particular, playing an important part in the regulation of glucose homeostasis.

Cell types involved in glucosensing. The surface of the tongue and the palate epithelium are mapped with different papillae (circumvallate, foliate, and fungiform) within which taste buds are anchored. Taste buds are composed of several taste receptor cells (TRCs) that are differentially expressed across mammalian species (44). Type II TRCs are responsive to local increases in sugar levels, including glucose, within the mouth and function in sweet taste perception while also modulating glucose absorption (44).

Molecular mechanisms of glucosensing. At a molecular level, sweet tastant detection is mediated by two GPCRs called TAS1R2 and TAS1R3 (14). The binding of sweet compounds activates these sweet taste receptors in the taste buds and induces an intracellular transduction cascade leading to the depolarization of the TRCs (44). More precisely, TAS1R2/TAS1R3 activation results in the dissociation of gustducin GPCR subunits (e.g., α -gustducin, G β , and G γ 13), leading to increased phospholipase C- β 2 activity, which, in turn, results in calcium (Ca²⁺) release from intracellular stores in a process mediated by inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3. This pathway allows the opening of transient receptor potential cation channel subfamily M member 5 and leads to the depolarization of membrane TRCs, generating an action potential and ATP release. In turn, the released ATP acts as a transmit-

ter, activating gustatory afferent nerve fibers within the subepithelial connective tissue of the tongue (Fig. 1) (44).

Studies performed in vitro using reporter systems and in vivo with mice deficient for TAS1R3 have shown that the heterodimeric TAS1R2/TAS1R3 receptor is the principal mammalian sweet taste receptor responsive to sweeteners, but it does not directly work via the binding of glucose (14, 19). Damak et al. suggested that additional sugar-sensing mechanisms might exist, depending on the sugar level, but only a supraphysiological glucose concentration was tested in their study (19). Moreover, the presence of glucose transporters in TRCs highlights the functional cross talk between the perception of and the cellular response to a glucose stimulus. TRCs of lingual circumvallate papillae express major glucose transporters, e.g., sodium-glucose cotransporter-1 (SGLT-1) and glucose transporter-2 (GLUT-2), which act as a local glucose monitoring system and mediate active and passive glucose transport, respectively (56). Like intestinal enteroendocrine cells (EECs), TRCs are polarized cells, and the glucose transporters (GLUT-2) are localized to basolateral and/or apical regions of TRCs, in close proximity to TAS1R3 and α -gustducin. Moreover, these cells express voltage-gated sodium and potassium channels and SGLT-1, allowing active glucose transport by the electrochemical gradient (Fig. 1) (21, 56).

Using 2-deoxy-D-glucose (2-DG), a nonmetabolized glucose analog, and α -methyl-D-glucoside, which is specifically transported by SGLT-1, Oyama et al. showed that glucose transporters account for most of the glucose uptake in the oral cavity (69). Glucose uptake stimulates the lingual sodium transport system (57). Modification of the electrophysiological gradient increases a series of intracellular events, with changes in the cytosolic ATP-to-ADP ratio and subsequent closure of ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP} channels) leading to TRC depolarization, thereby transforming glucosensing into neural signals (14). In this mechanism, the release of ATP acts on purinergic receptors to activate the gustatory nerve fibers

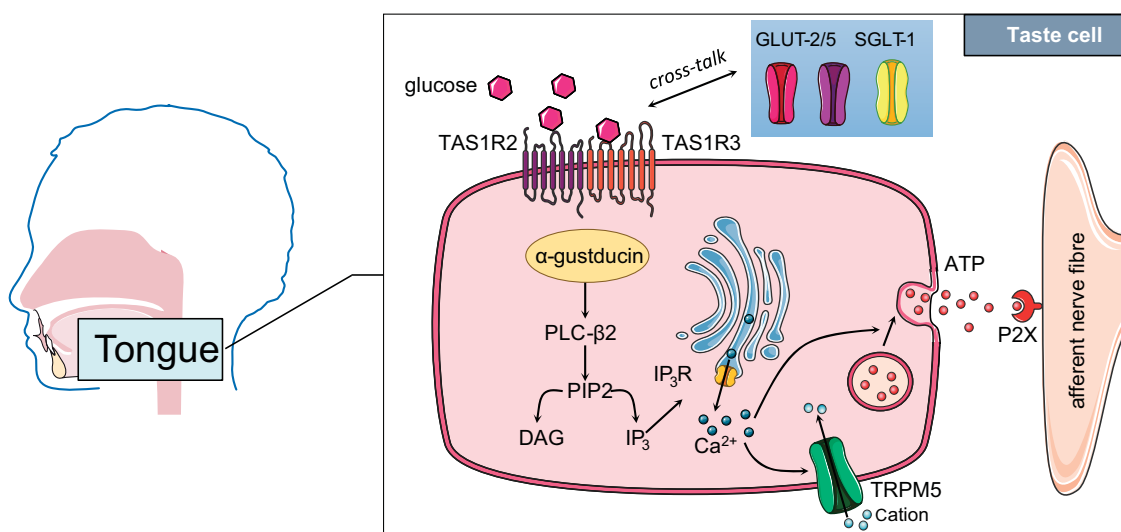


Fig. 1. Molecular mechanisms involved in glucosensing in the oral cavity. In the taste buds, activated TAS1R2/TAS1R3 heterodimers interact with G proteins comprising α -gustducin, leading to phospholipase C- β 2 (PLC- β 2) activation. In turn, activated PLC- β 2 cleaves phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) into inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) and diacylglycerol (DAG). IP₃ stimulates Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum via type III IP₃ receptor activation (IP₃R). The elevated intracellular Ca²⁺ activates the transient receptor potential cation channel subfamily M member 5 (TRPM5) and induces membrane depolarization and ATP release, which stimulates efferent nerve fibers. GLUT-2/5, glucose transporter-2/5; SGLT-1, sodium-glucose cotransporter-1.

within the primary taste nucleus of the solitary tract in the brain stem, involved in taste perception (26).

The functional relationship between sweet-tasting perception and glucosensing is further enhanced by hormonal modulation. Indeed, paracrine hormones, including GLP-1 and glucagon, influence TRC signaling. The functions of these peptides in taste buds are not fully understood, but it is known that they are able to modulate the response of the peripheral gustatory apparatus and glucosensing mechanisms (49). GLP-1 is present in murine α -gustducin/TAS1R3-expressing taste cells in circumvallate papillae, suggesting a potential role for GLP-1 signaling in sweet taste function. Considering the dramatically reduced taste response to sweeteners observed in GLP-1 receptor knockout (KO) mice (90) and the absence of GLP-1 secretion in the circumvallate papillae of TAS1R3 KO mice (31), GLP-1 signaling could potentially maintain or enhance sweet taste sensitivity. Furthermore, dipeptidyl-peptidase 4, which is involved in GLP-1 degradation, is not expressed in taste buds, suggesting an enhanced half-life of GLP-1 in taste tissues, thus ensuring that taste buds have a sufficient level to stimulate their GLP-1 receptors (90). Moreover, similar to GLP-1 expression, glucagon and alternate processing enzyme, which is involved in glucagon biosynthesis, are also found in mouse taste cells and colocalize with TAS1R3 (90). Both genetic and pharmacological disruption of glucagon signaling in mice results in reduced sweet taste responsiveness, indicating a role for local glucagon signaling in the peripheral modulation of this process (13).

Consequences of glucosensing on glucose homeostasis. Sweet gustatory responses to glucose stimuli play an important role in regulating glucose homeostasis through the modulation of neuronal messages to peripheral tissues. There is some evidence demonstrating that, similar to intestinal cells, sugar-sensing cells participate in the maintenance of glucose homeostasis and that hormones binding receptors on taste cells alter the palatability of food (49). For example, the presence of GLP-1 in taste bud cells suggests a role for this peptide in the taste of sweet compounds and in gut hormone secretion after meal ingestion. In animal models deficient for α -gustducin, loss of the GLP-1 response to enteric glucose has been observed, thereby highlighting that the insulinotropic effects of GLP-1 are associated with taste signaling molecules, limiting postprandial glucose excursions (49).

Pathology. Clinical and experimental evidence has revealed that obesity is associated with alterations in taste responsiveness in humans and rodents (13, 21). Taste buds of diabetic rats exhibit enhanced expression of α -gustducin protein and reduced expression of the sweet taste receptor TAS1R3, which may partially explain the sweet taste disorders observed in the diabetic context (96, 97). Although morphometry studies have shown that diabetic rats present no significant difference in papillae size compared with control animals, the innervation of these taste cells is significantly reduced (71). Therefore, the attenuation of sweetness perception may trigger sweet-seeking behaviors in some individuals, potentially increasing the risk of overconsumption of high-energy foods (e.g., rich in glucose) and eventually contributing to the development of obesity (49).

In addition, it has been found that metabolic hormone levels change in obese subjects (13, 49); this may also alter the output of hormonal modulation by taste cells, as described above. These changes may also participate in the altered gustatory

sensitivity to tastants and modify glucose intake in obesity (13, 49). Diet-induced obesity in rats causes increased GLP-1 secretion in taste buds, explaining the greater preference for sweet taste observed in obese animals (96). Other studies have highlighted the close association between gustatory pathways and hormonal modulation altered in an obesity context. For example, some studies have demonstrated that the gustatory neural response is enhanced in diabetic Db/Db mice, whereas their threshold to sweet taste compounds is lowered (65, 87).

The tongue is thus an important peripheral organ involved in orchestrating metabolic homeostasis, altered in the context of obesity (21).

Glucosensing in the Small Intestine

The small intestine is the main sensor of ingested carbohydrates and is responsible for secreting numerous hormones involved in the modulation of multiple physiological functions, including glucose homeostasis. In this part of the gastrointestinal tract, glucosensing is performed by different specialized cell types localized in the intestine wall.

Cell types involved in glucosensing. The enterocyte is the most represented epithelial cell type lining the gut mucosa and, consequently, constitutes an important interface between ingested food (glucose) and the rest of the body. Moreover, as absorptive cells, enterocytes mediate nutrient uptake and are responsible for the epithelial secretory process. These functions indicate that enterocytes may play a fundamental role in intestinal glucosensing. This notion is substantiated by the fact that intestinal absorption of glucose triggers discharges of afferent nerves, a phenomenon abolished by phloridzin, a sodium-glucose symporter blocker, and is not initiated by nonabsorbed carbohydrates (55).

In addition to the classical absorptive enterocytes, there is a distinct type of enterocytes called brush cells that are involved in glucosensing in the small intestine (21). These cells are morphologically similar to lingual taste cells and strongly express α -gustducin, a mediator of gustatory signaling (21). Because of this similarity, it has been suggested and subsequently demonstrated that brush cells may participate in sugar sensing by a mechanism analogous to that of taste buds of the lingual epithelium (52).

In addition to enterocytes, EECs are also involved in glucose detection in the small intestine. After detecting glucose, these cells secrete gastrointestinal hormones that inform the body of the nutritional state (75). Among EECs, L cells and K cells, which secrete GLP-1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP), respectively, are the two major EEC types involved in intestinal glucose detection (21, 75).

Last but not least, enteric neurons also participate in glucosensing within the small intestine. The gut wall is composed of millions of neurons organized into two major plexus: the submucosal plexus, which is directly in contact with the intestinal mucosa, and the myenteric plexus, located between the circular and longitudinal muscular layers (73). Although the enteric nervous system (ENS) is classically known to control intestinal motility, secretion, and absorption, recent evidence suggests its involvement in glucosensing. It has been shown that intraintestinal infusion of glucose increases c-Fos expression, a marker of cell activation, in enteric neurons in conscious rats (84). Moreover, the secretion of gastrointestinal

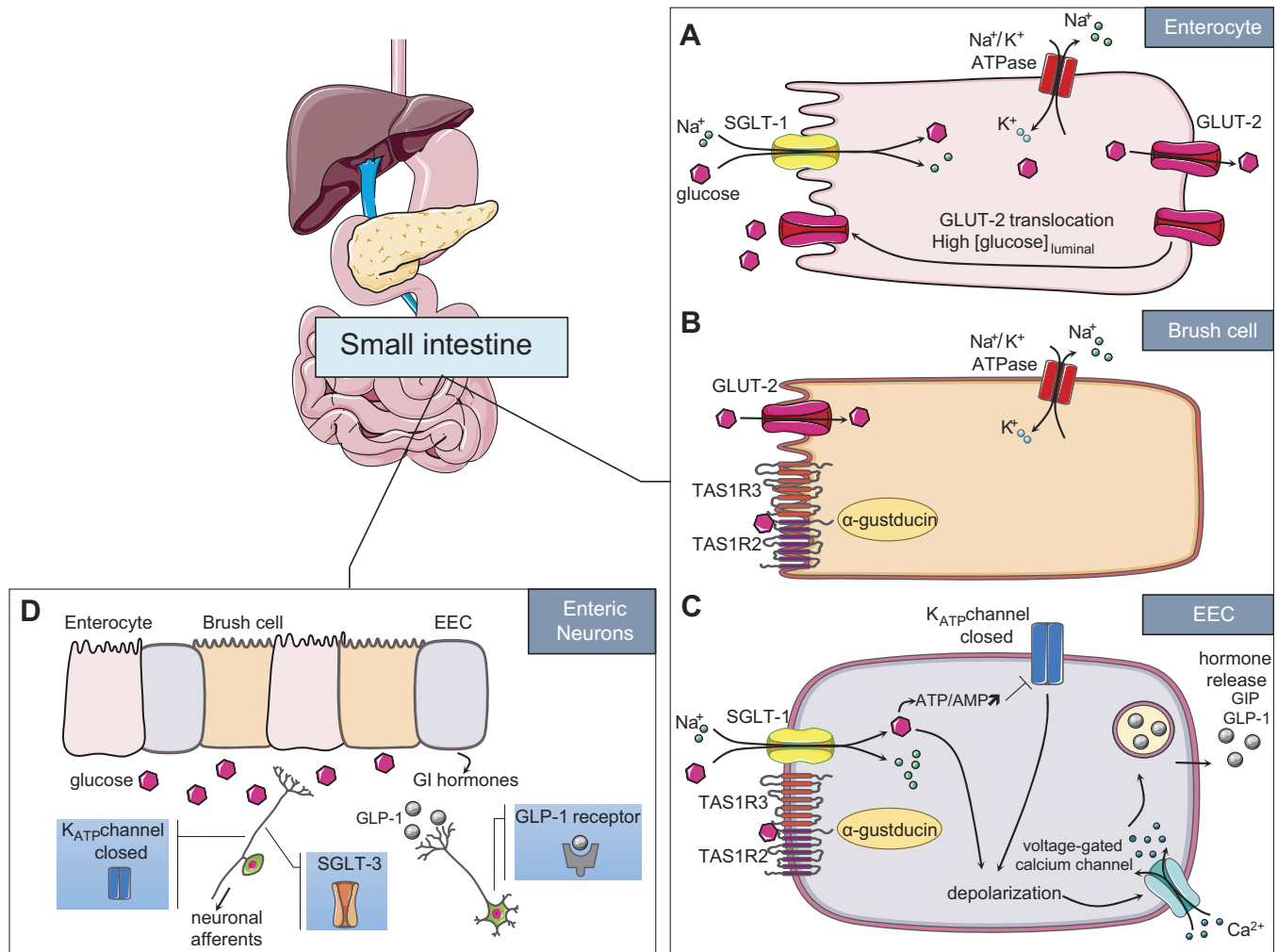


Fig. 2. Molecular mechanisms involved in glucosensing in the gastrointestinal tract. **A:** in enterocytes, transport of glucose occurs by SGLT-1, following the Na^+ electrochemical potential gradient across the apical membrane until its intracellular concentration is sufficiently elevated. Glucose is transported outside of enterocytes by facilitated diffusion through GLUT-2, localized on the basolateral membrane of the cell. Saturation of SGLT-1, depending on the luminal glucose concentration, is associated with an increase of GLUT-2 translocation to the apical membrane. **B:** in brush cells, the glucose trafficking signal transduction pathway involves GLUT-2 transporters. This mechanism is coupled with TAS1R2/TAS1R3 sweet taste receptor activation that was described for taste buds. **C:** enteroendocrine cells (EEC) receive glucose stimulation via sweet taste receptor activation, as described below, but GLUT-2 also trigger the entry of glucose into the glycolytic pathway to generate ATP. This increase in ATP leads to closure of ATP sensitive potassium channels (K_{ATP}) channels, membrane depolarization, opening of Ca^{2+} channels, and release of hormones like glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1); note that membrane depolarization can be induced by glucose itself. **D:** enteric neurons are glucosensitive: extracellular glucose removal leads to hyperpolarization and decreases in their membrane input resistance. The excitation of these neurons is mediated by inhibition of K_{ATP} channels or by SGLT-3. They can also be activated by gastrointestinal (GI) hormones secreted by EECs in response to glucose detection. Enteric neurons can activate neighboring neurons or transmit glycemic information to the brain via nervous afferents.

hormones stimulated by glucosensing EECs might be able to secondarily activate enteric neurons (73). Thus, activation of enteric neurons by intraluminal glucose occurs either directly or indirectly via the EECs.

Molecular mechanisms involved in glucosensing. **ENTEROCYTES.** Glucose absorption in enterocytes is carried out by two connected transporters. Apical active transport of glucose occurs via SGLT-1, following the sodium electrochemical potential gradient across the apical membrane (94). Consequently, glucose accumulation in the cytosol leads to the elevation of its intracellular concentration. Glucose is then transported out of the enterocyte by facilitated diffusion through GLUT-2, which is localized on the basolateral membrane of the cell. In addition to the GLUT-2 pathway, studies on intestinal absorption in

GLUT-2 null mice and in patients with GLUT-2 deficiency suggest an alternative pathway for glucose exit from the enterocyte by exocytosis (94). However, saturation of SGLT-1 has been observed in conditions of increased luminal glucose concentrations. This effect is associated with increased GLUT-2 translocation to the apical membrane. As a consequence, in this context, both inflow and outflow of glucose across the enterocyte are mediated by GLUT-2 (Fig. 2A) (42).

BRUSH CELLS. In addition to the involvement of enterocytes and the SGLT-1/GLUT-2 pathway in glucosensing and glucose absorption, studies have shown that brush cells within the small intestine also actively participate in this phenomenon. Brush cells have a similar morphology as lingual taste cells and express sweet taste receptors. As described previously, the

TAS1R2/TAS1R3 heterodimeric sweet taste receptor is able to release ATP, which acts on afferent nerve fibers and leads to taste perception (21, 26). In the gut, perfusion of TAS1R2 and TAS1R3 ligands strongly stimulates glucose absorption through the rapid insertion of apical GLUT-2. This result supports the idea that the ability of brush cells to detect and “taste” glucose could contribute to the complex glucosensing process in the small intestine (Fig. 2B) (52).

ENTEROENDOCRINE CELLS. EECs, as enterocytes, are polarized cells. These cells present an apical surface facing the gut lumen, allowing glucosensing, and a basolateral surface from which secretory vesicles are exocytosed in response to glucose detection. A number of mechanisms for glucose-stimulated GLP-1 and GIP release have been proposed for EECs. The most well known is the sodium-coupled glucose uptake performed by SGLT-1, which generates small currents that trigger EEC membrane depolarization, causing Ca^{2+} channels to open and the consequent release of GLP-1 or GIP (Fig. 2C). Accordingly, pharmacological inhibition of SGLT-1 in vitro abolishes GLP-1 and GIP secretion, and SGLT-1-deficient mice exhibit reduced GLP-1 and GIP levels following oral glucose administration (75). Additionally, following its transport into L and K cells via SGLT-1, glucose enters into the glycolytic pathway to generate ATP. The increase in ATP leads to closure of K_{ATP} channels, membrane depolarization, opening of Ca^{2+} channels, and release of GIP and GLP-1. Studies showing an enhancement of GLP-1 secretion in vitro in response to a K_{ATP} channel blocker also suggest a potential role for glucose metabolism in gastrointestinal hormone secretion (21).

The activation of sweet taste receptors (TAS1R2/TAS1R3 heterodimers) by glucose and the consequent stimulation of hormone secretion have also been proposed. It has been shown that the G protein α -gustducin colocalizes with GLP-1 and GIP in the small intestine (21, 75). In addition, several sweet taste receptor agonists can elicit GLP-1 secretion from mouse and human EECs in vitro. Conversely, TAS1R3-deficient mice exhibit impaired glucose-stimulated GLP-1 secretion (Fig. 2C) (21, 75). Finally, intragastric perfusion of lactisole, an inhibitor of TAS1R2/TAS1R3 receptor, induces a significant reduction in GLP-1 secretion in humans in response to intragastric or intraduodenal perfusion of glucose (32). All of these observations demonstrate that TAS1R2/TAS1R3 receptor is involved in glucose-dependent secretion of gastrointestinal hormones.

Once secreted, gastrointestinal hormones diffuse to the bloodstream or bind to their specific receptors on enteric neurons and/or afferent nerve endings.

ENTERIC NEURONS. Glucose sensing by enteric neurons occurs by direct and indirect pathways, as described above. On the one hand, enteric neurons can be indirectly activated by gastrointestinal hormones secreted by EECs in response to glucose detection. Accordingly, recent technological advances have made possible the generation of GLP-1 receptor-Cre mice crossed with fluorescent reporter strains, facilitating the identification of GLP-1 receptor-positive neuronal cell bodies in the ENS (Fig. 2D) (77).

On the other hand, enteric neurons seem to be able to sense glucose directly. In 1999, Liu et al. identified glucoresponsive neurons in the small intestine of guinea pigs (48). These glucoresponsive neurons could be distinguished from other neuronal populations because of their hyperpolarization and the decrease in their membrane input resistance observed in

response to glucose removal from the extracellular milieu. This effect was reversed by the reintroduction of glucose or by the K_{ATP} channel inhibitor tolbutamide, suggesting that the glucose-induced excitation of enteric neurons is mediated by the inhibition of these channels. In addition, immunofluorescence analysis has demonstrated that enteric neurons in both the submucosal and myenteric plexus express SGLT-3 (22). In this study, the authors showed that D-glucose causes depolarization of membrane potential in oocytes expressing SGLT-3. These findings suggest that SGLT-3 could also function as a glucose sensor in enteric neurons (Fig. 2D).

Once activated by glucose, enteric neurons could activate neighboring enteric neurons within the ENS or transmit the glyceic information centrally to the brain stem via nerve afferents.

ENTERIC GLIAL CELLS. Another intestinal partner potentially involved in glucosensing is the enteric glial cell (EGC). Nevertheless, the role of EGCs in glucosensing is not as clear as those of the other cell populations described above. Only a couple of studies in the last decade have tried to elucidate the function of EGCs in glucose metabolism. These investigations suggest that EGCs are indirectly involved in glucose homeostasis through a fine cross talk with pancreatic β -cells. Specifically, EGCs communicate with β -cells via the release of glial-derived neurotrophic factor (GDNF). Once released, GDNF binds specific receptors, i.e., Ret receptor tyrosine kinase and the glycosylphosphoinositol-anchored coreceptor (GFR α), on β -cells. This interaction influences β -cell function and mass and protects them from damage, e.g., in the diabetic state (62). The GFR α receptor in particular represents an important link between the nerve and the endocrine compartments within the pancreas. Indeed, it has been shown that the signaling evoked by the GDNF-GFR α interaction is needed for the establishment of parasympathetic innervations in the islets, which are crucial for the regulated secretion of pancreatic hormones (79). All together, these mechanisms account for the indirect role of EGCs in the regulation of glucose homeostasis.

Consequences of GLP-1 and GIP release on glucose homeostasis. As described earlier in this review, the gastrointestinal tract is a specialized sensory system responsible for the detection of ingested glucose and the subsequent relay of information to peripheral tissues or the brain to regulate glucose metabolism. Here, we discuss the role of the different organs involved in the regulation of glucose homeostasis.

PANCREAS. In healthy subjects, oral administration of glucose causes a two- to threefold higher insulin response compared with intravenous infusion of glucose, known as the incretin effect. This incretin effect reflects the capacity of gastrointestinal hormones, released in the portal vein, to increase insulin secretion by the pancreas. Among gastrointestinal hormones, it is now well established that GLP-1 and GIP are the two most important incretins. First, the receptors for GLP-1 and GIP are expressed by β -cells in the pancreas (40). Second, in experiments where GLP-1 and GIP were infused together with glucose, both elicited insulin secretion to an extent that can fully explain the insulin response (40). In contrast, the use of GLP-1 and GIP receptor antagonists abolishes this response (40). Finally, when glucose levels are at or above fasting levels, GLP-1 strongly inhibits glucagon secretion (40).

INTESTINE. Incretins also have extrapancreatic functions. First, it has been shown that GLP-1 has a profound inhibitory

effect on gastric emptying of a liquid mixed test meal in healthy normoglycemic volunteers (63). The decrease in gastric emptying slows the gastric transit of nutrients from the stomach to the intestine, thus reducing the importance of postprandial glycemia and helping to normalize glycemic levels. The mechanism by which GLP-1 mediates the inhibition of gastrointestinal motility has not been fully established. However, recent evidence suggests that the GLP-1 inhibitory effect is mediated through nitric oxide (NO) release by enteric neurons. Approximately 30% of neurons in the small intestine coexpress the GLP-1 receptor and neuronal NO synthase (nNOS) (4). Furthermore, *in vitro* studies have demonstrated that inhibition of nNOS abolishes the inhibitory effect of GLP-1 on small intestine contractility in mice (4).

LIVER. Beyond the digestive system, incretin hormones can also target the liver. During hyperglycemic clamp, GLP-1-treated mice exhibited reduced hepatic glucose production associated with increased [¹³C]lactate labeling from glucose in the liver (34). This last result was reinforced by the increased rate of glycogen synthesis found in the liver of GLP-1-treated mice during the clamp experiment. All of these findings indicate that, in addition to enhancing glucose storage by the liver, GLP-1 can inhibit hepatic glucose production.

ADIPOSE TISSUE. *In vitro* costimulation of adipocytes with insulin and GIP elicits GLUT-4 (the insulin-sensitive glucose transporter) translocation to the membrane, demonstrating that GIP can enhance insulin sensitivity in adipose tissue (60). Moreover, in rat adipocytes, GLP-1 increased insulin-stimulated 2-DG uptake and triggered rises in glycogen synthesis and oxidation (72).

HYPOTHALAMUS. Incretins released into the portal vein can directly target peripheral tissues to control glucose metabolism. However, these incretins are rapidly degraded by enzymes in the blood of the portal vein, forcing them to use a second route to affect peripheral tissues. In line with this concept, Knauf et al. proposed the following model: at the beginning of a meal, detection of glucose by the intestine elicits GLP-1 release, leading to an afferent nervous message to the brain (45). Integration of this enteric message by the brain stem generates GLP-1 production by this structure. Thus, secreted GLP-1 reaches the hypothalamus where its receptors are present. Central GLP-1 receptor activation leads to secretion of catecholamines providing input to sympathetic preganglionic neurons (95). Therefore, central GLP-1 is linked to the regulation of the ANS. Via this ANS pathway, the GLP-1-sensitive cells then signal the pancreas to secrete insulin and skeletal muscles to prepare for glucose storage. At the end of a meal, when systemic hyperglycemia is evident, the brain directly detects the glucose. Subsequently, a signal opposite to the one sent by enteric glucose detectors would then be sent to the muscles, leading to temporary muscular insulin resistance, permitting the redirection of glucose toward the liver to prepare for the fasting period between two meals (43).

Using specific NO amperometric probes implanted directly into the hypothalamus of mice, our group has demonstrated that NO release is stimulated in response to the activation of enteric glucose sensors (25). Hypothalamic NO is known to cause increased blood flow in mice, which is associated with enhanced glucose utilization (12). Conversely, the application of NO synthase inhibitors in the hypothalamus leads to peripheral hyperglycemia and insulin resistance (24). Thus,

we could speculate that hypothalamic NO may be a target of enteric glucose detection that, in return, modulates glucose homeostasis.

Pathology. As described above, enteric detection of glucose is crucial for glucose homeostasis. It is therefore well established that impaired glucose detection in the intestine may result in profound metabolic disorders, such as T2D.

Knauf et al. have shown that, compared with normal mice, high-fat diet (HFD)-induced diabetic mice exhibited reduced c-Fos expression in the hypothalamus in response to intragastric infusion of glucose (43). The impaired enteric detection of glucose in diabetic mice is associated with a failure to induce changes in the glucose utilization rate. Following this project, our group has observed abnormalities in hypothalamic NO release in Db/Db genetically induced diabetic mice in response to intragastric perfusion of glucose (25). In parallel, the diabetic mice used in this study exhibited increased oxidative, inflammatory, and endoplasmic reticulum stress markers in the gut, whereas the same markers were only slightly affected in the hypothalamus. This last result suggests that the development of intestinal cellular stress leads to changes in brain NO-dependent glucose sensing in T2D.

Glucosensing in the Pancreas

Sensors located in the pancreas continuously monitor variations in blood glucose levels. Indeed, the presence of glucosensors in the endocrine part of the pancreas allows the modulation of hormonal secretions, emphasizing the crucial role played by these sensors in glucose homeostasis.

Cell types involved. β - and α -Cells are pancreatic glucose sensors located in the islets of Langerhans, representing 65 and 35% of total cellular islets, respectively. Similar to neurons, β - and α -cells are considered to be excitable upon glucose detection, due to the generation of a membrane potential. While β -cells respond to increases in glucose levels, α -cells are sensitive to variations in low glucose concentrations. Although the glucosensing role of β -cells is clearly established, the involvement of α -cells in this process is still debated (33).

Molecular mechanisms. β -CELLS. Pancreatic β -cells sense glucose through a two-step mechanism: the first involves the entry of glucose into the cell and subsequent glycolysis, followed in a second step by insulin secretion.

Glucose is transported into the cell by facilitated diffusion through GLUT-2, a glucose transporter characterized by rapid glucose uptake with low affinity. After its entry into β -cells, glucose is phosphorylated to glucose 6-phosphate by hexokinase IV. This enzyme allows β -cells to adjust glucose 6-phosphate formation rates according to blood glucose levels. Indeed, in β -cells, the glucokinase (GK) gene is constitutively transcribed, but hexokinase IV abundance is regulated by posttranscriptional mechanisms that are activated when blood glucose levels allow acceleration of intracellular glucose transport (54, 85). This results in an increase in glucose 6-phosphate formation rates during the postprandial period, when blood glucose levels are elevated. Thus, hexokinase IV plays an essential role in glucose detection by pancreatic β -cells. Once phosphorylated, glucose enters the glycolysis pathway to produce pyruvate and NADH coenzyme. Both cytosolic pyruvate and NADH then enter mitochondria and are metabolized to produce ATP (Fig. 3).

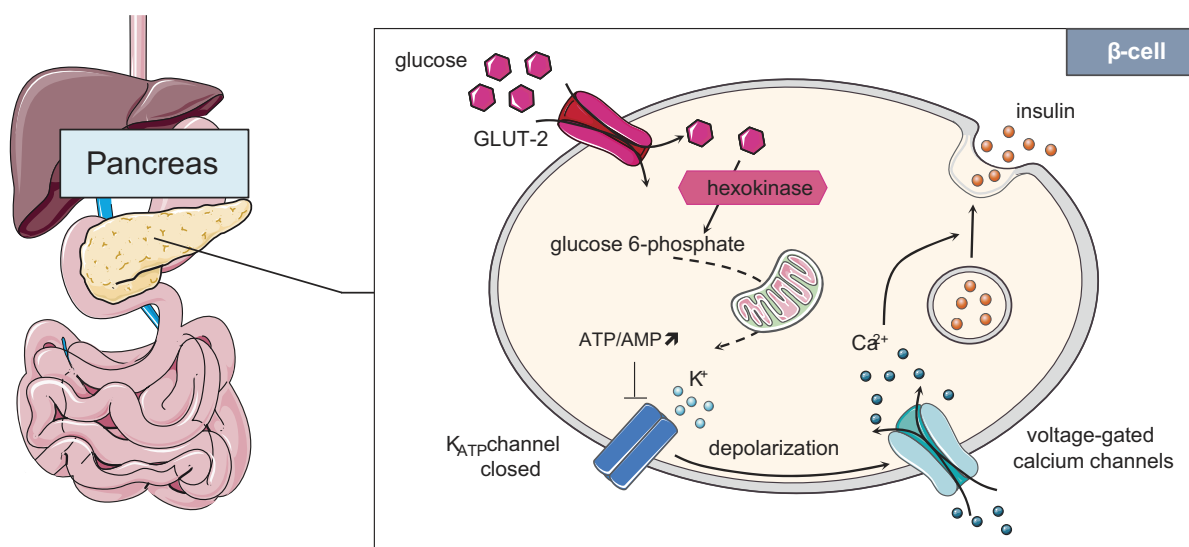


Fig. 3. Molecular mechanisms involved in glucosensing in the pancreas. In pancreatic β -cells, glucose is transported by GLUT-2, phosphorylated to glucose 6-phosphate by hexokinase IV, and subjected to the glycolysis pathway. This leads to an increase in ATP, followed by K_{ATP} channel closure and membrane depolarization. This depolarization, in turn, activates voltage-dependent Ca^{2+} channels, leading to Ca^{2+} accumulation in the cytoplasm and insulin secretion.

The subsequent increase in cytosolic ATP concentration inactivates K_{ATP} channels and induces depolarization of the β -cell membrane, leading to the opening of voltage-gated Ca^{2+} channels (51). Massive entry of Ca^{2+} allows the mobilization and exocytosis of secretory insulin vesicles. While the membrane potential is exclusively controlled by glucose, the exocytosis of insulin granules is also under the control of body energy needs. For this reason, β -cells have various functional insulin pools, which include an intracellular reserve pool (representing $\sim 90\%$ of the insulin store), a docked pool ($\sim 10\%$), and a pool ready for delivery, which is determined by the initial secretory response (between 0.3 and 2%) (Fig. 3) (78).

Interestingly, it should be added that other mechanisms are implicated in pancreatic β -cell glucosensing. As previously described under *Glucosensing in the Oral Cavity*, sweet taste receptors also play a key role in β -cells. Using an inhibitor of taste receptor type 1 member 3 receptor, Hamano et al. have shown that this receptor is required to induce insulin secretion by sweeteners (35). Moreover, Leloup et al. highlighted a major implication of reactive oxygen species (ROS) signaling in β -cell glucosensing. Glucose induces a transient and moderate H_2O_2 production in β -cells that is an obligatory stimulus for insulin secretion, whereas oxidative stress may disturb its signaling function (46).

α -CELLS. Pancreatic α -cells have also been reported to be glucosensitive. Indeed, α -cells express essential components for glucodetection found in β -cells: the K_{ATP} channel and GK (37). However, α -cells do not express GLUT-2 (68), and their glucosensor functions are debatable. Glucagon secretion appears to be more controlled by ANS than by glucosensing α -cells, since atropine (a cholinergic antagonist that acts by binding to muscarinic receptors) inhibits hypoglycemia-induced glucagon secretion (36). The regulation of glucagon secretion by ANS activity and hypothalamic centers will be extensively discussed under **EXTRAGASTROINTESTINAL GLUCOSENSING: THE ROLE OF THE BRAIN** below.

Based on different studies of the molecular mechanisms involved in glucose-dependent regulation of glucagon secretion, several models have been postulated (41, 76), but a large number of pathways remain to be unraveled. For example, the involvement of the K_{ATP} channel is controversial, and the link between glucose incorporation and inhibition of Ca^{2+} influx remains unclear. Consequently, much work still needs to be done to explain the molecular glucosensing mechanisms of α -cells.

Consequences of insulin and glucagon on glucose homeostasis. **INSULIN.** Insulin is secreted by β -cells in response to high blood glucose levels. In the liver, glucose flux is controlled by GK enzymes, not by its transport across the cell. Insulin increases the rate of glucose uptake by stimulating GLUT-4 translocation from intracellular pools to the cell surface (86). Moreover, by increasing glucose uptake, insulin promotes two limiting steps of glycolysis and enhances the activity of hexokinase and 6-phosphofruktokinase (83).

In liver, muscle, and adipose tissues, insulin increases the rate of glycogen synthesis while also decreasing the rate of glycogen breakdown in muscle and liver. Insulin activates glycogen synthase by inducing its dephosphorylation through the inhibition of kinases (18). Insulin also inhibits the activity of glycogen phosphorylase (92). The liver is a crucial glucose-producing organ implicated in the maintenance of constant blood glucose levels, especially during the fasting period. Insulin directly controls the activities of gluconeogenesis enzymes, leading to the inhibition of this pathway (83).

There is a tight balance between hormones secreted by the exocrine part of the pancreas, with each being able to inhibit the other. Indeed, in hyperglycemic conditions, insulin inhibits glucagon release from α -cells.

GLUCAGON. Normally, glucagon, which is secreted by α -cells, exerts opposite effects to those of insulin. It is a hyperglycemic hormone secreted when blood glucose levels are too low. Glucagon mainly targets hepatic cells, but it can also act on other tissues involved in glucose metabolism, such

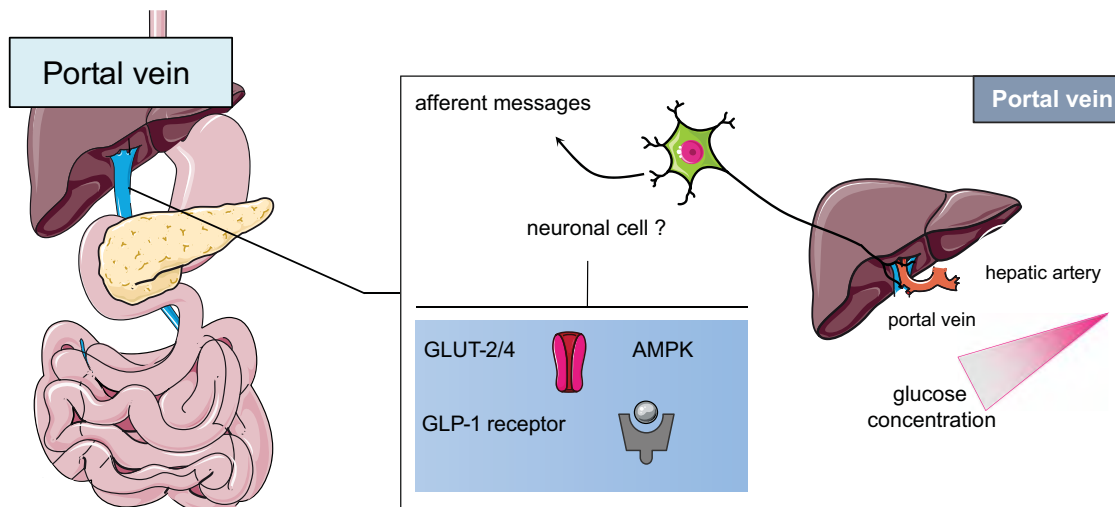


Fig. 4. Molecular mechanisms involved in glucosensing in the portal vein. In hepatportal glucosensor cells, portal glucose concentrations are inversely correlated with the firing rate of hepatic afferent nerves. Little is known about the molecular mechanisms involved in hepatportal glucosensing, but several actors are required, including GLUT-2, GLUT-4, AMP-activated protein kinase (AMPK), and GLP-1 receptor.

as the brain and adipose tissues (50). The release of glucagon from α -cells during hypoglycemia stimulates glucose release and production by the liver by activating glycogenolysis and gluconeogenesis. Glucagon can also initiate lipolysis in the liver and adipose tissues (50). Like insulin, glucagon modulates insulin secretion from β -cells, inhibiting it through a paracrine mechanism (3).

Pathology. As previously described, pancreatic β -cells respond to conditions of glucose excess by secreting insulin. This ability is lost in the case of T2D. Indeed, it has been shown in T2D patients that there is increased insulin release during the early diabetic stage, while at later stages, the rate of blood insulin declines and does not counterbalance the hyperglycemia. This defect in insulin secretion could be explained in part by impairment of glucosensing in β -cells, but it is instead generally considered the consequence of a multifactorial failure (99). GK plays a fundamental role in glucosensing, since genetic defects in GK lead to a form of diabetes, the so-called maturity-onset diabetes of the young, which develops gradually in adults (54). Glucosensing in α -cells also appears to be altered in T2D. Patients with T2D exhibit hyperglucagonemia, leading to overstimulation of glucose production by the liver during the fasting state. This is also associated with a deficit in glucagon secretion removal by insulin, a result of β -cell failure (11).

Glucosensing in the Portal Vein

Following digestion of nutrients by the digestive tract, glucose is absorbed by the intestinal epithelium and then released in the blood flow of the portal vein. Thus, the liver, via the portal vein, is perfectly located to regulate postprandial glucose levels through glucosensing mechanisms.

Cell types involved in glucosensing. The existence of glucose receptors in the liver was first postulated by Russek in 1963 (82). He suggested that receptors send a signal to the central nervous system in response to the glucose present in portal venous blood. In the 1980s, Nijima and his collaborators described the suppressive effect of D-glucose infusion in the

portal vein on the rate of afferent discharges of fibers in the hepatic branch of the vagus nerve (64). Only infusion of D-glucose decreased in discharge rates (i.e., there were no effects of D-fructose, D-mannose, or D-arabinose) (64), since it is the only sugar metabolized and used as an energy source by nerve cells. Adachi et al. in 1984 established the connection between glucose detection in portal venous blood and message integration in the central nervous system. For the first time, they highlighted the link between vagal endings in the portal vein and the brain stem (1). In 1997, Hevener and Bergman confirmed the neuronal origin of the detection mechanism by showing that glucose infusion in the portal vein induced a 66% decrease in epinephrine secretion compared with an infusion in the jugular vein (38). This inhibition was also found in portal denervation experiments (39). Therefore, hepatportal glucosensing depends on glucose detection by vagal nerve endings.

Molecular mechanisms. Hepatportal glucosensor cells respond to a gradient of glucose concentrations in the portal vein. The firing rate of hepatic afferent nerves is inversely related to the portal glucose concentration, with the rate of firing decreasing when the portal glucose level increases (64). This effect is observed over a range of portal blood glucose concentrations from 5.5 to >20 mM, which represents the physiological glucose levels found in this site. These findings clearly show that glucosensors send messages to the central nervous system in response to glucose fluctuations in the portal vein (Fig. 4).

The molecular partners involved in hepatportal glucosensing are poorly understood. Nonetheless, in the early 2000s, Burcelin et al. showed that the GLUT-2 receptor is required for glucose detection in fasted mice, as well as for pancreatic β -cell glucosensing (9). In their study, the authors demonstrated that GLUT-2-deficient mice do not increase their peripheral glucose utilization in response to portal vein glucose infusion (Fig. 4).

The same group also identified the GLP-1 receptor as a second critical partner for portal glucosensing. They found that coinfusion of glucose and exendin-9 (a GLP-1 receptor antagonist) in the portal vein inhibited glucose clearance and in-

duced a transient increase in glycemia (8). They then demonstrated that the effects of hepatportal glucosensing on muscle glucose utilization required other muscle players, including GLUT-4 and AMP-activated protein kinase (AMPK). Indeed, the infusion of glucose in the portal vein of mice with muscle-specific deletion of GLUT-4 induced similar glucose utilization in muscles to that observed after a femoral vein glucose infusion (7). Moreover, taking a similar approach, the authors showed that transgenic overexpression of a dominant-negative form of AMPK in mice also led to decreased glucose utilization (Fig. 4).

More recently, researchers have implicated SGLT-3 in portal glucosensing in conditions of low glucose flux. While portal glucose detection was inhibited by phlorizin (a specific inhibitor of SGLTs), infusion of 3-*O*-methylglucose (a nonmetabolizable glucose analog that is a substrate for all SGLTs but not GLUTs) activated portal glucosensing (20). These observations suggest the existence of a SGLT-3-dependent sensing mechanism in the portal vein.

Consequences on glucose homeostasis. The portal vein is the major site at which the organism receives the glucose absorbed by the intestine. Thus, by informing the body of glycemia changes, this site acts as a key player in the control of glucose homeostasis.

LIVER. The effects of portal vein glucosensing on the liver have been illuminated through the work of Gardemann et al. (30). These authors have developed a model to reproduce the glucose concentration gradient between the portal vein and the hepatic artery. By infusing high glucose concentrations in the portal vein and low concentrations in the hepatic artery of anesthetized rats, they were able to reproduce a feeding state and explore the consequences on hepatic glucose metabolism. When the glucose concentration is higher in the portal vein than in the hepatic artery, portal glucosensing leads to tissue glucose uptake in the first 10 min, ceasing in favor of hepatic storage (30). More details have been provided by Pagliassotti et al., who showed that portal signaling induces glycogen synthesis by the liver via glycogen synthase activation. Consequently, in response to portal glucosensing, there is a significant glycogen accumulation in this organ (70).

In the last few years, another mode of regulation has been revealed. The gut can also produce glucose through a gluconeogenesis pathway, but to a lesser extent than the liver. Similarly to the glucose in food, the glucose produced by the intestine moves into the portal vein and triggers a signal. Mithieux et al. suggested that information is transferred from the portal vein to the brain as a result of glucosensor stimulation, leading to an afferent nervous message. Integration of these messages in the central nervous system elicits suppression of hepatic glucose production (59).

SKELETAL MUSCLE AND ADIPOSE TISSUE. Portal glucosensing also has extrahepatic effects, since stimulation of portal sensors increases peripheral glucose utilization in a number of tissues. Infusion of 2-deoxy- ^{14}C glucose (a nonmetabolizable radiolabeled glucose analog) has facilitated the quantification of glucose uptake by different tissues, revealing that portal infusion of glucose promotes glucose utilization by oxidative muscles and brown adipose tissue (BAT) compared with infusion of glucose in the femoral vein (10). This concurs with Gardemann's experiments showing the kinetics of glucose distribution after portal glucosensing, as explained above (30).

This system provides for the distribution of glucose in the body according to its needs. Moreover, the mechanism by which the portal signal is transmitted to other tissues is certainly dependent on the activation of the ANS (10). This view is confirmed by the fact that hepatportal glucosensors are connected to afferent branches of the vagus nerve, which are able to change the activity of hypothalamic neurons, which, in turn, modify peripheral glucose utilization (Fig. 5).

PANCREAS. Portal glucosensors are sensitive to blood glucose changes. A wide variety of mechanisms control the balance between insulin and glucagon release to maintain glycemia at physiological values. Therefore, it is conceivable that portal vein glucosensors may also target the pancreas to control the release of these two hormones. Along this line, it has been clearly shown that a portal glucose bolus triggers the release of insulin by the pancreas, specifically during the first secretion phase (5). Nevertheless, the mechanisms linking portal glucosensing and glucagon release are still unknown.

Pathology. In T2D, the capacity for glucosensing in the portal vein is altered. Moore et al. showed that, in the pathological HFD condition, the signal sent by portal sensors in response to glucose detection is altered (61). More specifically, T2D is associated with enzymatic changes that alter portal glucose sensing. While glucosensing in the portal vein is associated with increases in GK and glycogen synthase in the liver, in T2D induced by HFD, the expression of these enzymes is decreased (15). This could explain the aberrant postprandial hepatic glucose metabolism observed in this pathology.

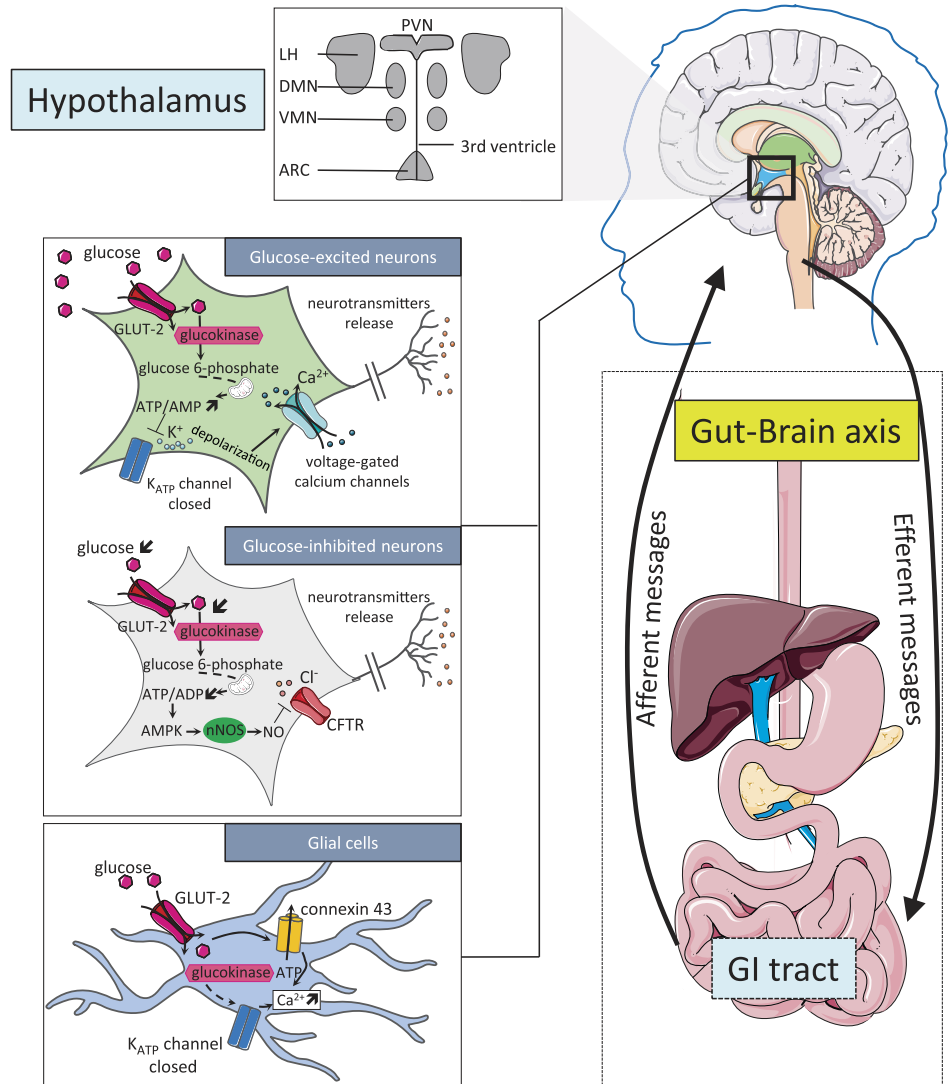
EXTRAGASTROINTESTINAL GLUCOSENSING: THE ROLE OF THE BRAIN

As described above, the brain is continuously informed about glucose fluctuations in the gastrointestinal tract via the gut-brain axis. The modulation of hypothalamic neuronal activity in response to gut signals controls metabolic functions, including peripheral glucose utilization. Furthermore, the brain is also able to directly detect glucose variations through specialized hypothalamic cells identified as glucosensors. In response to all of this glycemic information, the hypothalamus sends peripheral signals via the ANS to control whole body glucose metabolism.

Cell Types Involved

In 1964, Oomura et al. showed that hypothalamic neurons have the unusual ability to modify their firing rates in response to changes in glucose concentration (Fig. 5) (67, 91). Currently these neurons are classified into two categories based on their responses to physiological changes in extracellular glucose, i.e., neurons excited by glucose ("glucose-excited") and neurons inhibited by glucose ("glucose-inhibited") (81). During a meal, there is a rise in brain glucose levels (from 1 to 5 mM), which activates glucose-excited neurons and keeps glucose-inhibited neurons inactive. On the contrary, during a fasting period, reduction of the brain glucose concentration to 0.1 mM activates glucose-inhibited neurons and inhibits glucose-excited neurons (81). In the hypothalamus, glucose-excited neurons are found in the lateral part of the arcuate nucleus (ARC), whereas glucose-inhibited neurons are localized to

Fig. 5. The gut-brain axis and the key role of hypothalamic glucosensing. *Top*, schematic representation of a coronal section showing different hypothalamic nuclei, including the arcuate nucleus (ARC), ventromedial nuclei (VMN), dorsomedial nuclei (DMN), the lateral hypothalamus nucleus (LH), and paraventricular nuclei (PVN). The remainder of the figure highlights molecular mechanisms in different hypothalamic cell types involved in glucosensing, which contribute to glucose homeostasis via the gut-brain axis. In glucose-excited neurons, glucose enters via GLUT-2, is converted to glucose 6-phosphate by glucokinase, and is then used in the glycolytic pathway to generate ATP. The resultant increase in intracellular ATP levels inactivates K_{ATP} channels, leading to membrane depolarization and opening of Ca^{2+} channels. The massive influx of Ca^{2+} causes release of neurotransmitters. Conversely, glucose-inhibited neurons are sensitive to decreases in the glucose concentration. Here, less glucose enters the neurons through GLUT-2 and is metabolized by the glycolytic pathway, thus producing less cellular ATP. The decrease in the ATP-to-ADP ratio is detected by AMPK, which activates production of gaseous messenger nitric oxide (NO) by neuronal NO synthase (nNOS). Production of NO leads to the inhibition of specific chloride channels, including the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR), which is responsible for membrane depolarization. In glial cells, glucose enters into intracellular compartments via GLUT-2 and increases intracellular Ca^{2+} waves, a mechanism dependent on ATP release by connexin 43.



the medial part of the ARC and the ventromedial nuclei (VMN) (Fig. 5) (91).

Evidence indicates that, in addition to providing structural and functional support to neurons, brain glial cells are also involved in glucose detection. A peritoneal injection of 2-DG, which mimics peripheral hypoglycemia, typically leads to an increase of c-Fos labeling in neurons. However, this labeling is reduced when the animals are pretreated with a specific inhibitor of carbohydrate metabolism in glial cells (the methionine sulfoximine) (80). Among glial cells, hypothalamic astrocytes and tanycytes lining the third ventricle are the most studied in glucosensing (81). In addition, due to the strategic location of glial cells all along the blood vessels in the brain and the physical connection between astrocytes and endothelial cells via connexin 43, it is not difficult to imagine that these cells can directly sense glucose levels and convey signals to their neighboring neurons.

Molecular Mechanisms

Glucose-excited neurons. Glucose-excited neurons and β -cells of the pancreas share similarities in glucose responsive-

ness (81). Glucose enters via GLUT-2 into glucose-excited neurons, where it is converted to glucose 6-phosphate by GK and then used in the glycolytic pathway to generate ATP. The resultant increase in intracellular ATP level inactivates K_{ATP} channels, generating membrane depolarization and consequently the opening of Ca^{2+} channels. This massive influx of Ca^{2+} causes the release of neurotransmitters. The role of GLUT-2 in brain glucosensing has been clearly established: specific inhibition of GLUT-2 by antisense oligonucleotides suppressed the insulin response to intracarotidian glucose injection toward the brain (80). In addition to GLUT-2, glucose-excited neurons express other transporters that might participate in neuronal glucosensing mechanisms, namely the insulin-sensitive GLUT-4 and SGLT-1 (81). GK seems to play a key role in neuronal glucosensing, since knockdown of this enzyme by small-interfering RNA is associated with a decrease in glucosensitive neurons, both glucose-excited and glucose-inhibited varieties (80). In mice, deficiency of Kir6.2, a K_{ATP} channel subunit, leads to a loss of glucose responsiveness in glucose-excited neurons and a severe defect in glucagon secretion in response to systemic hypoglycemia (58). These

results demonstrate that K_{ATP} channels are also involved in neuronal glucosensing (Fig. 5). Finally, the involvement of mitochondrial ROS in hypothalamic glucosensing has clearly been shown. Indeed, bolus of glucose stimulates ROS generation on ex vivo hypothalamic slices (47). Moreover, intracarotid injection of glucose (therefore only perceived by the hypothalamus) in rats causes a significant increase in neuronal activity in the arcuate nucleus, and this effect is abolished by coinjection of antioxidant enzymes (47).

Glucose-inhibited neurons. When the central concentration of glucose decreases, the amount of glucose entering the neuron by GLUT-2 transporters also decreases. Consequently, there is less glucose entering the glycolytic pathway via GK and thus less cellular ATP. The decrease in the ATP-to-ADP ratio is detected by AMPK, which induces the production of the gaseous messenger NO by nNOS. Production of this neurotransmitter leads to the inhibition of specific chloride channels in glucose-inhibited neurons, particularly the cystic fibrosis transmembrane regulator. These channels are responsible for the membrane depolarization of glucose-inhibited neurons (80). Many effects of NO are mediated by the activation of soluble guanylyl cyclase receptor, both of which are critical for glucosensing in glucose-inhibited neurons (Fig. 5) (80).

Glial cells. Neurons are not the only glucose-sensitive cells in the brain. Indeed, tanycytes also express GLUT-2, GK, and K_{ATP} channels, suggesting that they are able to sense glucose (91). Moreover, studies have shown that glucose increases intracellular Ca^{2+} waves in cultured tanycytes, a mechanism dependent on ATP release by connexin 43 (91).

Astrocytes also play a role in glucosensing, since they express GLUT-2. Indeed, GLUT-2 KO mice fail to increase plasma glucagon levels following glucose deprivation. In addition, astrocyte-specific restoration of GLUT-2 expression in these mice is sufficient to restore glucagon production in response to hypoglycemia (Fig. 5) (53). As for tanycytes, connexin 43 seems to be required in brain glucose sensitivity through astrocytes. Astroglial connexins 43 form channels, allowing for the intercellular transfer of small molecules, such as glucose, throughout the astroglial networks. The inhibition of connexin 43 in the mediobasal hypothalamus attenuated hypothalamic glucose sensitivity in rats, which was demonstrated by a pronounced decreased insulin secretion in response to brain glucose challenge (45). Furthermore, in a second step, this glucose detection by astrocytes allows the activation of glucose-sensitive neurons. Indeed, glucose can enter into astrocytes via GLUT-2 transporter, to be stored as glycogen, or to be converted into lactate by the lactate dehydrogenase A. This lactate could leave these astrocytes by monocarboxylate transporters-1 and -4, and enter into glucose-sensitive neurons via the monocarboxylate transporter-2. At this site, lactate will continue its oxidation and participate in these neurons activation (45). This lactate shuttle between astrocytes and glucose-sensitive neurons is also suggested in hypoglycemia detection and involve NO signaling (28). All of these observations reinforce the role of astrocytes in brain glucosensing mechanisms.

Consequences for Glucose Homeostasis

In response to glucose detection, the hypothalamus maintains glucose homeostasis by generating messages that are transmitted to peripheral tissues by the ANS. The targeted tissues are the pancreas, the liver, skeletal muscles, and adipose tissues (both white and brown).

Pancreas. The pancreas secretes two hormones that govern glucose metabolism, insulin and glucagon. As previously described in this review (see *Glucosensing in the Pancreas* above), increases in blood glucose are detected by β -cells, leading to exocytosis of insulin-containing vesicles. This insulin release is also controlled by the ANS, more particularly by the parasympathetic nervous system (PNS) (2). In the rat hypothalamus, an intracarotid glucose load induces a peak in plasma insulin 1–3 min later, without modifying peripheral glucose levels (47). Coadministration of antioxidant molecules inhibits this insulin secretion, suggesting a key role of brain ROS in the insulin secretion induced by the cerebral glucose load (47).

Similar to insulin, glucagon secretion is controlled by the hypothalamus. Hypoglycemia increases the activity of the sympathetic nervous system (SNS) by stimulating α -cells to release glucagon (98). Glucagon secretion in response to hypoglycemia is abolished by glucose injection in the VMN (98). The main hypothalamic actor involved in this hypoglycemia detection in the VMN seems to be NO, since intra-VMN injection of a NOS inhibitor slowed the recovery of euglycemia after hypoglycemia (27).

Liver. The hypothalamus is extensively involved in the liver's contribution to glucose metabolism via the ANS. Indeed, electrical stimulation of the VMN, as well as direct activation of hepatic sympathetic nervous fibers, triggers an increase in hepatic glucose production (88, 89). Conversely, electrical stimulation of the lateral hypothalamic area or direct activation of hepatic parasympathetic nervous fibers leads to a decrease in hepatic glucose production (88, 89). K_{ATP} channels seem to play a key role in these mechanisms, since intracerebroventricular injection of a channel blocker prevented the inhibition of hepatic glucose production mediated by insulin (74).

Skeletal muscles. The brain also impacts glucose metabolism in muscles via the ANS. For example, activation of the SNS leads to an increase in glucose uptake and glycogenesis in skeletal muscles (66).

Adipose tissues. BAT contributes to the regulation of body temperature in response to cold by inducing thermogenesis mechanisms. This activity is also controlled by the SNS. Moreover, intracerebroventricular injection of glucose increases SNS activity in BAT, whereas intracerebroventricular injection of 2-DG reduces SNS activity in BAT, leading to hypothermia (91). These results demonstrate the impact of central glucosensing on thermogenesis.

White adipose tissue stores excess blood glucose in the form of lipid droplets. This activity is also promoted by the brain, since SNS activation induces glucose uptake in this tissue through an increase in GLUT-4 translocation (66).

Pathology

Given the involvement of central glucosensors in glucose homeostasis, evidence suggests that impaired glucosensing in

the hypothalamus could trigger metabolic disorders such as T2D. Indeed, if glucosensing neurons become hypersensitive to small decreases in glucose levels, they could send inappropriate energy deficit signals to the brain. The consequence would be the activation of energy-sparing mechanisms to counteract the perceived deficit, thereby leading to the development of obesity and T2D. In support of this hypothesis, Colombani et al. showed that intracarotidian injection of a low glucose concentration (that does not raise the systemic glucose level) is sufficient to produce an increase in plasma insulin in obese Zucker rats, but not in their lean littermates (16). This result is consistent with an increased response of glucose-inhibited neurons to decreased glucose concentrations. Moreover, inhibition of VMN glucose-excited neurons to midrange decreases in glucose is significantly enhanced in diabetic Db/Db mice (17). Thus, in the case of T2D, the brain perceives glucose deficits under conditions of energy sufficiency/excess, leading to pathological exacerbation.

CONCLUSION

Gastrointestinal glucosensing fulfills a fundamental role in postprandial glucose homeostasis, orchestrating specific multieffector responses to the glucose ingested with food. The increasing attention paid to the gastrointestinal tract in the regulation of whole body glucose metabolism has led to significant progress in elucidating the molecular mechanisms underlying its ability to sense glucose. Indeed, the oral cavity, small intestine, pancreas, and portal vein act in concert, releasing hormones or activating nerve routes, to maintain glycemia in the face of glucose variations. Furthermore, all of these organs are in close communication with the hypothalamus, itself able to detect glucose and to adjust its production and utilization. The gastrointestinal tract plays an important glucoregulatory role, but not only in the glucosensing process, since intestinal lipid sensing also sends afferent nervous messages to the hypothalamus to regulate glycemia (6). Thus, the gut-brain axis represents a major regulatory checkpoint in the control of energy homeostasis.

In addition to the well-described chemosensing mechanisms, it is becoming clear that modifications of intestinal motility can also impact hypothalamic neuronal activity and, subsequently, glycemic control (29, 93). Because impaired glucose chemosensing is observed in diabetic contexts, further studies based on intestinal mechanosensing and peripheral glucose utilization via the gut-brain axis are needed to open new perspectives on the development of novel therapeutic strategies for the treatment of metabolic diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Societe Francaise de Nutrition (SFN) and the Fondation Recherche Médicale (FRM) (Grant ING20150532586) for financial support. P. D. Cani is the recipient of grants from the FNRS (convention J.0084.15, convention 3.4579.11), PDR (Projet de Recherche, convention: T.0138.14), FRM (Fondation Recherche Medicale), and ARC (Action de Recherche Concertée-Communauté française de Belgique convention: 12/17-047). P. D. Cani is also a recipient of an ERC Starting Grant 2013 (European Research Council, Starting grant 336452-ENIGMO). C. Cirillo is a postdoctoral fellow of the Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek (FWO, Belgium).

GRANTS

This work was supported by the Fonds de la Recherche Scientifique-FNRS for the FRFS-WELBIO under grant WELBIO-CR-2012S-02R. This work was

also supported in part by the Funds InBev-Baillet Latour (Grant for Medical Research 2015).

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.F., A.M., A.A., and C.P. prepared figures; A.F., A.M., A.A., C.P., P.D.C., and C.K. drafted manuscript; A.F., A.M., A.A., C.P., C.C., P.D.C., and C.K. edited and revised manuscript; A.F., A.M., A.A., C.P., C.C., P.D.C., and C.K. approved final version of manuscript.

REFERENCES

- Adachi A, Shimizu N, Oomura Y, Kobashi M. Convergence of hepatoportal glucose-sensitive afferent signals to glucose-sensitive units within the nucleus of the solitary tract. *Neurosci Lett* 46: 215–218, 1984.
- Ahren B. Autonomic regulation of islet hormone secretion—implications for health and disease. *Diabetologia* 43: 393–410, 2000.
- Ahren B. Glucagon—early breakthroughs and recent discoveries. *Peptides* 67: 74–81, 2015.
- Amato A, Cinci L, Rotondo A, Serio R, Fausone-Pellegrini MS, Vannucchi MG, Mule F. Peripheral motor action of glucagon-like peptide-1 through enteric neuronal receptors. *Neurogastroenterol Motil* 22: 664–e203, 2010.
- Balkan B, Li X. Portal GLP-1 administration in rats augments the insulin response to glucose via neuronal mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R1449–R1454, 2000.
- Blouet C, Schwartz GJ. Duodenal lipid sensing activates vagal afferents to regulate non-shivering brown fat thermogenesis in rats. *PLoS One* 7: e51898, 2012.
- Burcelin R, Crivelli V, Perrin C, Da Costa A, Mu J, Kahn BB, Birnbaum MJ, Kahn CR, Vollenweider P, Thorens B. GLUT4, AMP kinase, but not the insulin receptor, are required for hepatoportal glucose sensor-stimulated muscle glucose utilization. *J Clin Invest* 111: 1555–1562, 2003.
- Burcelin R, Da Costa A, Drucker D, Thorens B. Glucose competence of the hepatoportal vein sensor requires the presence of an activated glucagon-like peptide-1 receptor. *Diabetes* 50: 1720–1728, 2001.
- Burcelin R, Dolci W, Thorens B. Glucose sensing by the hepatoportal sensor is GLUT2-dependent: in vivo analysis in GLUT2-null mice. *Diabetes* 49: 1643–1648, 2000.
- Burcelin R, Dolci W, Thorens B. Portal glucose infusion in the mouse induces hypoglycemia: evidence that the hepatoportal glucose sensor stimulates glucose utilization. *Diabetes* 49: 1635–1642, 2000.
- Burcelin R, Knauf C, Cani PD. Pancreatic alpha-cell dysfunction in diabetes. *Diabetes Metab* 34, Suppl 2: S49–S55, 2008.
- Cabou C, Cani PD, Campistron G, Knauf C, Mathieu C, Sartori C, Amar J, Scherrer U, Burcelin R. Central insulin regulates heart rate and arterial blood flow: an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism altered during diabetes. *Diabetes* 56: 2872–2877, 2007.
- Cai H, Maudsley S, Martin B. What is the role of metabolic hormones in taste buds of the tongue. *Front Horm Res* 42: 134–146, 2014.
- Chandrashekar J, Hoon MA, Ryba NJ, Zuker CS. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* 444: 288–294, 2006.
- Coate KC, Kraft G, Irimia JM, Smith MS, Farmer B, Neal DW, Roach PJ, Shiota M, Cherrington AD. Portal vein glucose entry triggers a coordinated cellular response that potentiates hepatic glucose uptake and storage in normal but not high-fat/high-fructose-fed dogs. *Diabetes* 62: 392–400, 2013.
- Colombani AL, Carneiro L, Benani A, Galinier A, Jaillard T, Duparc T, Offer G, Lorsignol A, Magnan C, Casteilla L, Penicaud L, Leloup C. Enhanced hypothalamic glucose sensing in obesity: alteration of redox signaling. *Diabetes* 58: 2189–2197, 2009.
- Cotero VE, Zhang BB, Routh VH. The response of glucose-excited neurons in the ventromedial hypothalamus to decreased glucose is enhanced in a murine model of type 2 diabetes mellitus. *J Neuroendocrinol* 22: 65–74, 2010.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378: 785–789, 1995.
- Damak S, Rong M, Yasumatsu K, Kokrashvili Z, Varadarajan V, Zou S, Jiang P, Ninomiya Y, Margolskee RF. Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science* 301: 850–853, 2003.

20. Delaere F, Duchamp A, Mounien L, Seyer P, Duraffourd C, Zitoun C, Thorens B, Mithieux G. The role of sodium-coupled glucose co-transporter 3 in the satiety effect of portal glucose sensing. *Mol Metab* 2: 47–53, 2012.
21. Depoortere I. Taste receptors of the gut: emerging roles in health and disease. *Gut* 63: 179–190, 2014.
22. Diez-Sampedro A, Hirayama BA, Osswald C, Gorboulev V, Baumgarten K, Volk C, Wright EM, Koepsell H. A glucose sensor hiding in a family of transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 11753–11758, 2003.
23. Duca FA, Bauer PV, Hamr SC, Lam TK. Glucoregulatory relevance of small intestinal nutrient sensing in physiology, bariatric surgery, and pharmacology. *Cell Metab* 22: 367–380, 2015.
24. Duparc T, Colom A, Cani PD, Massaly N, Rastrelli S, Drougard A, Le Gonidec S, Mouldous L, Frances B, Leclercq I, Llorens-Cortes C, Pospisilik JA, Delzenne NM, Valet P, Castan-Laurell I, Knauf C. Central apelin controls glucose homeostasis via a nitric oxide-dependent pathway in mice. *Antioxid Redox Signal* 15: 1477–1496, 2011.
25. Duparc T, Naslain D, Colom A, Muccioli GG, Massaly N, Delzenne NM, Valet P, Cani PD, Knauf C. Jejunum inflammation in obese and diabetic mice impairs enteric glucose detection and modifies nitric oxide release in the hypothalamus. *Antioxid Redox Signal* 14: 415–423, 2011.
26. Finger TE, Danilova V, Barrows J, Bartel DL, Vigers AJ, Stone L, Hellekant G, Kinnamon SC. ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science* 310: 1495–1499, 2005.
27. Fioramonti X, Marsollier N, Song Z, Fakira KA, Patel RM, Brown S, Duparc T, Pica-Mendez A, Sanders NM, Knauf C, Valet P, McCrimmon RJ, Beuve A, Magnan C, Routh VH. Ventromedial hypothalamic nitric oxide production is necessary for hypoglycemia detection and counterregulation. *Diabetes* 59: 519–528, 2010.
28. Fioramonti X, Song Z, Vazirani RP, Beuve A, Routh VH. Hypothalamic nitric oxide in hypoglycemia detection and counterregulation: a two-edged sword. *Antioxid Redox Signal* 14: 505–517, 2011.
29. Fournel A, Drougard A, Duparc T, Marlin A, Brierley SM, Castro J, Le-Gonidec S, Masri B, Colom A, Lucas A, Rousset P, Cenac N, Vergnolle N, Valet P, Cani PD, Knauf C. Apelin targets gut contraction to control glucose metabolism via the brain. *Gut* In press.
30. Gardemann A, Strulik H, Jungermann K. A portal-arterial glucose concentration gradient as a signal for an insulin-dependent net glucose uptake in perfused rat liver. *FEBS Lett* 202: 255–259, 1986.
31. Geraedts MC, Munger SD. Gustatory stimuli representing different perceptual qualities elicit distinct patterns of neuropeptide secretion from taste buds. *J Neurosci* 33: 7559–7564, 2013.
32. Gerspach AC, Steinert RE, Schonenberger L, Graber-Maier A, Beglinger C. The role of the gut sweet taste receptor in regulating GLP-1, PYY, and CCK release in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301: E317–E325, 2011.
33. Goke B. Islet cell function: alpha and beta cells—partners towards normoglycaemia. *Int J Clin Pract Suppl* 2–7, 2008.
34. Gu W, Lloyd DJ, Chinookswong N, Komorowski R, Sivits G Jr, Graham M, Winters KA, Yan H, Boros LG, Lindberg RA, Veniant MM. Pharmacological targeting of glucagon and glucagon-like peptide 1 receptors has different effects on energy state and glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *J Pharmacol Exp Ther* 338: 70–81, 2011.
35. Hamano K, Nakagawa Y, Ohtsu Y, Li L, Medina J, Tanaka Y, Masuda K, Komatsu M, Kojima I. Lactisole inhibits the glucose-sensing receptor T1R3 expressed in mouse pancreatic beta-cells. *J Endocrinol* 226: 57–66, 2015.
36. Havel PJ, Akpan JO, Curry DL, Stern JS, Gingerich RL, Ahren B. Autonomic control of pancreatic polypeptide and glucagon secretion during neuroglucopenia and hypoglycemia in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 265: R246–R254, 1993.
37. Heimberg H, De Vos A, Moens K, Quartier E, Bouwens L, Pipeleers D, Van Schaftingen E, Madsen O, Schuit F. The glucose sensor protein glucokinase is expressed in glucagon-producing alpha-cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7036–7041, 1996.
38. Hevener AL, Bergman RN, Donovan CM. Novel glucosensor for hypoglycemic detection localized to the portal vein. *Diabetes* 46: 1521–1525, 1997.
39. Hevener AL, Bergman RN, Donovan CM. Portal vein afferents are critical for the sympathoadrenal response to hypoglycemia. *Diabetes* 49: 8–12, 2000.
40. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev* 87: 1409–1439, 2007.
41. Jacobson DA, Wicksteed BL, Philipson LH. The alpha-cell conundrum: ATP-sensitive K⁺ channels and glucose sensing. *Diabetes* 58: 304–306, 2009.
42. Kellett GL, Brot-Laroche E. Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption. *Diabetes* 54: 3056–3062, 2005.
43. Knauf C, Cani PD, Kim DH, Iglesias MA, Chabo C, Waget A, Colom A, Rastrelli S, Delzenne NM, Drucker DJ, Seeley RJ, Burcelin R. Role of central nervous system glucagon-like Peptide-1 receptors in enteric glucose sensing. *Diabetes* 57: 2603–2612, 2008.
44. Laffitte A, Neiers F, Briand L. Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 17: 379–385, 2014.
45. Leloup C, Allard C, Carneiro L, Fioramonti X, Collins S, Penicaud L. Glucose and hypothalamic astrocytes: more than a fueling role? *Neuroscience* In press.
46. Leloup C, Casteilla L, Carriere A, Galinier A, Benani A, Carneiro L, Penicaud L. Balancing mitochondrial redox signaling: a key point in metabolic regulation. *Antioxid Redox Signal* 14: 519–530, 2011.
47. Leloup C, Magnan C, Benani A, Bonnet E, Alquier T, Offer G, Carriere A, Periquet A, Fernandez Y, Ktorza A, Casteilla L, Penicaud L. Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing. *Diabetes* 55: 2084–2090, 2006.
48. Liu M, Seino S, Kirchgessner AL. Identification and characterization of glucoreponsive neurons in the enteric nervous system. *J Neurosci* 19: 10305–10317, 1999.
49. Loper HB, La Sala M, Dotson C, Steinle N. Taste perception, associated hormonal modulation, and nutrient intake. *Nutr Rev* 73: 83–91, 2015.
50. Lotfy M, Kalasz H, Szalai G, Singh J, Adeghate E. Recent progress in the use of glucagon and glucagon receptor antagonists in the treatment of diabetes mellitus. *Open Med Chem J* 8: 28–35, 2014.
51. MacDonald PE, Joseph JW, Rorsman P. Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360: 2211–2225, 2005.
52. Mace OJ, Affleck J, Patel N, Kellett GL. Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2. *J Physiol* 582: 379–392, 2007.
53. Marty N, Dallaporta M, Foretz M, Emery M, Tarussio D, Bady I, Binnert C, Beermann F, Thorens B. Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors. *J Clin Invest* 115: 3545–3553, 2005.
54. Matschinsky F, Liang Y, Kesavan P, Wang L, Froguel P, Velho G, Cohen D, Permutt MA, Tanizawa Y, Jetton TL. Glucokinase as pancreatic beta cell glucose sensor and diabetes gene. *J Clin Invest* 92: 2092–2098, 1993.
55. Mei N. Intestinal chemosensitivity. *Physiol Rev* 65: 211–237, 1985.
56. Merigo F, Benati D, Cristofoletti M, Osculati F, Sbarbati A. Glucose transporters are expressed in taste receptor cells. *J Anat* 219: 243–252, 2011.
57. Mierson S, DeSimone SK, Heck GL, DeSimone JA. Sugar-activated ion transport in canine lingual epithelium. Implications for sugar taste transduction. *J Gen Physiol* 92: 87–111, 1988.
58. Miki T, Liss B, Minami K, Shiuchi T, Saraya A, Kashima Y, Horiuchi M, Ashcroft F, Minokoshi Y, Roeper J, Seino S. ATP-sensitive K⁺ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nat Neurosci* 4: 507–512, 2001.
59. Mithieux G, Andreelli F, Magnan C. Intestinal gluconeogenesis: key signal of central control of energy and glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 12: 419–423, 2009.
60. Mohammad S, Ramos LS, Buck J, Levin LR, Rubino F, McGraw TE. Gastric inhibitory peptide controls adipose insulin sensitivity via activation of cAMP-response element-binding protein and p110beta isoform of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 286: 43062–43070, 2011.
61. Moore MC, Coate KC, Winnick JJ, An Z, Cherrington AD. Regulation of hepatic glucose uptake and storage in vivo. *Adv Nutr* 3: 286–294, 2012.
62. Mwangi S, Anitha M, Mallikarjun C, Ding X, Hara M, Parsadanian A, Larsen CP, Thule P, Sitaraman SV, Anania F, Srinivasan S. Glial cell line-derived neurotrophic factor increases beta-cell mass and improves glucose tolerance. *Gastroenterology* 134: 727–737, 2008.
63. Nauck MA, Niedereichholz U, Ettl R, Holst JJ, Orskov C, Ritzel R, Schmiegel WH. Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 273: E981–E988, 1997.
64. Nijima A. Glucose-sensitive afferent nerve fibres in the hepatic branch of the vagus nerve in the guinea-pig. *J Physiol* 332: 315–323, 1982.

65. **Ninomiya Y, Sako N, Imai Y.** Enhanced gustatory neural responses to sugars in the diabetic *db/db* mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 269: R930–R937, 1995.
66. **Nonogaki K.** New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia* 43: 533–549, 2000.
67. **Oomura Y, Kimura K, Ooyama H, Maeno T, Iki M, Kuniyoshi M.** Reciprocal activities of the ventromedial and lateral hypothalamic areas of cats. *Science* 143: 484–485, 1964.
68. **Orci L, Thorens B, Ravazzola M, Lodish HF.** Localization of the pancreatic beta cell glucose transporter to specific plasma membrane domains. *Science* 245: 295–297, 1989.
69. **Oyama Y, Yamano H, Ohkuma A, Ogawara K, Higaki K, Kimura T.** Carrier-mediated transport systems for glucose in mucosal cells of the human oral cavity. *J Pharm Sci* 88: 830–834, 1999.
70. **Pagliassotti MJ, Holste LC, Moore MC, Neal DW, Cherrington AD.** Comparison of the time courses of insulin and the portal signal on hepatic glucose and glycogen metabolism in the conscious dog. *J Clin Invest* 97: 81–91, 1996.
71. **Pai MH, Ko TL, Chou HC.** Effects of streptozotocin-induced diabetes on taste buds in rat vallate papillae. *Acta Histochem* 109: 200–207, 2007.
72. **Perea A, Vinambres C, Clemente F, Villanueva-Penacarrillo ML, Valverde I.** GLP-1 (7–36) amide: effects on glucose transport and metabolism in rat adipose tissue. *Horm Metab Res* 29: 417–421, 1997.
73. **Pfannkuche H, Gabel G.** Glucose, epithelium, and enteric nervous system: dialogue in the dark. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 93: 277–286, 2009.
74. **Pocai A, Lam TK, Gutierrez-Juarez R, Obici S, Schwartz GJ, Bryan J, Aguilar-Bryan L, Rossetti L.** Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature* 434: 1026–1031, 2005.
75. **Psichas A, Reimann F, Gribble FM.** Gut chemosensing mechanisms. *J Clin Invest* 125: 908–917, 2015.
76. **Quesada I, Tuduri E, Ripoll C, Nadal A.** Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol* 199: 5–19, 2008.
77. **Richards P, Parker HE, Adriaenssens AE, Hodgson JM, Cork SC, Trapp S, Gribble FM, Reimann F.** Identification and characterization of GLP-1 receptor-expressing cells using a new transgenic mouse model. *Diabetes* 63: 1224–1233, 2014.
78. **Rorsman P, Eliasson L, Renstrom E, Gromada J, Barg S, Gopel S.** The cell physiology of biphasic insulin secretion. *News Physiol Sci* 15: 72–77, 2000.
79. **Rossi J, Santamaki P, Airaksinen MS, Herzog KH.** Parasympathetic innervation and function of endocrine pancreas requires the glial cell line-derived factor family receptor alpha2 (GFRalpha2). *Diabetes* 54: 1324–1330, 2005.
80. **Routh VH.** Glucose sensing neurons in the ventromedial hypothalamus. *Sensors (Basel)* 10: 9002–9025, 2010.
81. **Routh VH, Hao L, Santiago AM, Sheng Z, Zhou C.** Hypothalamic glucose sensing: making ends meet. *Front Syst Neurosci* 8: 236, 2014.
82. **Russek M.** Participation of hepatic glucoreceptors in the control of intake of food. *Nature* 197: 79–80, 1963.
83. **Saltiel AR, Kahn CR.** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799–806, 2001.
84. **Sayegh AI, Covasa M, Ritter RC.** Intestinal infusions of oleate and glucose activate distinct enteric neurons in the rat. *Auton Neurosci* 115: 54–63, 2004.
85. **Schuit FC, Huypens P, Heimberg H, Pipeleers DG.** 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, 2001.
86. **Shepherd PR, Kahn BB.** Glucose transporters and insulin action—implications for insulin resistance and diabetes mellitus [comment]. *N Engl J Med* 341: 248–257, 1999.
87. **Shigemura N, Ohta R, Kusakabe Y, Miura H, Hino A, Koyano K, Nakashima K, Ninomiya Y.** Leptin modulates behavioral responses to sweet substances by influencing peripheral taste structures. *Endocrinology* 145: 839–847, 2004.
88. **Shimazu T, Amakawa A.** Regulation of glycogen metabolism in liver by the autonomic nervous system. III. Differential effects of sympathetic-nerve stimulation and of catecholamines on liver phosphorylase. *Biochim Biophys Acta* 165: 349–356, 1968.
89. **Shimazu T, Amakawa A.** Regulation of glycogen metabolism in liver by the autonomic nervous system. II. Neural control of glycogenolytic enzymes. *Biochim Biophys Acta* 165: 335–348, 1968.
90. **Shin YK, Martin B, Golden E, Dotson CD, Maudsley S, Kim W, Jang HJ, Mattson MP, Drucker DJ, Egan JM, Munger SD.** Modulation of taste sensitivity by GLP-1 signaling. *J Neurochem* 106: 455–463, 2008.
91. **Steinbusch L, Labouebe G, Thorens B.** Brain glucose sensing in homeostatic and hedonic regulation. *Trends Endocrinol Metab* 26: 455–466, 2015.
92. **Villar-Palaci C.** On the mechanism of inactivation of muscle glycogen phosphorylase by insulin. *Biochim Biophys Acta* 1224: 384–388, 1994.
93. **Weber C.** Neurogastroenterology: improving glucose tolerance via the gut-brain axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13: 4, 2016.
94. **Wright EM, Martin MG, Turk E.** Intestinal absorption in health and disease—sugars. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17: 943–956, 2003.
95. **Yamamoto H, Lee CE, Marcus JN, Williams TD, Overton JM, Lopez ME, Hollenberg AN, Baggio L, Saper CB, Drucker DJ, Elmquist JK.** Glucagon-like peptide-1 receptor stimulation increases blood pressure and heart rate and activates autonomic regulatory neurons. *J Clin Invest* 110: 43–52, 2002.
96. **Zhang XJ, Wang YQ, Long Y, Wang L, Li Y, Gao FB, Tian HM.** Alteration of sweet taste in high-fat diet induced obese rats after 4 weeks treatment with exenatide. *Peptides* 47: 115–123, 2013.
97. **Zhou LH, Liu XM, Feng XH, Han LO, Liu GD.** Expression of alpha-gustducin in the circumvallate papillae of taste buds of diabetic rats. *Acta Histochem* 111: 145–149, 2009.
98. **Zhu W, Czyzyk D, Paranjape SA, Zhou L, Horblitt A, Szabo G, Seashore MR, Sherwin RS, Chan O.** Glucose prevents the fall in ventromedial hypothalamic GABA that is required for full activation of glucose counterregulatory responses during hypoglycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E971–E977, 2010.
99. **Zou CY, Gong Y, Liang J.** Metabolic signaling of insulin secretion by pancreatic beta-cell and its derangement in type 2 diabetes. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 18: 2215–2227, 2014.



Technical note

Maternal obesity alters the apelinergic system at the feto-maternal interface



Sandy Hanssens ^{a, b, 1}, Aurore Marx-Deseure ^{a, b, 1}, Simon Lecoutre ^c, Laura Butruille ^b, Audren Fournel ^d, Claude Knauf ^d, Capucine Besengez ^b, Christophe Breton ^c, Laurent Storme ^{a, e}, Philippe Deruelle ^{a, b, 2}, Jean Lesage ^{c, *, 2}

^a CHRU of Lille, Jeanne de Flandre Hospital, Gynecology-Obstetrics, Lille, France

^b Univ. Lille, Unité Environnement Périnatal et Santé, EA 4489, Faculté de Médecine, Pôle recherche, IFR 114, 59045 Lille, France

^c University of Lille 1, EA 4489, Villeneuve d'Ascq, France

^d Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Team 3, INSERM U1048, 31432 Toulouse, France

^e CHRU of Lille, Jeanne de Flandre Hospital, Neonatal Reanimation, Lille, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 September 2015

Received in revised form

4 January 2016

Accepted 6 January 2016

Keywords:

Maternal obesity

Apelin

APJ

Fetus

Placenta

Mice

ABSTRACT

Apelin and its receptor APJ have been implicated in pathologies including cardiovascular disease, diabetes and obesity. Little is known about the function of the apelinergic system during gestation. We evaluated in mice this system at the feto-maternal interface in insulin-resistant obese female (HF) mice. Maternal apelinemia was decreased at term and fetal apelinemia was sixfold higher than maternal level. Ex-vivo, the placenta releases apelin at E12.5 and E18.5. In HF pregnant mice at term, apelinemia as well as placental apelin and APJ mRNA levels were increased whereas placental release of apelin was drastically reduced compared to controls.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Apelin is a regulatory peptide, identified as an endogenous ligand of the apelin receptor named APJ [1]. Apelin gene encodes a 77-amino-acid preproprotein that generates during post-translational processing several molecular isoforms such as apelin-36, apelin-17 and apelin-13 [2,3]. Apelin is an adipokine, also expressed across a wide range of tissues with its receptor APJ [4,5]. The apelinergic system is involved in numerous physiological processes such as vasoconstriction and dilatation, strengthening of heart muscle contractility, angiogenesis, and regulation of energy metabolism and fluid homeostasis [3,6]. Recently, apelin has been extensively described as a beneficial factor regarding to glucose metabolism and cardiovascular functions [7,8]. Little is known

about the biology of the apelinergic system during pregnancy. APJ deficiency in mice causes early embryonic defects and leads to embryonic lethality due to growth retardation and cardiac malformations [9]. In humans, conflicting findings have been reported for this system under preeclampsia and gestational diabetes conditions [10,11]. To gain further insight into apelin/APJ physiology during gestation and its putative modulation by maternal obesity and/or diabetes, we investigated in normal mice and in insulin-resistant obese female mice fed with a high-fat diet (HF): 1/ the kinetics of apelin plasma levels in mother/fetus pairs during gestation and at term, 2/ the ex-vivo placental apelin release, 3/ the gene expression levels of apelin and APJ in the placenta at term.

2. Methods

2.1. Animals

5-week-old female C57BL/6 mice (Janvier, France) were randomized in two groups: a control (C) group (n = 30) fed with a standard diet (SAFE A04, containing 7% fat, 72% carbohydrate, 19%

* Corresponding author. Unité environnement périnatal et santé, EA 4489, Université de Lille1, Bâtiment SN4, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France.

E-mail address: jean.lesage@univ-lille1.fr (J. Lesage).

¹ These authors contributed equally to this work.

² Share senior authorship.

protein) and a HF group ($n = 30$) fed with a high-fat diet (Special Diets Service, containing 44% fat, 35% carbohydrate, 20% protein) during 11 weeks. Mice were weighed weekly and experiments were approved by the animal ethics committee from the University of Lille.

2.2. Oral glucose tolerance test and tissues collections during gestation

After 10 weeks, an oral glucose tolerance test (OGTT) was performed in C and HF mice after 6 h of fasting. Mice received an oral glucose load (2 g/kg) and blood glucose level was determined using a glucometer (Roche, France) after 0, 15, 30, 60, 90 and 120 min. Plasma samples were used for insulinemia measurement and

insulin resistance was calculated using the HOMA-IR index. Then, mice were mated and they were weighed along the gestation. Ten mice of each group were sacrificed by decapitation at E6.5, E12.5 and E18.5 and trunk blood samples were collected. At E12.5 and E18.5, fetuses and placentas were collected after cesarean section and weighed. At E18.5, trunk blood samples of fetuses were collected and some placentas were frozen and stored at -80°C .

2.3. Placental apelin release

After cesarean section, E12.5 and E18.5 placentas ($n = 10/\text{group}/\text{stage}$) were collected, cut in two pieces, and rinsed in saline and incubated for 24 h in dish plates containing 2 ml of DMEM (Gibco). Dish plates were placed at 37°C with 95% $\text{O}_2/5\% \text{CO}_2$ and 95%

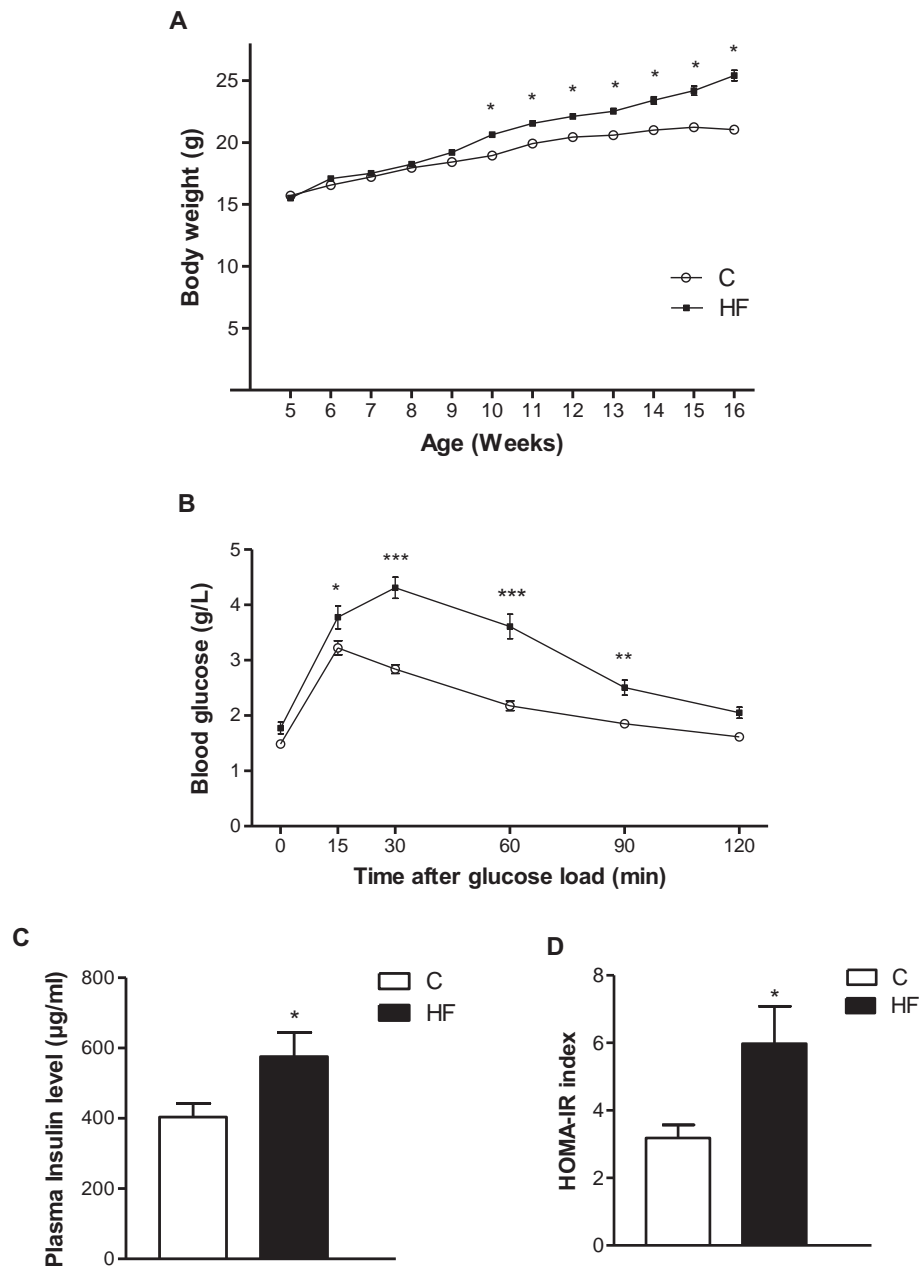


Fig. 1. Body weight curves of female mice from the age of 5 weeks–16 (A). Female mice were fed with a control (C) or a high-fat (HF) diet beginning at the age of 5 weeks ($n = 30$ mice/group). Oral glucose tolerance test (OGTT) in 15-week-old mice after 10 weeks of feeding with C or HF diet (B). Plasma insulin concentrations (C) and calculated HOMA-IR index (D) in 15-week-old C and HF female mice after 6 h of fasting. Values are means \pm S.E.M. ($n = 15$ mice/group in Fig. 1B–D). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ HF vs C group.

humidity. Samples of medium were collected after 2, 6 and 24 h of incubation for determination of apelin concentrations.

2.4. Endocrine and circulating parameters

Commercially available ELISA kits were used to measure plasma insulin (DRG International) and apelin (Phoenix Pharmaceuticals, catalog number: EK-057-23 that assayed all isoforms of apelin) levels. Blood glucose was measured using a glucometer (Roche Diagnostics).

2.5. RT-qPCR analysis

Methods for RT-qPCR analysis have been previously described [12]. RT-qPCR was performed with a Light Cycler 480 SYBR Green I master and a LightCycler480 (Roche). Primers for apelin, APJ and housekeeping genes (GAPDH and β -actin) used for the normalization are reported in the [Supplemental table 1](#).

2.6. Statistical analysis

Results are reported as means \pm SEM. Statistical analyses were

performed using Student's t-tests and ANOVA followed by Newman–Keuls post hoc test.

3. Results

3.1. Apelin/APJ system in pregnant mice (control group)

We found that maternal apelinemia is elevated at E6.5 and E12.5 and decreased at E18.5 ($P < 0.05$) compared to E12.5 level (Fig. 2B). In E18.5 fetuses, we observed that plasma apelin levels are sixfold higher than maternal level ($P < 0.01$; Fig. 2C). *Ex-vivo*, mouse placentas are able to release significant amount of apelin at E12.5 and E18.5 (Fig. 2D/E).

3.2. Apelin/APJ system in insulin-resistant obese pregnant mice (HF group)

After ten weeks of feeding with a high-fat diet, mice became obese (+20% of body weight, $P < 0.05$; Fig. 1A) and insulin-resistant (Fig. 1B–D). During the first two weeks of gestation, HF mice had a higher body weight than controls ($P < 0.05$) but not during the third week of gestation (Fig. 2A). Maternal apelinemia was similar to

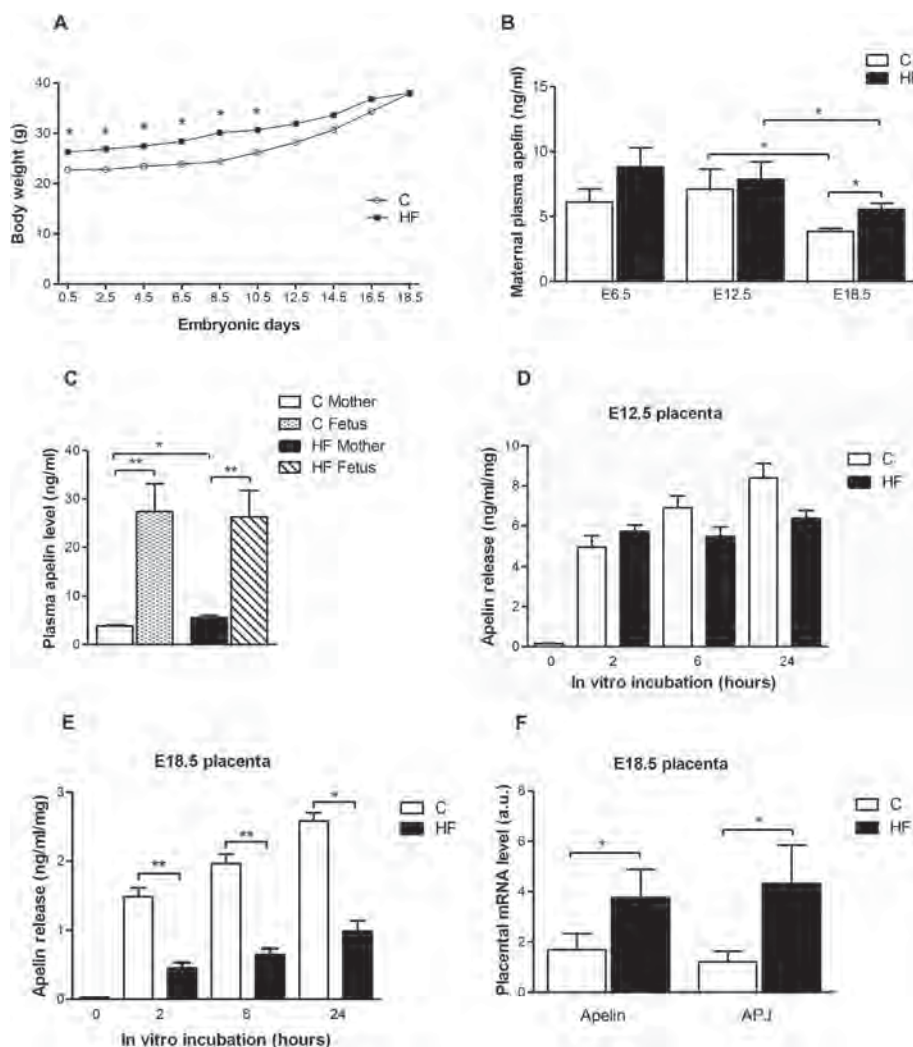


Fig. 2. Body weight curves of pregnant C and HF female mice (A). Mice were mated at the age of 16-weeks ($n = 30$ mice/group). Maternal plasma apelin concentrations during gestation at days E6.5, E12.5 and E18.5 (B). Circulating apelin concentrations in mother/fetus pairs at E18.5 (C). *Ex-vivo* apelin release during 24-h of incubation of E12.5 (D) and E18.5 (E) mouse placentas ($n = 12$ placentas from 4 litters/stage). Relative quantification by RT-qPCR analysis of apelin and its receptor APJ mRNA levels (F) in E18.5 mouse placentas. (a.u.): arbitrary unit. Values are means \pm S.E.M. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ HF vs C group.

controls at E6.5 and E12.5 but it was increased significantly at E18.5 in HF mice ($P < 0.05$; Fig. 2B/C). At E18.5, maternal, fetal and placental weights (data not shown) and fetal apelinemia were not significantly different between HF and C groups (Fig. 2C). *Ex-vivo*, placental apelin release was similar to controls at E12.5 (Fig. 2D) but drastically reduced at E18.5 in the HF group ($P < 0.01$; Fig. 2E). Both placental apelin and APJ mRNA levels were significantly increased ($P < 0.05$) in E18.5 HF placentas (Fig. 2F).

4. Discussion

We found that maternal apelinemia, in mouse, is elevated at E6.5 and E12.5 and decreased at term (E18.5). In E18.5 fetuses, we observed that plasma apelin levels are sixfold higher than maternal level. To test the hypothesis that placental apelin secretion may be involved in regulating maternal and/or fetal plasma levels, we measured apelin release from mouse placentas *ex-vivo* at E12.5 and E18.5. We demonstrated that mouse placentas are able to release significant amount of apelin at these two gestational periods. In insulin-resistant obese pregnant mice (HF mice), maternal apelinemia was increased at E18.5 whereas fetal apelinemia was not modified. *Ex-vivo*, placental apelin release was unaffected at E12.5 but it was drastically reduced at E18.5 by maternal HF diet. As, at this developmental stage, both placental apelin and APJ mRNA levels were increased, we speculate that HF diet may alter placental posttranslational processing of apelin and/or cellular mechanisms involved in placental apelin release. Clearly, further studies are needed to analyze these cellular mechanisms in HF placentas.

In rat, the decline of maternal apelinemia at term was shown to be related to an increase apelin clearance by the placental angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase-2 (ACE2) which catabolized apelin [13]. In newborn babies, a drop in plasma apelin levels was found at neonatal day 1 [14] suggesting that the placenta may be a source of circulating apelin. Present data in HF mice showing an increase maternal apelinemia at term but a drastic reduction of placental apelin release *ex-vivo* did not confirm this hypothesis and suggest that the placental apelin release may not contribute to up-regulation of circulating maternal apelin in obesity. However, to clarify this point, further studies are mandatory to investigate the involvement of placental apelin release on maternal/fetal plasma levels as well as to analyze the transplacental apelin transport between mother and fetus. Recently, in humans, apelin was shown to be released by placental villous explants and to be inhibited by angiotensin II [15]. It is therefore possible that placental apelin may regulate the loco-regional placental vascular tone, and might thereby also modulate transplacental nutrient transfer as it has been previously hypothesized [13]. Finally, we found that maternal apelinemia is increased in insulin-resistant obese pregnant mice at term. In accordance, plasma apelin levels are raised in morbidly obese, type 2 diabetes mellitus subjects and in obese and hyperinsulinemic individuals [16]. In summary, our study demonstrate that the apelinergic system is altered, in late gestation, in mother and placenta by obesity and insulin-resistance. Both the increased maternal apelinemia at term and the reduced placental apelin release may be implicated in adverse outcomes associated with obesity in pregnancy.

Conflicts of interest

No conflicts of interest relevant to this article, financial or otherwise are reported.

Acknowledgments

The authors thank Anne Dickes-Coopman, Valérie Montel for technical help and A. Dive and M. Pottier For care to animals (DHURE, Univ. Lille2).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2016.01.006>.

References

- [1] K. Tatemoto, M. Hosoya, Y. Habata, R. Fujii, T. Kakegawa, M.X. Zou, et al., Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 251 (1998) 471–476.
- [2] D.K. Lee, R. Cheng, T. Nguyen, T. Fan, A.P. Kariyawasam, Y. Liu, et al., Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor, *J. Neurochem.* 74 (2000) 34–41.
- [3] C. Carpi n , C. Dray, C. Attan , P. Valet, M.P. Portillo, I. Churruca, et al., Expanding role for the apelin/APJ system in physiopathology, *J. Physiol. Biochem.* 63 (2007) 359–373.
- [4] M. Hosoya, Y. Kawamata, S. Fukusumi, R. Fujii, Y. Habata, S. Hinuma, et al., Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 21061–21067.
- [5] Y. Kawamata, Y. Habata, S. Fukusumi, M. Hosoya, R. Fujii, S. Hinuma, et al., Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding, *Biochim. Biophys. Acta* 1538 (2001) 162–171.
- [6] A.M. O'Carroll, S.J. Lolait, L.E. Harris, G.R. Pope, The apelin receptor APJ: journey from an orphan to a multifaceted regulator of homeostasis, *J. Endocrinol.* 219 (2013) 13–35.
- [7] I. Castan-Laurell, C. Dray, C. Knauf, O. Kunduzova, P. Valet, Apelin, a promising target for type 2 diabetes treatment? *Trends Endocrinol. Metab.* 23 (2012) 234–241.
- [8] J.R. Dalzell, J.P. Rocchiccioli, R.A. Weir, C.E. Jackson, N. Padmanabhan, R.S. Gardner, M.C. Petrie, J.J. McMurray, The emerging potential of the apelin-APJ system in heart failure, *J. Card. Fail.* 21 (2015) 489–498.
- [9] D.N. Charo, M. Ho, G. Fajardo, M. Kawana, R.K. Kundu, A.Y. Sheikh, et al., Endogenous regulation of cardiovascular function by apelin-APJ, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297 (2009) 1904–1913.
- [10] D.D.1 Briana, A. Malamitsi-Puchner, Reviews: adipocytokines in normal and complicated pregnancies, *Reprod. Sci.* 16 (2009) 921–937.
- [11] M. Fasshauer, M. Bl her, M. Stumvoll, Adipokines in gestational diabetes, *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2 (2014) 488–499.
- [12] S. Mayeur, S. Lancel, N. Theys, M.-A. Lukaszewski, S. Duban-Deweere, B. Bastide, et al., Maternal calorie restriction modulates placental mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency: putative involvement in fetoplacental growth defects in rats, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 304 (2013) 14–22.
- [13] T. Van Mieghem, R. van Bree, E. Van Herck, R. Pijnenborg, J. Deprest, J. Verhaeghe, Maternal apelin physiology during rat pregnancy: the role of the placenta, *Placenta* 31 (2010) 725–730.
- [14] A. Malamitsi-Puchner, D. Gourgiotis, M. Boutsikou, S. Baka, D. Hassiakos, D.D. Briana, Circulating apelin concentrations in mother/infant pairs at term, *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 96 (2007) 1751–1754.
- [15] L.M. Yamaleyeva, M.C. Chappell, K.B. Brosnihan, L. Anton, D.L. Caudell, S. Shi, et al., Downregulation of apelin in the human placental chorionic villi from preeclamptic pregnancies, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 309 (2015) 852–860.
- [16] C. Dray, J. Jager, E. Disse, D. Daviaud, P. Martin, et al., Apelin and APJ regulation in adipose tissue and skeletal muscle of type 2 diabetic mice and humans, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298 (2010) 1161–1169.



ORIGINAL RESEARCH COMMUNICATION

Hypothalamic Apelin/Reactive Oxygen Species Signaling Controls Hepatic Glucose Metabolism in the Onset of Diabetes

Anne Drougard,^{1,2} Thibaut Duparc,^{1,2} Xavier Brenachot,¹⁻³ Lionel Carneiro,³ Alexandra Gouazé,³ Audren Fournel,^{1,2} Lucie Geurts,⁴ Thomas Cadoudal,^{1,2} Anne-Catherine Prats,⁵ Luc Pénicaud,³ Didier Vieau,⁶ Jean Lesage,⁶ Corinne Leloup,³ Alexandre Benani,³ Patrice D. Cani,⁴ Philippe Valet,^{1,2} and Claude Knauf^{1,2}

Abstract

Aims: We have previously demonstrated that central apelin is implicated in the control of peripheral glycemia, and its action depends on nutritional (fast versus fed) and physiological (normal versus diabetic) states. An intracerebroventricular (icv) injection of a high dose of apelin, similar to that observed in obese/diabetic mice, increase fasted glycemia, suggesting (i) that apelin contributes to the establishment of a diabetic state, and (ii) the existence of a hypothalamic to liver axis. Using pharmacological, genetic, and nutritional approaches, we aim at unraveling this system of regulation by identifying the hypothalamic molecular actors that trigger the apelin effect on liver glucose metabolism and glycemia. **Results:** We show that icv apelin injection stimulates liver glycogenolysis and gluconeogenesis *via* an over-activation of the sympathetic nervous system (SNS), leading to fasted hyperglycemia. The effect of central apelin on liver function is dependent of an increased production of hypothalamic reactive oxygen species (ROS). These data are strengthened by experiments using lentiviral vector-mediated over-expression of apelin in hypothalamus of mice that present over-activation of SNS associated to an increase in hepatic glucose production. Finally, we report that mice fed a high-fat diet present major alterations of hypothalamic apelin/ROS signaling, leading to activation of glycogenolysis. **Innovation/Conclusion:** These data bring compelling evidence that hypothalamic apelin is one master switch that participates in the onset of diabetes by directly acting on liver function. Our data support the idea that hypothalamic apelin is a new potential therapeutic target to treat diabetes. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 557–573.

Introduction

THE HYPOTHALAMUS is the target of numerous factors, including hormones, neurotransmitters, and nutrients (56). After integration of these signals, modification of hypothalamic neuronal activity induces large variations of peripheral tissues functions *via* the autonomous nervous system (ANS). Consequently, abnormal hypothalamic responses may have consequences on liver functions, including over-activation of

glycogenolysis and/or gluconeogenesis in fasting conditions as observed during type 2 diabetes (9). Thus, identifying molecular hypothalamic actors implicated in the alteration of glucose homeostasis is now of crucial importance for therapeutic advance (38).

Apelin and its receptor APJ are now considered potential peripheral targets in the treatment of cardiovascular diseases, obesity, and type 2 diabetes (7). In contrast, recent studies have suggested that central apelin plays a role in the transition

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Toulouse, France.

²Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Université Paul Sabatier, UPS, Toulouse Cedex, France.

³UMR CNRS 6265-INRA 1324, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation CSGA, Université de Bourgogne, Dijon, France.

⁴Metabolism and Nutrition Research Group, Louvain Drug Research Institute, LDRI, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium.

⁵Université de Toulouse, UPS, TRADGENE, Toulouse, France.

⁶Unité Environnement Périnatal et Croissance, EA 4489, IFR 114, Université Lille-Nord de France, Equipe Dénutritives Maternelles Périnatales, Villeneuve d'Ascq Cédex, France.

Innovation

Central apelin is known to control glycemia in a dose-dependent manner. In the brain, a slight physiological increase of apelin stimulates a hypothalamic nitric oxide (NO) pathway, which results in an increase in peripheral glucose utilization. On the contrary, a high increase in central apelin, similar to that observed in obese/diabetic mice, provoked fasted hyperglycemia in normal mice. We demonstrate that central apelin participates in the establishment of a type 2 diabetes state by modulating the release of reactive oxygen species in the hypothalamus. Consequently, the autonomic nervous system provokes an over-activation of glycogenolysis and gluconeogenesis in the liver, resulting in fasted hyperglycemia.

from the normal to diabetic state. First, apelin expression is increased in the hypothalamus of obese/diabetic mice (42). Second, acute and chronic intracerebroventricular (icv) injections of a high quantity of apelin (similar to that observed in obese/diabetic mice) in fasted normal mice induce type 2 diabetes symptoms such as hyperinsulinemia, hyperglycemia, glucose intolerance, and insulin resistance (11). This result suggests that hypothalamic apelin may control liver glucose metabolism, thereby controlling glucose release *via* glycogenolysis and/or gluconeogenesis in fasted state. Reinforcing this hypothesis, we clearly demonstrated that central apelin exerts its glycemic effect by targeting the ventromedial hypothalamic nuclei (11), a region whose electrical stimulation triggers the activation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis *via* the ANS (44, 49).

One molecular target of apelin actions is the reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H₂O₂). Finely balanced mitochondrial ROS (mROS) production may be at the core of proper metabolic maintenance, and unbalanced mROS production, which is largely documented, might be an important trigger of metabolic disorders (15, 23). Data from literature demonstrate that apelin increases the production of ROS in neuronal cells culture (57). In the brain, hypothalamic hyperglycemia increases mROS hypothalamic production, which, in turn, stimulates peripheral hyperinsulinemia, thereby supporting the implication of brain mROS in the control of glucose homeostasis (24). Under metabolic dysfunction, mitochondria are considered the principal source of H₂O₂ (2), and an elevated mitochondrial H₂O₂ emission is a primary cause of insulin resistance (2, 15).

Thus, unraveling the hypothalamic apelin to liver axis involved in the onset of type 2 diabetes appears to be of major importance. However, the downstream molecular pathways and functional effects of hypothalamic apelin on the liver remain to be established. Given the well-established role of central apelin in the control of glycemia, we tested here the possibility that hypothalamic apelin positively regulates hepatic glucose production. To address this hypothesis, we used pharmacological and genetic approaches to increase hypothalamic level of apelin in normal and high-fat diet (HFD) obese/diabetic mice. These experiments allowed us to examine whether the increased levels of hypothalamic apelin is sufficient to modify hypothalamic ROS/H₂O₂ production and, consequently, hepatic glucose release *via* ANS.

Results

Antioxidants counterbalanced icv apelin-induced fasted-hyperglycemia in mice

We confirmed here that acute apelin icv injection provoked fasted hyperglycemia in normal mice (Fig. 1A) (11). Since ROS are potential targets of apelin action, we injected icv apelin in mice previously treated with an antioxidant, trolox at 1 mM. At this concentration, trolox is able to prevent hyperinsulinemia generated by glucose-induced hypothalamic ROS production (8). Treatment with icv trolox completely prevented apelin-induced hyperglycemia (Fig. 1A, B). All icv conditions did not modify food intake during re-feeding (Supplementary Fig. S1A; Supplementary Data are available online at www.liebertpub.com/ars) and plasma apelin levels (Supplementary Fig. S1B), demonstrating that (i) icv apelin did not modify the behavior of animals after injection and (ii) the specificity of central apelin action on glucose homeostasis.

Apelin stimulates hypothalamic ROS production in mice

The implication of ROS/H₂O₂ in the control of glucose metabolism in normal and physiopathological states is well established (15). To determine whether hypothalamic apelin requires an H₂O₂-dependent signaling pathway, our first approach used an indirect method of detection of H₂O₂ release by hypothalamus in response to apelin. We demonstrated that apelin significantly increased H₂O₂ release (Fig. 1C). Based on this result, we developed for the first time in hypothalamic explants a method using specific amperometric probes that was highly and specifically sensitive to H₂O₂ in order to detect its release in real time (54). As observed in Figure 1D, apelin rapidly increased hypothalamic H₂O₂ release from 2 to 20 min. This effect was completely blunted by trolox, thereby demonstrating the existence of an hypothalamic apelin/H₂O₂ signaling pathway (Fig. 1D). It is well established that the majority of hypothalamic ROS implicated in rapid signaling pathway have a mitochondrial origin (3). Data from literature show that hypothalamic NADPH oxidase is implicated in the control of energy homeostasis (*i.e.*, food intake) *via* ROS production (19). To test whether NADPH oxidase could be a major enzymatic target of hypothalamic apelin action, we tested the effect of icv diphenyleioidonium (DPI), an inhibitor of NADPH oxidase, on glycemia. icv DPI injection failed to counterbalance hyperglycemia induced by icv apelin (Fig. 1E).

Central apelin controls glycemia via APJ receptor

Nowadays, there is only one known apelin receptor called APJ. To determine the specificity of icv apelin on glycemia, we treated mice with F13A, an APJ antagonist (26). Acute icv F13A injection blocked icv apelin-induced hyperglycemia (Fig. 1F).

Central apelin stimulates glycogenolysis and gluconeogenesis via hypothalamic ROS production and the ANS in mice

During fasting, the liver is the principal organ able to release glucose *via* the activation of glycogenolysis and/or gluconeogenesis. The brain, and more specifically the hypothalamus, contributes to the regulation of liver glucose metabolism during fasting *via* the ANS. To test whether

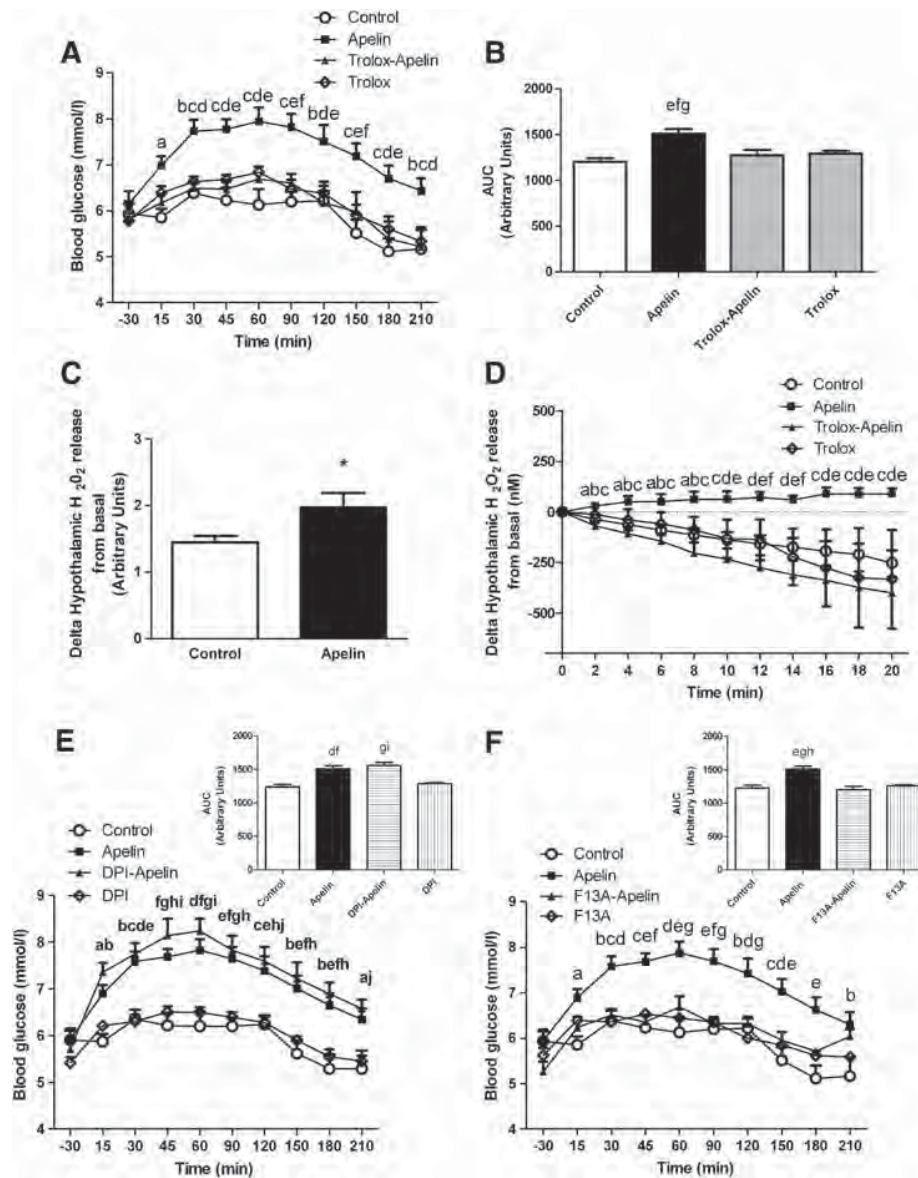


FIG. 1. Central apelin induces fasting hyperglycemia *via* hypothalamic hydrogen peroxide (H_2O_2) production in normal mice. (A) Effect of acute intracerebroventricular (icv) apelin injection on blood-glucose-fasted mice ($n=10$) compared with artificial cerebrospinal fluid (aCSF)-injected fasted mice ($n=9$), to Trolox-Apelin-injected fasted mice ($n=6$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted mice ($n=8$). (B) The average area under the curve (AUC) associated with the previous fasted blood glucose. ^a $p \leq 0.05$ Apelin *versus* Control; ^b $p \leq 0.01$ Apelin *versus* Control; ^c $p \leq 0.05$ Apelin *versus* Trolox-Apelin; ^d $p \leq 0.05$ Apelin *versus* Trolox; ^e $p \leq 0.001$ Apelin *versus* Control; ^f $p \leq 0.01$ Apelin *versus* Trolox; ^g $p \leq 0.01$ Apelin *versus* Trolox-Apelin. (C) *Ex vivo* hypothalamic H_2O_2 release measured by indirect enzymatic detection in fasted mice after injection of apelin ($n=10$) or krebs-ringer solution ($n=10$); ^{*} $p < 0.05$. (D) *Ex vivo* hypothalamic H_2O_2 release measured by real-time amperometric detection in fasted mice after injection of apelin ($n=5$) or aCSF ($n=5$) or Trolox-Apelin ($n=4$) or Trolox ($n=4$). ^a $p \leq 0.05$ Apelin *versus* Control; ^b $p \leq 0.05$ Apelin *versus* Trolox; ^c $p \leq 0.01$ Apelin *versus* Trolox-Apelin; ^d $p \leq 0.01$ Apelin *versus* Control; ^e $p \leq 0.01$ Apelin *versus* Trolox; ^f $p \leq 0.001$ Apelin *versus* Trolox-Apelin. (E) Effect of acute icv apelin injection on blood glucose-fasted mice ($n=10$) compared with aCSF-injected fasted mice ($n=9$), to diphenyleioidonium (DPI)-Apelin-injected fasted mice ($n=6$) and to DPI-aCSF (DPI)-injected fasted mice ($n=6$). The adjacent bar graph represents the average AUC. ^a $p \leq 0.05$ Apelin *versus* Control; ^b $p \leq 0.01$ Apelin-DPI *versus* Control; ^c $p \leq 0.01$ Apelin *versus* Control; ^d $p \leq 0.01$ Apelin *versus* DPI; ^e $p \leq 0.05$ Apelin-DPI *versus* DPI; ^f $p \leq 0.001$ Apelin *versus* Control; ^g $p \leq 0.001$ Apelin-DPI *versus* Control; ^h $p \leq 0.05$ Apelin *versus* DPI; ⁱ $p \leq 0.01$ Apelin-DPI *versus* DPI; ^j $p \leq 0.05$ Apelin-DPI *versus* Control. (F) Effect of acute icv apelin injection on blood-glucose-fasted mice ($n=10$) compared with aCSF-injected fasted mice ($n=9$), to F13A-Apelin-injected-fasted mice ($n=7$) and to F13A-aCSF (F13A)-injected fasted mice ($n=5$). The adjacent bar graph represents the average AUC. ^a $p \leq 0.05$ Apelin *versus* Control; ^b $p \leq 0.01$ Apelin *versus* Control; ^c $p \leq 0.05$ Apelin *versus* F13A; ^d $p \leq 0.05$ Apelin *versus* F13A-Apelin; ^e $p \leq 0.001$ Apelin *versus* Control; ^f $p \leq 0.01$ Apelin *versus* F13A-Apelin; ^g $p \leq 0.01$ Apelin *versus* F13A; ^h $p \leq 0.001$ Apelin *versus* F13A-Apelin.

hypothalamic apelin/ROS triggers fasted hyperglycemia by mechanisms involving the liver, we measured the consequence of icv apelin±trolox on glycogenolysis and gluconeogenesis in fasted mice. An acute icv injection of apelin decreased hepatic glycogen content as observed by histological (Fig. 2A, B) and biochemical (Fig. 2C) measurements. Consistent with the effect observed in the hypothalamus, trolox treatment abolished the activation of hepatic glycogenolysis in apelin icv-injected mice (Fig. 2A–C). Then, in response to an intraperitoneal pyruvate injection, apelin significantly increased glycemia, demonstrating an activation of liver gluconeogenesis (Fig. 2D). Similar to glycogenolysis, icv apelin effect on gluconeogenesis is blocked by icv trolox.

Numerous enzymes are implicated in the control of glycogenolysis and/or gluconeogenesis. Among them, the activity of glucose 6-phosphatase (G6Pase), a key enzyme that is known to stimulate glycogenolysis and gluconeogenesis (1), was significantly increased in the liver of icv apelin-treated mice (Fig. 2E). This effect was blocked by icv trolox. No significant variation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), glycogen synthase, and glycogen phosphorylase activities was observed in all experimental conditions (Fig. 2F–H). The effects of icv apelin on glucose metabolism were not associated to the modification of plasma triglycerides (TG) (Supplementary Fig. S2A), free fatty acid (FFA) (Supplementary Fig. S2B), ketone bodies (Supplementary Fig. S2C), liver TG (Supplementary Fig. S2D), and lipid (Supplementary Fig. S2E) content.

Given that the sympathetic nervous system (SNS) controls glycogenolysis and gluconeogenesis, we measured norepinephrine release in the blood of icv apelin±trolox-treated mice as an index of SNS activation. Norepinephrine levels were significantly higher in response to icv apelin than control mice, but not in icv apelin/trolox or trolox-alone treated mice (Fig. 3A). No significant variation of plasma epinephrine was observed (Fig. 3B). Alpha(1) adrenergic receptors are the principle receptors implicated in the control of hepatic glucose metabolism in mice (28). An intraperitoneal injection of prazosin, an alpha(1) adrenergic receptors antagonist, prevented icv apelin-induced hyperglycemia (Fig. 3C), thereby demonstrating the existence of a central apelin-SNS-liver signaling pathway. In addition to an alpha(1) adrenergic receptors-mediated effect on glycemia, activation of SNS by icv apelin is associated to an increase in plasma glucagon release (Fig. 3D), which further stimulates hepatic glucose production (41).

Apelin over-expression in the medio-basal hypothalamus stimulates hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis

We have previously demonstrated that the medio-basal hypothalamus (MBH) is a hypothalamic target of apelin action on peripheral glucose homeostasis, as c-Fos expression is increased in the MBH of hyperglycemic apelin icv-injected mice (11). Moreover, electrical stimulation of ventro-median hypothalamus stimulates hepatic glucose release (48). To determine whether apelin controls liver function *via* an action on MBH, we injected apelin-expressing lentivectors specifically in the MBH of normal mice. Four weeks after infection, the level of apelin mRNA was significantly increased in the MBH of mice that received apelin-expressing lentivectors (Fig. 4A). The relative expression of apelin mRNA was increased by about 1.5-fold, similar to that observed at the protein level in

obese/diabetic mice (42), demonstrating that this over-expression of apelin in normal mice corresponds to the level found in pathological conditions. To identify the impact on glucose homeostasis, we performed insulin tolerance test (ITT). Lentivectors apelin-infected mice presented fasted hyperglycemia and an insulin intolerance typical features of type 2 diabetes (Fig. 4B). This metabolic phenotype was associated to an increase in TNFalpha mRNA expression in the hypothalamus of lentivectors apelin-infected mice (Fig. 4C), suggesting an increase in hypothalamic inflammation that is clearly associated to a diabetic state (51); whereas hypothalamic IL1beta mRNA tends to increase in lentivectors apelin-infected mice, but did not reach significance ($p=0.074$, Fig. 4D). This inflammatory state was specific to the hypothalamus, as we did not observe any modification of mRNA TNFalpha and IL1beta expressions in the liver and adipose tissues (Supplementary Fig. S3C–H). In this chronic apelin expressed model, we showed no significant difference in plasma apelin (Supplementary Fig. S4F) and liver apelin/APJ mRNA expressions (Supplementary Fig. S3A, B) between the two experimental groups, suggesting that central control of apelin did not affect its own release in periphery.

Then, we measured the impact of apelin over-expression in the MBH on liver glucose metabolism. Hypothalamic apelin over-expression decreased liver glycogen content (Fig. 5A–C) and increased gluconeogenesis (Fig. 5D). This metabolic phenotype was associated to an increase in G6Pase activity during fasted state (Fig. 5E), but not PEPCK (Fig. 5F), glycogen synthase (Fig. 5G), and glycogen phosphorylase (Fig. 5H). No significant modification of plasma TG (Supplementary Fig. S4A), FFA (Supplementary Fig. S4B), ketone bodies (Supplementary Fig. S4C), liver TG (Supplementary Fig. S4D), and lipid content (Supplementary Fig. S4E) was observed between the two groups. This result clearly demonstrates that the diabetic state generated by apelin over-expression in the MBH is not associated to the modification of lipid metabolism, but specifically links to direct alteration of glucose metabolism.

Similar to that observed in response to an acute apelin injection (Fig. 3A, B), apelin over-expression in the MBH was associated to an increase in plasma norepinephrine (Fig. 6A), but not epinephrine (Fig. 6B), showing the over-activation of SNS. On the contrary, we did not observe any significant difference in plasma glucagon (Fig. 6C), suggesting that SNS over-activation coupled to modification of G6Pase activity was sufficient to generate a diabetic state.

Antioxidants counterbalanced icv apelin-induced fasted hyperglycemia in obese/diabetic mice

We previously found that glycemia of HFD obese/diabetic mice could further increase in response to acute icv apelin injection (11), suggesting that the hypothalamic to liver axis is functionally still able to respond to a central stimulation by releasing hepatic glucose. Here, we showed that icv trolox completely abolished the hyperglycemic effect of apelin in HFD mice (Fig. 7A, B), suggesting that the hypothalamic apelin/ROS pathway was still effective.

Apelin amplifies the H₂O₂ release by the hypothalamus of obese/diabetic mice

The hypothalamic ROS signaling pathway is profoundly altered in obese/diabetic mice participating in an insulin-

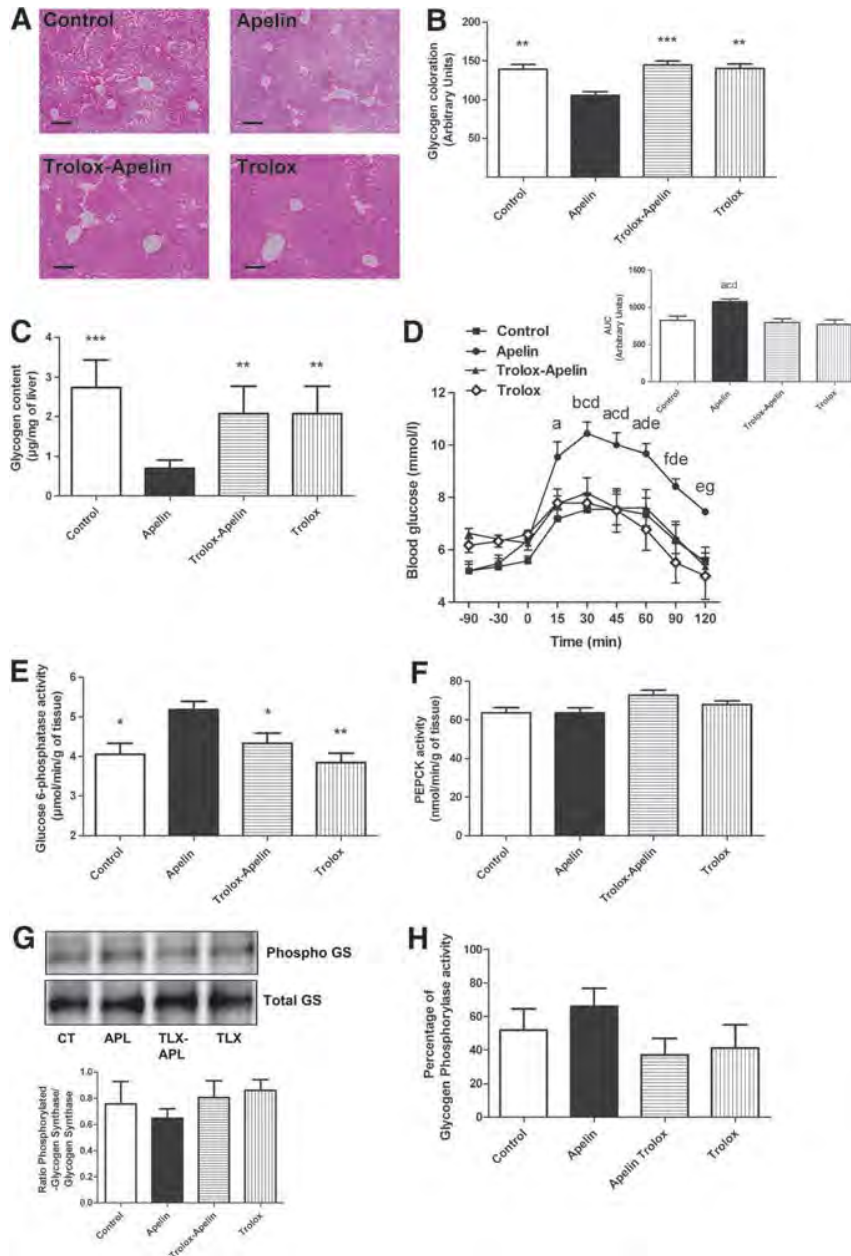


FIG. 2. Central apelin stimulates glycogenolysis and gluconeogenesis via hypothalamic reactive oxygen species (ROS) in normal mice. (A) Histological visualization of hepatic glycogen after acute icv apelin injection on fasted mice ($n=5$) compared with aCSF-injected fasted mice ($n=5$), to Trolox-Apelin-injected fasted mice ($n=4$), and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted mice ($n=5$). Scale bar: 200 μm . (B) Quantification of coloration associated with the previous histological visualization. (C) Effect of acute icv apelin injection on hepatic glycogen content of fasted mice ($n=12$) compared with aCSF-injected fasted mice ($n=13$), to Trolox-Apelin-injected fasted mice ($n=12$), and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted mice ($n=7$). ** $p < 0.01$ versus Apelin; *** $p < 0.001$ versus Apelin. (D) Effect of acute icv apelin injection on gluconeogenic activity of fasted mice ($n=8$) compared with aCSF-injected fasted mice ($n=8$), to Trolox-Apelin-injected fasted mice ($n=10$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted mice ($n=6$). The adjacent bar graph represents the average AUC. ^a $p \leq 0.01$ Apelin versus Control; ^b $p \leq 0.001$ Apelin versus Control; ^c $p \leq 0.01$ Apelin versus Trolox-Control; ^d $p \leq 0.01$ Apelin versus Trolox; ^e $p \leq 0.05$ Apelin versus Trolox-Apelin; ^f $p \leq 0.05$ Apelin versus Control; ^g $p \leq 0.05$ Apelin versus Trolox. (E) Effect of acute icv apelin injection on hepatic glucose-6-phosphatase (G6Pase) activity-fasted mice ($n=5$) compared with aCSF-injected fasted mice ($n=5$), to Trolox-Apelin-injected fasted mice ($n=5$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted mice ($n=6$). * $p < 0.05$ versus Apelin; ** $p < 0.01$ versus Apelin. (F) Effect of acute icv apelin injection on hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) activity-fasted mice ($n=5$) compared with aCSF-injected fasted mice ($n=4$), to Trolox-Apelin-injected fasted mice ($n=4$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted mice ($n=6$). (G) Effect of acute icv apelin injection on ratio of phosphorylated hepatic glycogen synthase/total hepatic glycogen synthase on fasted mice ($n=3$) compared with aCSF-injected fasted mice ($n=3$), to Trolox-Apelin-injected fasted mice ($n=3$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted mice ($n=3$). (H) Effect of acute icv apelin injection on hepatic glycogen phosphorylase activity-fasted mice ($n=4$) compared with aCSF-injected fasted mice ($n=4$), to Trolox-Apelin-injected fasted mice ($n=4$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted mice ($n=4$).

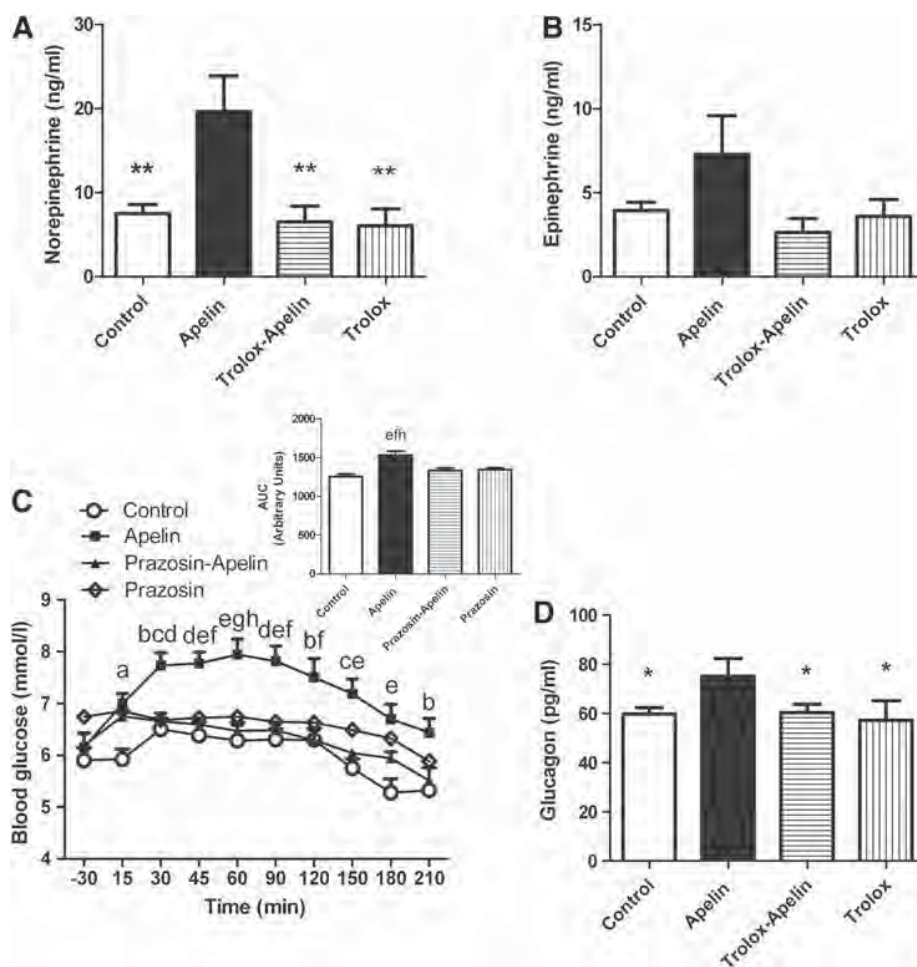


FIG. 3. Central apelin stimulates glycogenolysis and gluconeogenesis via autonomous nervous system (ANS) activation in normal mice. (A) Effect of acute icv apelin injection on blood norepinephrine-fasted mice ($n=7$) compared with aCSF-injected fasted mice ($n=9$), to Trolox-Apelin-injected fasted mice ($n=7$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted mice ($n=8$). $**p < 0.01$ versus Apelin. (B) Effect of acute icv apelin injection on blood epinephrine-fasted mice ($n=7$) compared with aCSF-injected fasted mice ($n=9$), to Trolox-Apelin-injected fasted mice ($n=7$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted mice ($n=8$). (C) Effect of acute icv apelin injection on blood glucose-fasted mice ($n=11$) compared with aCSF-injected fasted mice ($n=8$), to intraperitoneal injection of prazosin before apelin icv injection (Prazosin-Apelin) on fasted mice ($n=6$), and to intraperitoneal injection of prazosin before aCSF icv injection (Prazosin) on fasted mice ($n=6$). The adjacent bar graph represents the average AUC. $^ap \leq 0.05$ Apelin versus Control; $^bp \leq 0.01$ Apelin versus Control; $^cp \leq 0.05$ Apelin versus Prazosin; $^dp \leq 0.05$ Apelin versus Prazosin-Apelin; $^ep \leq 0.001$ Apelin versus Control; $^fp \leq 0.01$ Apelin versus Prazosin; $^gp \leq 0.001$ Apelin versus Prazosin; $^hp \leq 0.01$ Apelin versus Prazosin-Apelin. (D) Effect of acute icv apelin injection on blood glucagon-fasted mice ($n=4$) compared with aCSF-injected fasted mice ($n=5$), to Trolox-Apelin-injected fasted mice ($n=5$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted mice ($n=4$). $*p < 0.05$ versus Apelin.

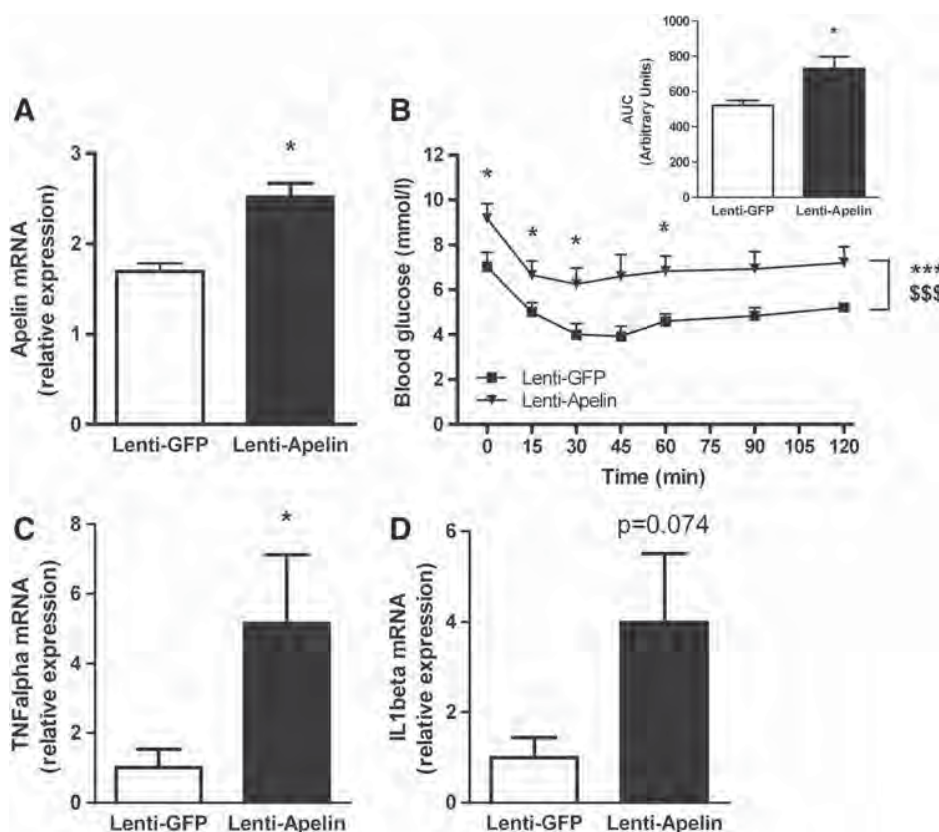
resistant state (15). Similar to that performed in normal mice, we measured real-time H_2O_2 release in response to apelin on hypothalamic explants from HFD mice. In this pathological model, apelin stimulated an exacerbated H_2O_2 release in the hypothalamus, and this was counterbalanced by trolox treatment (Fig. 7C).

Central apelin stimulates glycogenolysis but not gluconeogenesis via hypothalamic ROS in HFD mice

The liver is one of the most important organ in glucose homeostasis whose activity is deeply disturbed during metabolic diseases (36). Indeed, previous data demonstrate that

gluconeogenic activity of the liver of obese/diabetic mice is exacerbated (55). We demonstrated that HFD mice are able to increase quickly fasted glycemia (Fig. 7A, B) on apelin treatment; this corresponds to the activation of glycogenolysis but not gluconeogenesis (45–48). In accordance to glycemia, hepatic glycogenolysis was activated by icv apelin and blocked when icv trolox was co-injected (Fig. 8A–C). Acute icv apelin injection in HFD mice did not significantly modify gluconeogenic function in the liver (Fig. 8D). The decrease of glycogen content was mirrored by an increase in liver G6Pase activity (Fig. 8E) without modification of PEPCK, glycogen phosphorylase, and glycogen synthase (Supplementary Fig. S5A–C). Plasma norepinephrine, epinephrine, and glucagon

FIG. 4. Apelin over-expression into the mediobasal hypothalamus (MBH) generates insulin intolerance state. (A) Relative expression of apelin mRNA in hypothalamus of lenti-Apelin mice ($n=4$) compared with lenti-GFP mice ($n=5$), $*p<0.05$. **(B)** Insulin tolerance test (ITT) in 6-h-fasted lenti-Apelin mice ($n=5$) compared with lenti-GFP mice ($n=5$), $*p<0.05$. Two-way ANOVA followed by *t*-test *post hoc* reveals time ($***p<0.001$) and treatment ($$$$p<0.001$) effects. The adjacent bar graph represents the average AUC. **(C)** Relative expression of TNF α mRNA in hypothalamus of lenti-Apelin mice ($n=4$) compared with lenti-GFP mice ($n=5$), $*p<0.05$. **(D)** Relative expression of IL1 β mRNA in hypothalamus of lenti-Apelin mice ($n=4$) compared with lenti-GFP mice ($n=5$).



concentrations did not vary in our experimental conditions (Fig. 8G, H).

Blockade of central apelin ameliorates diabetic state of HFD mice

Our data show that a high level of central apelin participates in the establishment of a type 2 diabetes. To test whether blockade of apelin action in the hypothalamus could be a major target to restore a fasted normal glycemia, we have daily injected icv mice with an APJ antagonist, F13A, during 2 weeks after 3 months of HFD. Our data show that icv F13A decreased fasted hyperglycemia and insulin intolerance in HFD mice (Fig. 9A). HFD mice presented a decrease in glycogen content (Fig. 9B–D) at a level similar to that measure in normal mice (Fig. 2C), demonstrating an amelioration of the diabetic state in HFD mice. This phenotype is associated to an increase in liver glycogen phosphorylase activity, which could explain the low level of glycogen store (Fig. 9E). The activities of G6Pase, PEPCK and glycogen synthase did not vary between the two groups (Supplementary Fig. S6A–C). Plasma norepinephrine and epinephrine did not vary between the two groups of mice (Fig. 9F, G). Plasma glucagon concentration was decreased in F13A mice as compared with control HFD mice (Fig. 9H), thereby suggesting that chronic central apelin blockade improves glucose homeostasis regulation during diabetic state.

Discussion

Hypothalamic apelin is implicated in the control of peripheral glucose utilization in normal and pathological con-

ditions (11). In the present study, we have identified for the first time the hypothalamic molecular signaling pathway implicated in deleterious effect of apelin. Moreover, we report that the couple apelin/ROS in the hypothalamus controls hepatic glucose production *via* the SNS to induce peripheral hyperglycemia.

The role of central apelin in the control of glucose homeostasis is poorly defined. We were the first to demonstrate that central apelin may have beneficial or deleterious effects on glucose homeostasis depending on the injected dose and/or the nutritional state (11). Indeed, an injection of a low dose of icv apelin induces an increase in glucose tolerance in normal mice. This result suggests that the slight increase of plasma apelin concentration observed in fed state in normal mice may reach the hypothalamus, a neurohemal structure which facilitates communications with peripheral hormones (25), to decrease glycemia in fed state (11). On the contrary, obese/diabetic mice fed a HFD show a disruption of circadian apelin regulation (11). Then, over-increased hypothalamic apelin expression observed in obese/diabetic (11, 42) is associated to abnormal regulation of glycemia (11). To reinforce this hypothesis, an icv injection of a high dose of apelin (used in this study and similar to that observed in obese/diabetic mice) in normal mice induces fasted hyperglycemia and insulin resistance (11), characterizing a type 2 diabetes. The liver is the main organ that is able to release glucose in fasted state *via* glycogenolysis and/or gluconeogenesis (30). Thus, we focused our attention on the hypothalamic apelin to liver axis in normal and physiopathological conditions. In all the models investigated, central apelin stimulated hepatic glucose

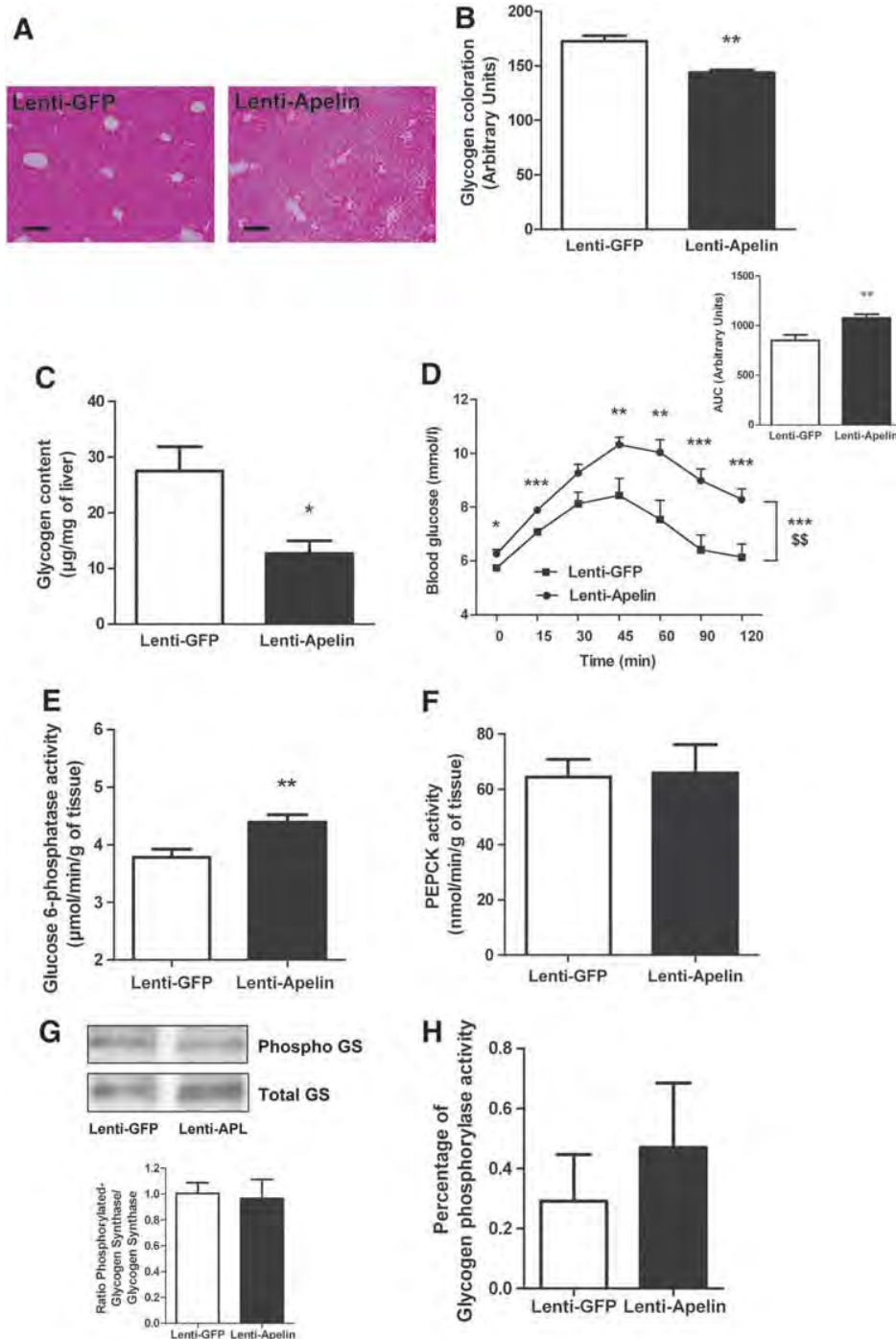


FIG. 5. Apelin over-expression into the MBH stimulates hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis. (A) Histological visualization of hepatic glycogen of fasted lenti-Apelin mice ($n=4$) compared with fasted lenti-GFP mice ($n=5$). Scale bar: $200\ \mu\text{m}$. (B) Quantification of coloration associated with the previous histological visualization. $**p < 0.01$ (C) Hepatic glycogen content of fasted lenti-Apelin mice ($n=5$) compared with fasted lenti-GFP mice ($n=5$) $*p < 0.05$. (D) Gluconeogenic activity of fasted lenti-Apelin mice ($n=9$) compared with fasted lenti-GFP mice ($n=9$); $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$. Two-way ANOVA followed by *t*-test *post hoc* reveals time ($***p < 0.001$) and treatment ($^{**}p < 0.01$) effects. (E) Hepatic G6Pase activity in fasted lenti-Apelin mice ($n=7$) compared with fasted lenti-GFP mice ($n=9$). $**p < 0.01$. (F) Hepatic PEPCK activity in fasted lenti-Apelin mice ($n=8$) compared with fasted lenti-GFP mice ($n=8$). (G) Ratio of phosphorylated hepatic glycogen synthase/total hepatic glycogen synthase in fasted lenti-Apelin mice ($n=3$) compared with fasted lenti-GFP mice ($n=3$). (H) Hepatic glycogen phosphorylase activity in fasted lenti-Apelin mice ($n=5$) compared with fasted lenti-GFP mice ($n=5$).

production and release *via* glycogenolysis and/or gluconeogenesis. Importantly, the previously described kinetics of glucose release by the liver (glycogenolysis within minutes; gluconeogenesis within hours) (45, 46, 48) clearly fits with our two waves of increased glucose release induced by icv apelin injections. The only exception of this concept is observed in HFD mice, where an icv apelin injection did not modify gluconeogenesis (Fig. 8D). This result is in accordance with data from literature showing that liver gluconeogenesis is over-activated during metabolic disorders (55), leading to hy-

pothesize that icv apelin treatment is not able to stimulate more than possible the hepatic glucose production. Moreover, these results could be correlated to the absence of stimulatory action of icv leptin on liver gluconeogenesis in over-feeding rats as opposed to normal chow-fed rats (34). In our experimental procedure, it is difficult to evaluate the potential variation of glycogenic and/or gluconeogenic enzymes activities in response to icv apelin. It is worth noting that the electrical stimulation of the hypothalamus stimulates hepatic glucose release in a few minutes, but the kinetic of activation of

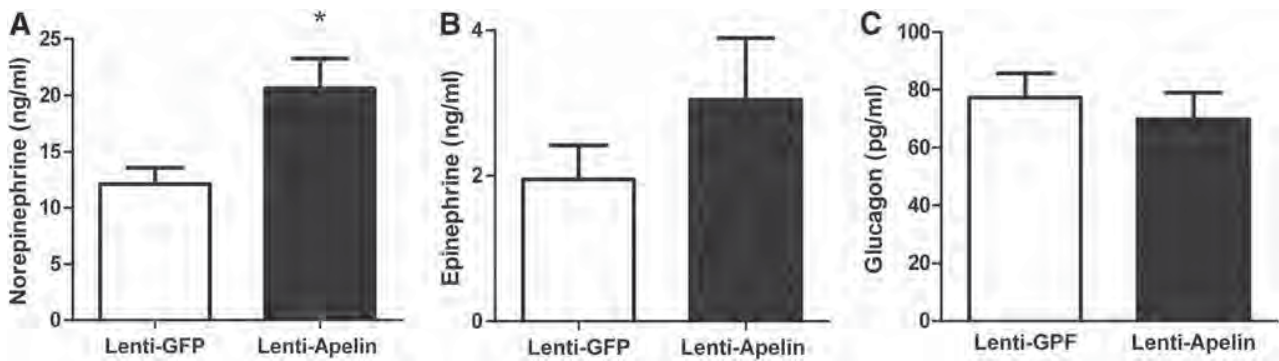


FIG. 6. Apelin over-expression into the MBH stimulates hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis via ANS activation. (A) Plasma norepinephrine in fasted lenti-Apelin mice ($n=5$) compared with fasted lenti-GFP mice ($n=5$); $*p < 0.05$. **(B)** Plasma epinephrine in fasted lenti-Apelin mice ($n=5$) compared with fasted lenti-GFP mice ($n=5$). **(C)** Plasma glucagon in fasted lenti-Apelin mice ($n=4$) compared with fasted lenti-GFP mice ($n=4$).

enzymes precedes the effect. In fact, in response to hypothalamic stimulation, the activities of G6Pase in the liver are increased in ~ 30 s (46). However, in a longer period of time, a sustained electrical stimulation of the ventro-median hypothalamus (20 s periods once every 3 min for 4 h) increases liver PEPCK activity after 120 min (49). Whether an acute stimulation of hypothalamic nuclei in response to icv apelin

modifies enzymes activities in the liver within seconds or minutes remains to be determined. Our data suggest a kinetic of activation closed to this, as variations of glycemia are observed from 15 to 210 min in our protocol. For this reason, we evaluate the activities of four enzymes implicated in the control of glycogenolysis and/or gluconeogenesis in the liver in all experimental conditions after 30 min of icv treatment.

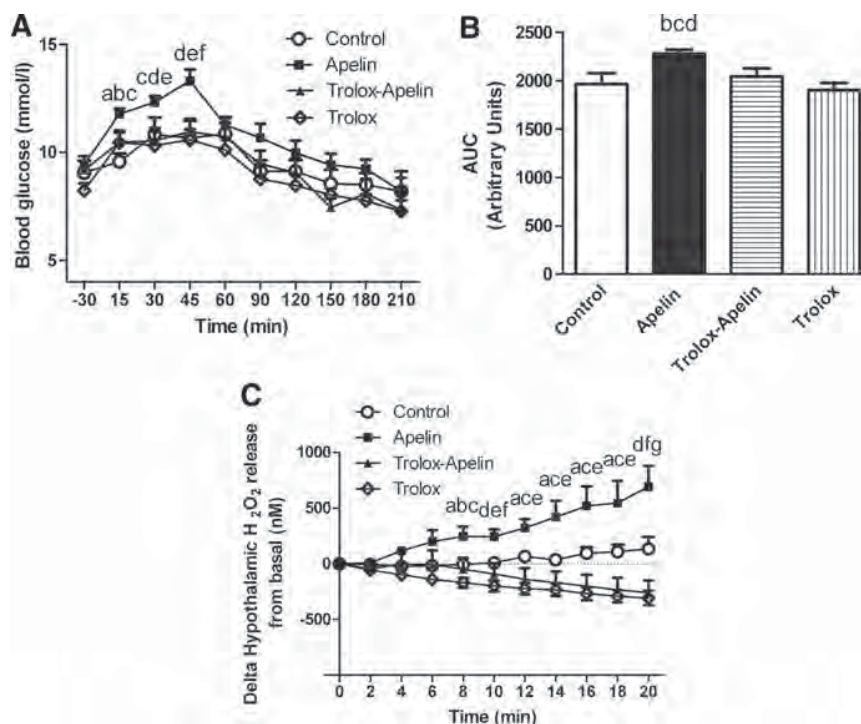


FIG. 7. Central apelin stimulates fasting hyperglycemia via H₂O₂ hypothalamic production in obese and diabetic mice. (A) Effect of acute icv apelin injection on blood glucose fasted high-fat diet (HFD) mice ($n=10$) compared with aCSF-injected fasted HFD mice ($n=9$), to Trolox-Apelin-injected fasted HFD mice ($n=10$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted HFD mice ($n=6$). **(B)** The average AUC associated with the previous fasted blood glucose. ^a $p \leq 0.001$ Apelin versus Control; ^b $p \leq 0.05$ Apelin versus Trolox-Apelin; ^c $p \leq 0.05$ Apelin versus Trolox; ^d $p \leq 0.01$ Apelin versus Control; ^e $p \leq 0.01$ Apelin versus Trolox; ^f $p \leq 0.01$ Apelin versus Trolox-Apelin. **(C)** *Ex vivo* hypothalamic H₂O₂ release measured by real-time amperometric detection in fasted HFD mice after injection of apelin ($n=5$) or aCSF ($n=5$) or Trolox-Apelin ($n=4$) or Trolox-aCSF ($n=4$). ^a $p \leq 0.05$ Apelin versus Control; ^b $p \leq 0.05$ Apelin versus Trolox-Apelin; ^c $p \leq 0.01$ Apelin versus Trolox; ^d $p \leq 0.01$ Apelin versus Control; ^e $p \leq 0.01$ Apelin versus Trolox-Apelin; ^f $p \leq 0.001$ Apelin versus Trolox; ^g $p \leq 0.001$ Apelin versus Trolox-Apelin.

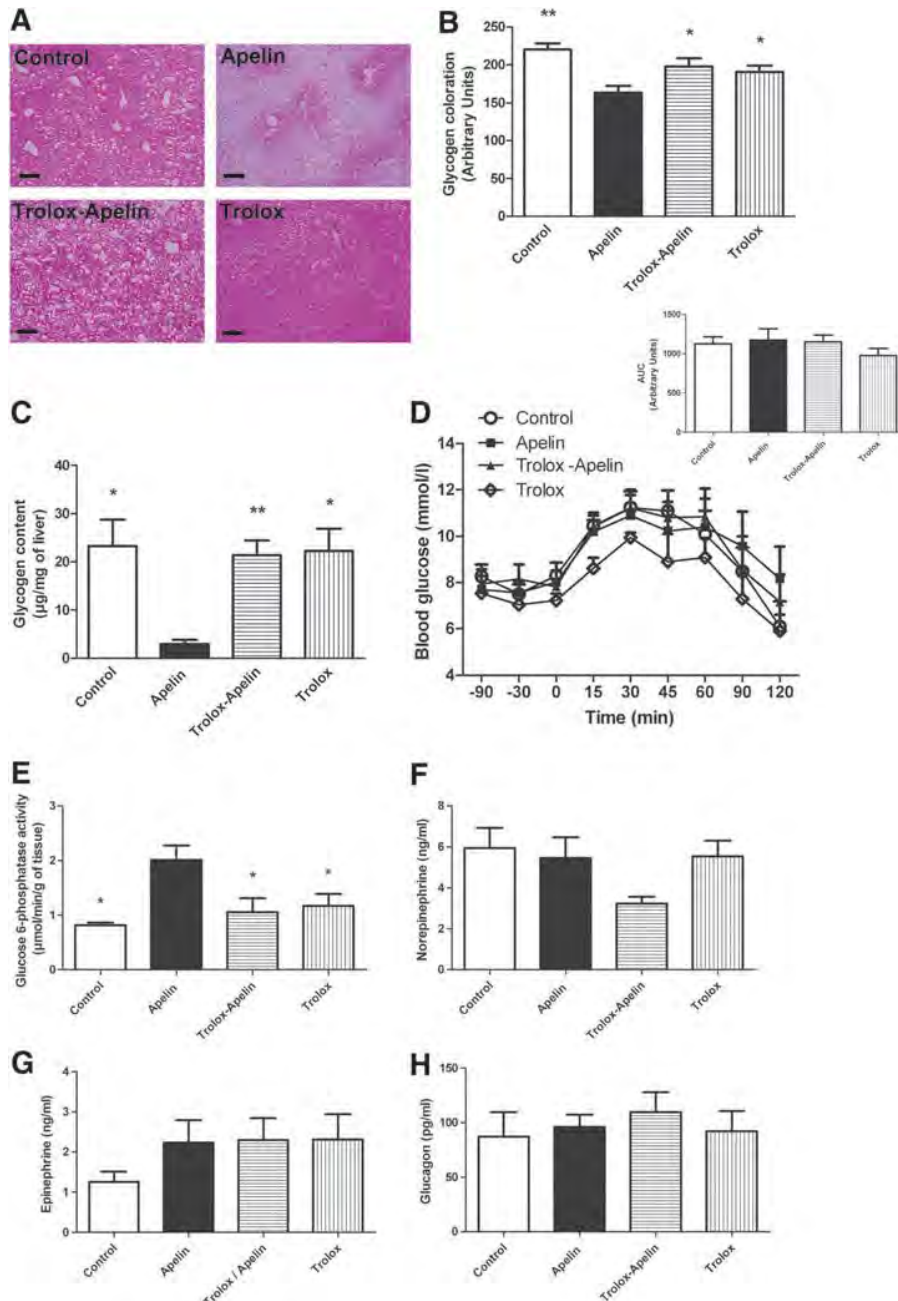
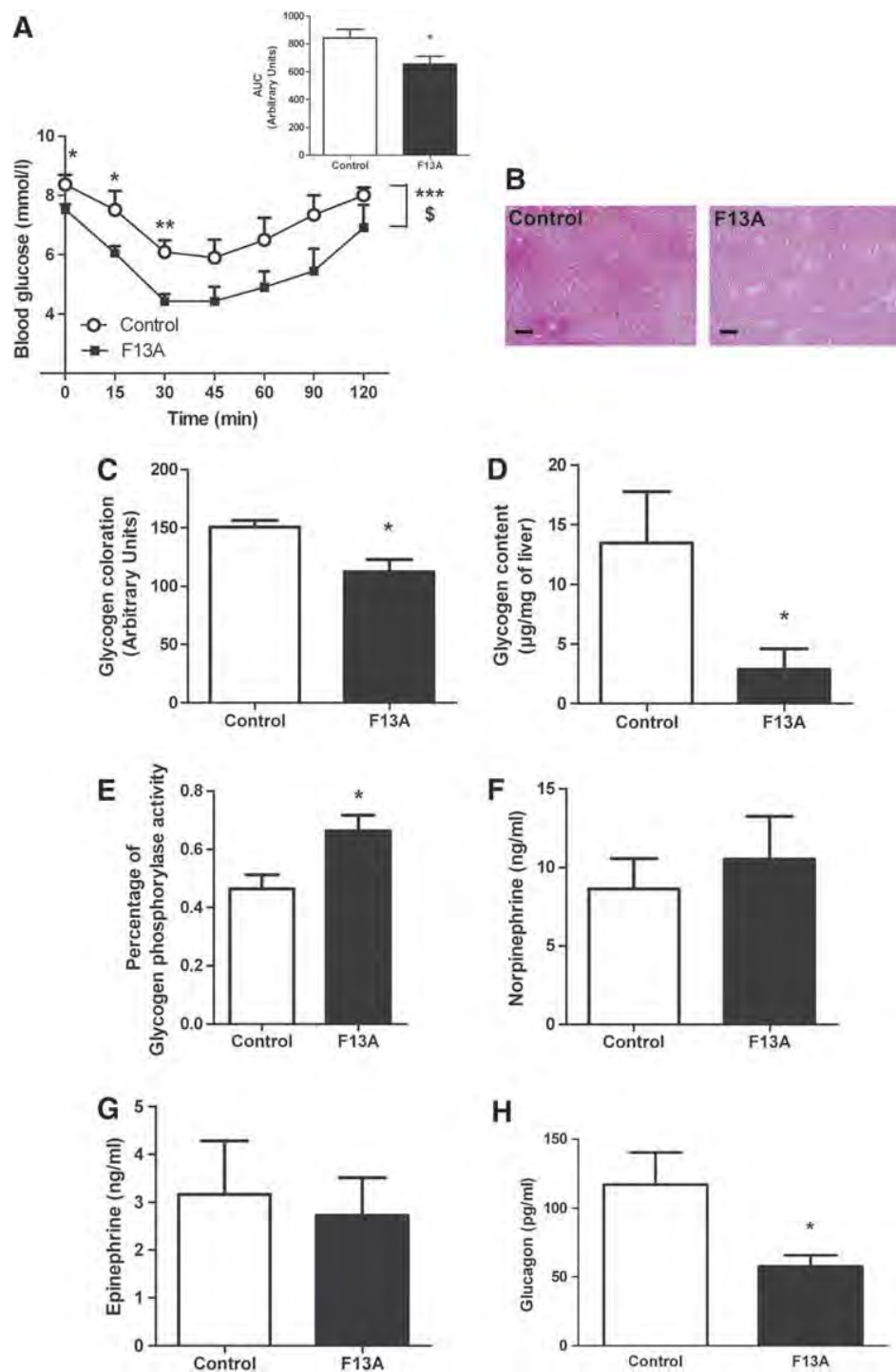


FIG. 8. Central apelin stimulates glycogenolysis via hypothalamic ROS release and ANS activation in obese and diabetic mice. (A) Histological visualization of hepatic glycogen after acute icv apelin injection on fasted HFD mice ($n=6$) compared with aCSF-injected fasted HFD mice ($n=6$), to Trolox-Apelin-injected fasted HFD mice ($n=5$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted HFD mice ($n=4$); scale bar: 200 μm . (B) Quantification of coloration associated with the previous histological visualization. $*p < 0.05$ versus Apelin; $**p < 0.01$ versus Apelin. (C) Effect of acute icv apelin injection on hepatic glycogen content of fasted HFD mice ($n=6$) compared with aCSF-injected fasted HFD mice ($n=7$), to Trolox-Apelin-injected fasted HFD mice ($n=13$), and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted HFD mice ($n=4$). $*p < 0.05$ versus Apelin; $**p < 0.01$ versus Apelin. (D) Effect of acute icv apelin injection on gluconeogenic activity of fasted HFD mice ($n=7$) compared with aCSF-injected fasted HFD mice ($n=6$), to Trolox-Apelin-injected fasted HFD mice ($n=5$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted HFD mice ($n=4$). The adjacent bar graph represents the average AUC. (E) Effect of acute icv apelin injection on hepatic G6Pase activity-fasted HFD mice ($n=4$) compared with aCSF-injected fasted HFD mice ($n=4$), to Trolox-Apelin injected in fasted HFD mice ($n=4$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted HFD mice ($n=4$). $*p < 0.05$ versus Apelin. (F) Effect of acute icv apelin injection on blood norepinephrine in fasted HFD mice ($n=7$) compared with aCSF-injected fasted HFD mice ($n=9$), to Trolox-Apelin-injected fasted HFD mice ($n=7$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted HFD mice ($n=4$). (G) Effect of acute icv apelin injection on blood epinephrine in fasted HFD mice ($n=7$) compared with aCSF-injected fasted HFD mice ($n=9$), to Trolox-Apelin-injected fasted HFD mice ($n=7$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted HFD mice ($n=4$). (H) Effect of acute icv apelin injection on blood glucagon in fasted HFD mice ($n=4$) compared with aCSF-injected fasted HFD mice ($n=5$), to Trolox-Apelin-injected fasted HFD mice ($n=4$), and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted HFD mice ($n=5$).

FIG. 9. Blockade of central apelin ameliorates diabetic state in HFD mice. (A) ITT in 6-h-fasted HFD mice with F13A chronic treatment ($n=6$) compared with HFD mice with aCSF chronic treatment ($n=5$), $*p<0.05$, $**p<0.01$. Two-way ANOVA followed by *t*-test *post hoc* reveals time ($***p<0.001$) and treatment ($*p<0.05$) effects. The adjacent bar graph represents the average AUC. **(B)** Histological visualization of hepatic glycogen of fasted HFD mice with F13A chronic treatment ($n=5$) compared with HFD mice with aCSF chronic treatment ($n=4$). Scale bar: 200 μm . **(C)** Quantification of coloration associated with the previous histological visualization. $*p<0.05$. **(D)** Hepatic glycogen content of fasted HFD mice with F13A chronic treatment ($n=5$) compared with HFD mice with aCSF chronic treatment ($n=4$). $*p<0.05$. **(E)** Hepatic glycogen phosphorylase activity in fasted HFD mice with F13A chronic treatment ($n=5$) compared with HFD mice with aCSF chronic treatment ($n=4$). $*p<0.05$. **(F)** Plasma norepinephrine in fasted HFD mice with F13A chronic treatment ($n=6$) compared with HFD mice with aCSF chronic treatment ($n=5$). **(G)** Plasma epinephrine in fasted HFD mice with F13A chronic treatment ($n=6$) compared with HFD mice with aCSF chronic treatment ($n=5$). **(H)** Plasma glucagon in fasted HFD mice with F13A chronic treatment ($n=5$) compared with HFD mice with aCSF chronic treatment ($n=3$). $*p<0.05$.



Our data show that the central apelin effect on glycemia is associated to an increase in G6Pase activity in the liver, an enzyme which is known to be implicated in the control of glycogenolysis and gluconeogenesis, which is in close correlation with hyperglycemia. In spite of the absence of variations in PEPCK, glycogen synthase, and glycogen phosphorylase in normal conditions, lentivectors expressed apelin or HFD mice models, we cannot totally exclude an implication of those enzymes on hepatic glucose production in response to icv apelin. Indeed, due to a large range of time

of kinetics of glycemia (from 0 to 210 min) which could make us miss interesting results, it will be easy to speculate that specific variations of one or more types of enzymes may vary during this time-course period.

The importance of ROS in the pathological state is well documented. Obese and insulin-resistant rodents present a profoundly altered hypothalamic mROS signaling (8). Indeed, metabolic abnormal responses are in close correlation with increased hypothalamic mROS level, leading to a constitutive oxidized environment at both the cellular and

mitochondrial levels associated to a dysfunction in mitochondrial respiration (8). Here, we found that hypothalamic action of apelin needs a ROS/H₂O₂-dependent production to stimulate hepatic glucose release to induce fasted hyperglycemia. Using specific probes that detect H₂O₂ in real time, we demonstrate that exogenous apelin applied on hypothalamic explants from normal mice stimulates H₂O₂ release. Interestingly, this H₂O₂ release is exacerbated in hypothalamic explants from HFD mice. Those data are in accordance with literature linking high levels of hypothalamic mROS, and, in particular H₂O₂, are deleterious for the control of glucose homeostasis, and, more specifically, in diabetic models (23). Indeed, mitochondrial respiration that is considered the primary source of H₂O₂ (3) is profoundly increased in the hypothalamus of diabetic rodents in association with high levels of ROS (8). Our original approach to measure H₂O₂ is used here for the first time in *ex vivo* hypothalami and gives access to a new technology to determine the exact quantity of H₂O₂ release directly in tissue, which is of crucial importance to unravel the role of ROS in the biological process (32). Then, levels of H₂O₂ measured in our experimental conditions reinforced the hypothesis that an increase in H₂O₂ release by tissue is clearly associated to a pathological state (53).

In spite of the fact that apelin is known to have an antioxidant effect (16), some publications reveal that apelin may be considered a new oxidative marker. First, Yu *et al.* (58) suggest that high levels of plasma apelin observed in obese/diabetic patients may be not only the results of compensatory response to insulin resistance, but also a causative factor of insulin resistance. Then, apelin can participate in the establishment of an inflammatory and oxidative stress state observed in metabolic disorders. In neuronal cell culture, exogenous apelin treatment increases ROS production (57). Our data show that apelin effects on hepatic glucose metabolism are mediated by ROS in *in vivo* and *ex vivo* conditions. Such a deleterious environment caused by apelin in the hypothalamus may be one of the first signals triggering a diabetic state, that is, fasted hyperglycemia. The hypothesis of the existence of a link between apelin and inflammation is reinforced by our results demonstrating that apelin over-expression in the ventromedian hypothalamus increase the mRNA expression of the pro-inflammatory marker TNF α in the hypothalamus. This specific variation in hypothalamic inflammation generated by apelin, without modification of peripheral inflammation, is responsible for the emergence of a type 2 diabetic state, including fasted hyperglycemia and insulin intolerance (6). This diabetic phenotype is clearly linked with an increase in (i) G6Pase activity in the liver and (ii) plasma norepinephrine concentration. Then, alteration of hypothalamic signaling (*i.e.*, ROS and inflammation) by apelin leads to type 2 diabetes characteristics.

The role of ANS in the control of glucose homeostasis is well established. Metabolic disorders are characterized by increased basal SNS activity but an impaired sympathetic response to various stimuli, such as insulin (18). Here, we show that basal norepinephrine level is increased in hypothalamic apelin over-expressing mice, suggesting an increase in basal SNS tone activity. These data are in accordance with those of Masaki *et al.* (27), who demonstrate that a microinjection of apelin into the paraventricular nucleus of the hypothalamus increases sympathetic nerve activity.

Norepinephrine can exert its action in the whole body *via* alpha(1–2) and/or beta(1–2) receptors. In the liver of adult rodents, hepatic glucose production is regulated *via* alpha(1) receptors (28), as (i) blockade of alpha(2) receptors did not modify glycogenolysis (31), and (ii) beta receptors become irrelevant in the livers of mice at adulthood (13). Our data confirm the importance of alpha(1) regulatory pathway of glycemia, as blockade of alpha(1) adrenergic receptors failed to increase icv apelin-induced hyperglycemia. Whether SNS activation occurs early in the process or secondary to long-standing metabolic syndrome is unclear, but our data obtained after an icv acute injection of apelin strongly supports the first hypothesis. Indeed, Prior *et al.* (37) show that a short-term HFD (4 weeks) drives toward sympathetic activation associated to an increase in visceral fat depot. On the contrary, we were not able to observe a significant increase in plasma norepinephrine levels in our 3 months HFD mice. The logical explanation of this result is the fact that over time, with obesity, adrenoreceptors down-regulation and/or reduced sensitivity are likely to develop in peripheral tissue, resulting in reduced sympathetic responsiveness (18). Then, this possibility could also explain the absence of activation of gluconeogenesis but not glycogenolysis in HFD mice.

Additional to SNS regulation, hepatic glucose production is under the influence of glucagon (41). Here, we show that acute icv apelin stimulates plasma glucagon secretion in normal mice, suggesting that glucagon is able to participate to fasted hyperglycemia. In accordance to our results, the group of Cherrington clearly demonstrates that in response to a physiological rise in glucagon, the increase observed in hepatic glucose production is entirely attributable to glycogenolysis but not (or little to quote the authors) to gluconeogenesis (41). Then, glucagon could be one important molecular actor participating in deleterious central action of apelin during the onset of a type 2 diabetes. In longer time, when type 2 diabetes is well established, icv apelin cannot increase glucagon secretion as observed in HFD mice, suggesting that hyperglucagonemia of those diabetic mice is too important to be even more increased. For all these reasons, therapeutic strategies cannot rule out the importance of pancreatic alpha cells as potential good targets to treat hyperglycemia and insulin resistance (5). In our central apelin to liver axis, the participation of glucagon to hyperglycemia is real, but lentivectors approach tends to focus on a direct norepinephrine action on liver, as plasma norepinephrine is increased in lentivectors apelin mice, but not glucagon.

Our data show that central apelin participates in the establishment of type 2 diabetes. We have previously shown that obese/diabetic mice present an increase in plasma apelin (11) and in hypothalamic apelin expression (42). The hypothalamus is a neurohemal structure that facilitates communication with peripheral signal, including hormones and metabolites. Then, in physiological and pathological conditions, the hypothalamus may be influenced by hypothalamic and/or peripheral apelin. To test whether targeting central apelin in an advanced type 2 diabetes could ameliorate the metabolic phenotype, we have injected obese/diabetic mice (3 months HFD) during 14 consecutive days with icv APJ antagonist. This experimental approach blocks the potential effect of hypothalamic and peripheral apelin on hypothalamic neurons. Then, we found that icv APJ antagonist-treated mice present a clear amelioration of their diabetic state, including a decrease in insulin

intolerance, fasted hyperglycemia, plasma glucagon, and liver glycogen content associated to an increase in glycogen phosphorylase activity. No significant variation in plasma norepinephrine and epinephrine was observed between the two groups, reinforcing the hypothesis of a possible adrenoreceptor down-regulation in specific tissue and/or reduced sympathetic responsiveness as explained next. These data confirm that the decrease in glycogen content and fasted hyperglycemia is the result of an increase in insulin sensitivity provoked by blockade of central apelin. We can speculate that a longer time treatment may modify the activities of others targets such as G6Pase, PEPCK, and glycogen synthase. In fact, we show that in a well-established diabetic models (HFD), central apelin may be a potential target to treat diabetes, with a similar peripheral target to prediabetic mice (mimicked by icv apelin injected mice and apelin expressed lentivirals mice), that is, the liver.

Although the present set of experiments link hypothalamic apelin/ROS with hepatic glucose metabolism, we acknowledge that the exact molecular and cellular mechanisms implicated in the cross-talks observed between these key organs remained to be elucidated.

In conclusion, we identify a hypothalamic apelin/ROS signaling pathway that is implicated in the control of liver glucose metabolism *via* the SNS. Abnormal hypothalamic level of apelin observed in obese/diabetic mice participates in over-activation of SNS, which improves fasted hyperglycemia a characteristic of type 2 diabetes. Thus, we propose that central apelin could be one new target at the core of the regulation of glucose homeostasis and metabolic disorders.

Materials and Methods

Mice

Animals were handled in accordance with the principles and guidelines established by the National Institute of Medical Research (INSERM) and by the local ethical committee. C57Bl6/J mice were obtained from Charles River Laboratory. Mice were housed conventionally at a constant temperature (20°C–22°C) and humidity (50%–60%) animal room and with a 12/12 h light/dark cycle (lights off at 7:00 AM) and free access to food and water through the 24 h period. All injections and experiments were performed in 13–15-week-old males. A group of male mice was subjected to HFD containing 20% protein, 35% carbohydrate, and 45% fat (SAFE). HFD-fed mice were followed at regular intervals with measure of weight and blood parameters (glucose, insulin) until they were obese and insulin resistant corresponding to 3 months of HFD. Experiments were performed on 6 h-fasted mice. During the time of the experiment, mice fed overnight were placed in a new clean cage without food. In all experiments, icv apelin did not modify body weight of mice (11) and general behavior (unpublished data).

Plasmid construction and lentivector production

The lentiviral plasmid pTRIP-DU3-CMV-MCS was derived from the pTRIP-DU3-EF1a-EGFP plasmid by replacing the EF1a promoter and EGFP by the cytomegalovirus (CMV) promoter and a multiple cloning site (MCS), respectively (50). The cDNA encoding the murine apelin gene (EMBL accession number AJ290423), corresponding to the coding region flanked by 100 and 23 nucleotides of 5'- and 3'-untranslated regions, respectively, was subcloned into the lentivectorpTRIP-DU3-

CMV-MCS (43). The lentivectors were produced by tri-transfection of pTRIP-DU3-CMV-apelin and pLvPack and pLvVSVG packaging plasmids (Sigma-Aldrich) in HEK 293FT cells (4).

Surgical procedures

For *in vivo* acute perfusions, an indwelling icv catheter (Alzet Brain Perfusion Kit 3; 1–3 mm (Charles River Laboratory) – 1 mm lateral to the sagittal suture, – 0.2 mm posterior to the bregma and – 1.7 mm below the skull surface) was implanted in anesthetized mice with isoflurane (Abbott).

Acute injections

Apelin. Bolus injection of 2 μ l of [Pyr]apelin-13 (concentration 20 nM corresponding to 40 fmol; Bachem), the most active apelin isoform (10), was injected directly into the icv catheter completed to 2 μ l of artificial cerebrospinal fluid (aCSF) for treated mice, or 4 μ l of aCSF for control mice. Blood glycemia was measured every 30 min from – 30 to 210 min (time 0 corresponding to icv apelin injection). The dose of apelin (2 μ l of 20 nM, *i.e.*, 40 fmol) corresponds approximately to the half quantity of total tissular apelin found in a normal mouse hypothalamus (near to 74 fmol per hypothalamus), and this injection leads approximately to the quantity found in an HFD mouse (near to 111 fmol per hypothalamus).

Antioxidant. Similar experiments were performed with an antioxidant, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox; Sigma), which was dissolved extemporaneously in aCSF, and then infused at a concentration of 1 mM (2 μ l). At this concentration, trolox is known to prevent peripheral hyperinsulinemia by blocking hypothalamic ROS production *in vivo* (24). Trolox infusion was started 30 min before the beginning of the apelin injection.

Inhibitor of NADPH oxidase. Similar experiments were performed with an inhibitor of NADPH oxidase, DPI chloride (Sigma), which was dissolved extemporaneously in aCSF, and then infused at a concentration of 1 mM (2 μ l). At this concentration, DPI inhibits NADPH oxidase in the brain (19). DPI infusion was started 30 min before the beginning of the apelin injection.

APJ antagonist. Similar experiments were performed with an APJ antagonist, F13A (polypeptide) (22), which was dissolved extemporaneously in aCSF, and then infused at a concentration of 2 μ g/mouse (2 μ l). At this concentration, F13A inhibits apelin effects in the brain (26). F13A infusion was started 30 min before the beginning of the apelin injection.

Intraperitoneal injection of antagonist of α 1-adrenergic receptors. 120 min before apelin or aCSF icv injection, prazosin (Prazosin hydrochloride; Sigma) was injected intraperitoneally as previously described (39). Prazosin was dissolved extemporaneously in saline solution, and then infused at a concentration of 0.3 mg/kg. At this concentration, prazosin blocks α 1-adrenergic receptors without perturbation of fasted glycemia (20).

Chronic injections

F13A. Male mice fed a HFD during 3 months received every day during 2 weeks a bolus injection of 2 μ l of F13A

(2 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) that was injected directly into the icv catheter completed to 2 μl of aCSF for treated HFD mice, or 4 μl of aCSF for control HFD mice.

Bilateral lentivector injection in the MBH

Protocol is explained in details in Supplementary Materials and Methods section.

H₂O₂ measurements by fluorometric methods

Amplex Red (10-acetyl-3,7-dihydrophenoxazine) was used as a fluorescent probe for the detection of H₂O₂. Protocol is explained in detail in Supplementary Materials and Methods section.

Real-time amperometric H₂O₂ measurements

Mice were sacrificed after 6 h of fasting conditions. Protocol is explained in details in Supplementary Materials and Methods section. Data are expressed as delta variation of H₂O₂ release from basal as previously used for amperometric nitric oxide (NO) measurement (11, 12).

Tissues

Mice were fasted for 6 h, and blood samples were collected between 15 and 30 min after the acute injection of apelin or aCSF (these times correspond to the period of release of glucose by the liver glycogenolysis), or after the 6 h fasted for mice with lentivirus injection. Plasma was removed and frozen, powdered in liquid nitrogen, and kept at -80°C until catecholamine assays were performed. Mice were also decapitated without anesthesia. After dissection, liver fragments were also rapidly removed, frozen, powdered in liquid nitrogen, and kept at -80°C until glycogen assays were performed.

Liver glycogen determination

Glycogen content was determined as previously described (21) and explained in the Supplementary Materials and Methods section.

Enzymatic activities

Hepatic G6Pase activity was determined as previously described in detail (40). Results are expressed as $\mu\text{moles}/\text{min}$ per gram of wet tissue. Hepatic PEPCK activity was determined with the methods of Pogson and Smith (35). Results are expressed as nmol/min per gram of wet tissue. Hepatic glycogen phosphorylase activity assay was determined as previously described (33). Results are expressed as a percentage of activity. Glycogen Synthase activity was evaluated by the ratio of phosphorylated protein/total protein. Immunoblots were performed as previously described (11). Membranes were incubated overnight at 4°C with a primary polyclonal antibody against total Glycogen Synthase (dilution 1/1000; Cell Signaling Technology) or the phosphorylated active form (Ser641) of Glycogen Synthase (dilution 1/1000; Cell Signaling Technology).

Histological revelation of glycogen or lipid content

Liver lobe was taken along with the tissues for different assays. The samples were included in Carnoy solution for

24 h, then in 20% sucrose solution for 48 h, and then frozen at -80°C in tissue Teck (Polyfreez; Sigma). Ten-micrometer-thin cryostat sections were made from livers. Glycogen was visualized with Periodic Acid-Schiff staining. The quantifying of the staining was performed with the software Adobe[®] Photoshop[®]. Lipids were visualized by Oil-Red staining. Hepatic TGs content was determined as described (17).

Plasma assays

Plasma catecholamine concentration was measured after 6 h of fasting in all protocols and after 6 h of fasting and 30 min for acute icv treatment. Catecholamine content of the plasma was determined as previously described in detail using high-performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection after alumina extraction (29). Plasma glucagon content was determined with a commercial available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Glucagon Quantikine; R&D Systems). Plasma ketone bodies content was determined with a commercial kit (Ketone bodies assay kit, Antibodies). Plasma apelin content was determined with a commercial available ELISA kit (Phoenix Pharmaceuticals). Plasma TGs were determined as described (17).

Pyruvate tolerance test

Six-hour-fasted mice were injected with an intraperitoneal pyruvate injection (2 mg/g) after an icv acute injection or unless icv injection (lentivirus). Blood was collected from the tail vein at $-30, 0, 15, 30, 45, 60, 90,$ and 120 min later for determination of glucose levels.

Insulin tolerance test

Six-hour-fasted mice were injected with an intraperitoneal insulin injection (0.5 mU/g for mice with lentivirus, or 1 mU/g for HFD mice with chronic icv F13A treatment), as previously described (52). Blood was collected from the tail vein at $-30, 0, 15, 30, 45, 60, 90,$ and 120 min later for determination of glucose levels.

Real-time PCR

Total RNA from tissues was prepared using the TriPure reagent (Roche) as described (14, 17). Quantization and integrity analysis of total RNA was performed as previously described (17). Protocol is explained in detail in Supplementary Materials and Methods section.

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm SEM. The statistical significance of differences was analyzed by student t-test, by two-way ANOVA followed by a *post hoc* t-test, or one way followed by *post hoc* Bonferroni's or Dunnett's multiple comparison test, when appropriate. Statistical analyses were assessed by using GraphPad Prism version 5.00 for windows (GraphPad Software). Results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Acknowledgments

The authors are grateful to Valérie Montel and Edith Renaud for technical assistance and Yannick Delpu and H el ene Le Bras for helpful discussion. P.D.C. is a research associate

from the FRS-FNRS (Fonds de la Recherche Scientifique), Belgium. This work was supported by the Société Française de Nutrition (SFN).

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Agius L. New hepatic targets for glycaemic control in diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 21: 587–605, 2007.
- Anderson EJ, Lustig ME, Boyle KE, Woodlief TL, Kane DA, Lin CT, Price JW, 3rd, Kang L, Rabinovitch PS, Szeto HH, Houmard JA, Cortright RN, Wasserman DH, and Neuffer PD. Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J Clin Invest* 119: 573–581, 2009.
- Bao L, Avshalumov MV, Patel JC, Lee CR, Miller EW, Chang CJ, and Rice ME. Mitochondria are the source of hydrogen peroxide for dynamic brain-cell signaling. *J Neurosci* 29: 9002–9010, 2009.
- Bernard H, Garmy-Susini B, Ainaoui N, Van Den Berghe L, Peurichard A, Javerzat S, Bikfalvi A, Lane DP, Bourdon JC, and Prats AC. The p53 isoform, Delta133p53alpha, stimulates angiogenesis and tumour progression. *Oncogene* 32: 2150–2160, 2012.
- Burcelin R, Knauf C, and Cani PD. Pancreatic alpha-cell dysfunction in diabetes. *Diabetes Metab* 34 Suppl 2: S49–S55, 2008.
- Cai D. Neuroinflammation and neurodegeneration in overnutrition-induced diseases. *Trends Endocrinol Metab* 24: 40–47, 2013.
- Castan-Laurell I, Dray C, Knauf C, Kunduzova O, and Valet P. Apelin, a promising target for type 2 diabetes treatment? *Trends Endocrinol Metab* 23: 234–241, 2012.
- 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.
- Consoli A. Role of liver in pathophysiology of NIDDM. *Diabetes Care* 15: 430–441, 1992.
- Dray C, Knauf C, Daviaud D, Waget A, Boucher J, Buleon M, Cani PD, Attane C, Guigne C, Carpenne C, Burcelin R, Castan-Laurell I, and Valet P. Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 8: 437–445, 2008.
- Duparc T, Colom A, Cani PD, Massaly N, Rastrelli S, Drougard A, Le Gonidec S, Mouldous L, Frances B, Lelercq I, Llorens-Cortes C, Pospisilik JA, Delzenne NM, Valet P, Castan-Laurell I, and Knauf C. Central apelin controls glucose homeostasis via a nitric oxide-dependent pathway in mice. *Antioxid Redox Signal* 15: 1477–1496, 2011.
- Duparc T, Naslain D, Colom A, Muccioli GG, Massaly N, Delzenne NM, Valet P, Cani PD, and Knauf C. Jejunal inflammation in obese and diabetic mice impairs enteric glucose detection and modifies nitric oxide release in the hypothalamus. *Antioxid Redox Signal* 14: 415–423, 2011.
- Erraji-Benchekroun L, Couton D, Postic C, Borde I, Gaston J, Guillet JG, and Andre C. Overexpression of beta2-adrenergic receptors in mouse liver alters the expression of gluconeogenic and glycolytic enzymes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E715–E722, 2005.
- Everard A, Geurts L, Van Roye M, Delzenne NM, and Cani PD. Tetrahydro iso-alpha acids from hops improve glucose homeostasis and reduce body weight gain and metabolic endotoxemia in high-fat diet-fed mice. *PLoS One* 7: e33858, 2012.
- Fisher-Wellman KH and Neuffer PD. Linking mitochondrial bioenergetics to insulin resistance via redox biology. *Trends Endocrinol Metab* 23: 142–153, 2012.
- Foussal C, Lairez O, Calise D, Pathak A, Guilbeau-Frugier C, Valet P, Parini A, and Kunduzova O. Activation of catalase by apelin prevents oxidative stress-linked cardiac hypertrophy. *FEBS Lett* 584: 2363–2370, 2010.
- Geurts L, Everard A, le Ruyet P, Delzenne NM, and Cani PD. Ripened dairy products differentially affect hepatic lipid content and adipose tissue oxidative stress markers in obese and type 2 diabetic mice. *J Agric Food Chem* 60: 2063–2068, 2012.
- Greenfield JR and Campbell LV. Role of the autonomic nervous system and neuropeptides in the development of obesity in humans: targets for therapy? *Curr Pharm Des* 14: 1815–1820, 2008.
- Jaillard T, Roger M, Galinier A, Guillou P, Benani A, Leloup C, Casteilla L, Penicaud L, and Lorsignol A. Hypothalamic reactive oxygen species are required for insulin-induced food intake inhibition: an NADPH oxidase-dependent mechanism. *Diabetes* 58: 1544–1549, 2009.
- John GW, Doxey JC, Walter DS, and Reid JL. The role of alpha- and beta-adrenoceptor subtypes in mediating the effects of catecholamines on fasting glucose and insulin concentrations in the rat. *Br J Pharmacol* 100: 699–704, 1990.
- Knauf C, Cani PD, Perrin C, Iglesias MA, Maury JF, Bernard E, Benhamed F, Gremeaux T, Drucker DJ, Kahn CR, Girard J, Tanti JF, Delzenne NM, Postic C, and Burcelin R. Brain glucagon-like peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage. *J Clin Invest* 115: 3554–3563, 2005.
- Lee DK, Saldivia VR, Nguyen T, Cheng R, George SR, and O'Dowd BF. Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action. *Endocrinology* 146: 231–236, 2005.
- 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: 519–530, 2011.
- 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.
- Levin BE, Magnan C, Dunn-Meynell A, and Le Foll C. Metabolic sensing and the brain: who, what, where, and how? *Endocrinology* 152: 2552–2557, 2011.
- Lv SY, Qin YJ, Wang NB, Yang YJ, and Chen Q. Supraspinal antinociceptive effect of apelin-13 in a mouse visceral pain model. *Peptides* 37: 165–170, 2012.
- Masaki T, Yasuda T, and Yoshimatsu H. Apelin-13 microinjection into the paraventricular nucleus increased sympathetic nerve activity innervating brown adipose tissue in rats. *Brain Res Bull* 87: 540–543, 2012.
- Miyamoto L, Ebihara K, Kusakabe T, Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Sakai T, Aizawa-Abe M, Yamamoto Y, Fujikura J, Hayashi T, Hosoda K, and Nakao K. Leptin activates hepatic 5'-AMP-activated protein kinase through

- sympathetic nervous system and alpha1-adrenergic receptor: a potential mechanism for improvement of fatty liver in lipodystrophy by leptin. *J Biol Chem* 287: 40441–40447, 2012.
29. Molendi-Coste O, Grumolato L, Laborie C, Lesage J, Maubert E, Ghzili H, Vaudry H, Anouar Y, Breton C, and Vieau D. Maternal perinatal undernutrition alters neuronal and neuroendocrine differentiation in the rat adrenal medulla at weaning. *Endocrinology* 147: 3050–3059, 2006.
 30. Moore MC, Connolly CC, and Cherrington AD. Autoregulation of hepatic glucose production. *Eur J Endocrinol* 138: 240–248, 1998.
 31. Morgan NG, Blackmore PF, and Exton JH. Age-related changes in the control of hepatic cyclic AMP levels by alpha 1- and beta 2-adrenergic receptors in male rats. *J Biol Chem* 258: 5103–5109, 1983.
 32. Murphy MP, Holmgren A, Larsson NG, Halliwell B, Chang CJ, Kalyanaraman B, Rhee SG, Thornalley PJ, Partridge L, Gems D, Nystrom T, Belousov V, Schumacker PT, and Winterbourn CC. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab* 13: 361–366, 2011.
 33. Perez-Maceira JJ, Mancebo MJ, and Aldegunde M. Serotonin-induced brain glycogenolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 215: 2969–2979, 2012.
 34. Pocai A, Morgan K, Buettner C, Gutierrez-Juarez R, Obici S, and Rossetti L. Central leptin acutely reverses diet-induced hepatic insulin resistance. *Diabetes* 54: 3182–3189, 2005.
 35. Pogson CI and Smith SA. The activity of phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat tissues. Assay techniques and effects of dietary and hormonal changes. *Biochem J* 152: 401–408, 1975.
 36. Postic C, Dentin R, and Girard J. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab* 30: 398–408, 2004.
 37. Prior LJ, Eikelis N, Armitage JA, Davern PJ, Burke SL, Montani JP, Barzel B, and Head GA. Exposure to a high-fat diet alters leptin sensitivity and elevates renal sympathetic nerve activity and arterial pressure in rabbits. *Hypertension* 55: 862–868, 2010.
 38. Prodi E and Obici S. Minireview: the brain as a molecular target for diabetic therapy. *Endocrinology* 147: 2664–2669, 2006.
 39. Purkayastha S, Zhang H, Zhang G, Ahmed Z, Wang Y, and Cai D. Neural dysregulation of peripheral insulin action and blood pressure by brain endoplasmic reticulum stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 2939–2944, 2011.
 40. Rajas F, Bruni N, Montano S, Zitoun C, and Mithieux G. The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology* 117: 132–139, 1999.
 41. Ramnanan CJ, Edgerton DS, Kraft G, and Cherrington AD. Physiologic action of glucagon on liver glucose metabolism. *Diabetes Obes Metab* 13 Suppl 1: 118–125, 2011.
 42. Reaux-Le Goazigo A, Bodineau L, De Mota N, Jeandel L, Chartrel N, Knauf C, Raad C, Valet P, and Llorens-Cortes C. Apelin and the proopiomelanocortin system: a new regulatory pathway of hypothalamic alpha-MSH release. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301: E955–E966, 2011.
 43. Saint-Geniez M, Masri B, Malecaze F, Knibiehler B, and Audigier Y. Expression of the murine msr/apj receptor and its ligand apelin is upregulated during formation of the retinal vessels. *Mech Dev* 110: 183–186, 2002.
 44. Shimazu T. The effect of electric stimulation of hypothalamus on rabbit liver tryptophan pyrrolase. *Biochim Biophys Acta* 65: 373–375, 1962.
 45. Shimazu T and Fujimoto T. Regulation of glycogen metabolism in liver by the autonomic nervous system. IV. Neural control of glycogen biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 252: 18–27, 1971.
 46. Shimazu T and Fukuda A. Increased activities of glycogenolytic enzymes in liver after splanchnic-nerve stimulation. *Science* 150: 1607–1608, 1965.
 47. Shimazu T. Central nervous system regulation of liver and adipose tissue metabolism. *Diabetologia* Suppl:343–356, 1981.
 48. Shimazu T, Fukuda A, and Ban T. Reciprocal influences of the ventromedial and lateral hypothalamic nuclei on blood glucose level and liver glycogen content. *Nature* 210: 1178–1179, 1966.
 49. Shimazu T and Ogasawara S. Effects of hypothalamic stimulation on gluconeogenesis and glycolysis in rat liver. *Am J Physiol* 228: 1787–1793, 1975.
 50. Sirven A, Ravet E, Charneau P, Zennou V, Coulombel L, Guetard D, Pflumio F, and Dubart-Kupperschmitt A. Enhanced transgene expression in cord blood CD34(+) derived hematopoietic cells, including developing T cells and NOD/SCID mouse repopulating cells, following transduction with modified trip lentiviral vectors. *Mol Ther* 3: 438–448, 2001.
 51. Thaler JP and Schwartz MW. Minireview: inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. *Endocrinology* 151: 4109–4115, 2010.
 52. Tiraby C, Tavernier G, Capel F, Mairal A, Crampes F, Rami J, Pujol C, Boutin JA, and Langin D. Resistance to high-fat-diet-induced obesity and sexual dimorphism in the metabolic responses of transgenic mice with moderate uncoupling protein 3 overexpression in glycolytic skeletal muscles. *Diabetologia* 50: 2190–2199, 2007.
 53. Veal E and Day A. Hydrogen peroxide as a signaling molecule. *Antioxid Redox Signal* 15: 147–151, 2011.
 54. Villeneuve C, Guilbeau-Frugier C, Sicard P, Lairez O, Ordener C, Duparc T, De Paulis D, Couderc B, Spreux-Varoquaux O, Tortosa F, Garnier A, Knauf C, Valet P, Borchi E, Nediani C, Gharib A, Ovize M, Delisle MB, Parini A, and Mialet-Perez J. p53-PGC-1alpha pathway mediates oxidative mitochondrial damage and cardiomyocyte necrosis induced by monoamine oxidase-A upregulation: role in chronic left ventricular dysfunction in mice. *Antioxid Redox Signal* 18: 5–18, 2012.
 55. Wahren J and Ekberg K. Splanchnic regulation of glucose production. *Annu Rev Nutr* 27: 329–345, 2007.
 56. Yamada T and Katagiri H. Avenues of communication between the brain and tissues/organs involved in energy homeostasis. *Endocr J* 54: 497–505, 2007.
 57. Yao F, Modgil A, Zhang Q, Pingili A, Singh N, O'Rourke ST, and Sun C. Pressor effect of apelin-13 in the rostral ventrolateral medulla: role of NAD(P)H oxidase-derived superoxide. *J Pharmacol Exp Ther* 336: 372–380, 2011.
 58. Yu S, Zhang Y, Li MZ, Xu H, Wang Q, Song J, Lin P, Zhang L, Liu Q, Huang QX, Wang K, and Hou WK. Chemerin and apelin are positively correlated with inflammation in obese type 2 diabetic patients. *Chin Med J (Engl)* 125: 3440–3444, 2012.

Address correspondence to:

Dr. Claude Knauf

I2MC, CHU Rangueil

1 Avenue Jean Poulhès, BP 84225

31432 Toulouse Cedex 4

France

E-mail: claude.knauf@inserm.fr

Date of first submission to ARS Central, January 4, 2013; date of final revised submission, July 3, 2013; date of acceptance, July 22, 2013.

Abbreviations Used

aCSF = artificial cerebrospinal fluid
ANS = autonomous nervous system
AR = Amplex Red
AUC = area under the curve
CMV = cytomegalovirus
DPI = diphenyleneiodonium
ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay
FFA = free fatty acid

G6Pase = glucose-6 phosphatase
H₂O₂ = hydrogen peroxide
HFD = high-fat diet
HRP = horseradish peroxidase
icv = intracerebroventricular
ITT = insulin tolerance test
MBH = medio-basal hypothalamus
MCS = multiple cloning site
mROS = mitochondrial reactive oxygen species
NO = nitric oxide
PBS = phosphate-buffered saline
PEPCK = phosphoenol pyruvate carboxykinase
ROS = reactive oxygen species
SNS = sympathetic nervous system
TG = triglycerides



Impact of hypothalamic reactive oxygen species in the regulation of energy metabolism and food intake

Anne Drougard*, Audren Fournel, Philippe Valet and Claude Knauf*

NeuroMicrobiota, European Associated Laboratory, INSERM/UCL, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), CHU Rangueil, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

Edited by:

Marc Claret, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Spain

Reviewed by:

Christophe Magnan, University Paris Diderot, France
Zane B. Andrews, Monash University, Australia

*Correspondence:

Anne Drougard and Claude Knauf, NeuroMicrobiota, European Associated Laboratory, INSERM/UCL, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), CHU Rangueil, Université Paul Sabatier, 1 Avenue du Professeur Jean Poulhès, Bâtiment L4 - BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France
e-mail: anne.drougard@inserm.fr; claude.knauf@inserm.fr

Hypothalamus is a key area involved in the control of metabolism and food intake via the integrations of numerous signals (hormones, neurotransmitters, metabolites) from various origins. These factors modify hypothalamic neurons activity and generate adequate molecular and behavioral responses to control energy balance. In this complex integrative system, a new concept has been developed in recent years, that includes reactive oxygen species (ROS) as a critical player in energy balance. ROS are known to act in many signaling pathways in different peripheral organs, but also in hypothalamus where they regulate food intake and metabolism by acting on different types of neurons, including proopiomelanocortin (POMC) and agouti-related protein (AgRP)/neuropeptide Y (NPY) neurons. Hypothalamic ROS release is under the influence of different factors such as pancreatic and gut hormones, adipokines (leptin, apelin,...), neurotransmitters and nutrients (glucose, lipids,...). The sources of ROS production are multiple including NADPH oxidase, but also the mitochondria which is considered as the main ROS producer in the brain. ROS are considered as signaling molecules, but conversely impairment of this neuronal signaling ROS pathway contributes to alterations of autonomic nervous system and neuroendocrine function, leading to metabolic diseases such as obesity and type 2 diabetes. In this review we focus our attention on factors that are able to modulate hypothalamic ROS release in order to control food intake and energy metabolism, and whose deregulations could participate to the development of pathological conditions. This novel insight reveals an original mechanism in the hypothalamus that controls energy balance and identify hypothalamic ROS signaling as a potential therapeutic strategy to treat metabolic disorders.

Keywords: ROS, hypothalamus, food intake, metabolism, diabetes, obesity

INTRODUCTION

The role of the brain in the control of energy homeostasis has been suggested at the middle of the nineteenth century by Claude Bernard who was the first to evoke its importance with the famous experiment “la piqûre diabétique” (Bernard, 1849). Indeed, he observed an important rise of glycemia after a stimulation of the floor of the fourth ventricle. In 1953, Gordon Kennedy identified the precise brain area involved in this phenomenon. He has demonstrated that circulating factors released by the adipose tissue could reach the hypothalamus in order to modulate food intake and energy expenditure, and thus regulate body weight (Kennedy, 1953). Moreover, the medio-basal hypothalamus is a privileged central area which directly senses various factors (hormones, metabolites). In fact, at the close proximity of the arcuate nucleus (ARC), the median eminence is a circumventricular organ that presents a blood-brain barrier-free area that allows peripheral factors to inform hypothalamic structures about the energy status (Rodríguez et al., 2010). Since 1940, the development of stereotaxic methods in animals has offered researchers the opportunity to practice stimulation or localized destructions

of various hypothalamic nuclei, and then identified their precise role (Brobeck, 1946).

The first neurons in contact with peripheral signals are called “neurons of first order.” These neurons are only present in the ARC (Cone et al., 2001) and a lesion of this hypothalamic region induces hyperphagia and obesity (Olney, 1969). It is largely well described in the literature that the ARC presents two subsets of neurons that have opposite effects on feeding. One of these group of neurons express pro-opiomelanocortin (POMC) and cocaine-amphetamine-regulated transcript (CART), and upon stimulation, these neurons produce anorectic effects (Cone, 2005). The POMC precursor is cleaved into α -melanocyte-stimulating hormones (α -MSH) which reduces food intake, body weight and increases energy expenditure (Kim et al., 2000; Yasuda et al., 2004). The second group of neurons in the ARC leads to orexigenic responses upon activation. These neurons express neuropeptide Y (NPY) and the agouti-gene-related transcript (AgRP) (Clark et al., 1984; Rossi et al., 1998) which stimulate food intake and reduce energy expenditure (Fekete et al., 2002). In genetically-modified obese rodents, as well as in fasted normal

animals, NPY mRNA expression and protein content are elevated in ARC (Sanacora et al., 1990; Wilding et al., 1993; Park et al., 2004). Collectively, this suggests that (1) over-activation or dysfunction of NPY neurons is involved in the emergence of metabolic diseases, but also that (2) NPY neurons can inhibit melanocortin system. Interestingly, subsets of POMC neurons contain both gamma amino butyric acid (GABA) and glutamate (Dicken et al., 2012). Subsets of NPY neurons also contain GABA (Horvath et al., 1997) and GABA from NPY neurons participates to inhibition of POMC neurons. This unidirectional input from the NPY to POMC cells brings to light one anatomical basis of energy regulation. This neuronal interaction seems to favor the tonic inhibition of satiety signal, and also promotes feeding or over-feeding when food is available in excess. This finding reinforces the key role of an intact melanocortin system in the control of energy balance.

The POMC and NPY/AgRP neurons of the ARC interact with various brain regions that include hypothalamic areas such as ventromedial hypothalamus (VMH), dorsomedial hypothalamus (DMH), paraventricular nucleus (PVN) and lateral hypothalamus (LH) (Wynne et al., 2005). Lesion studies in rodent have shown that ablation of VMH, DMH or PVN results in hyperphagia and obesity (Leibowitz et al., 1981; Shimizu et al., 1987; Bellinger and Bernardis, 2002) whereas lesions in the LH lead to hypophagia (Bernardis and Bellinger, 1993). To summarize, a proposal of dual-center model has been proposed that identifies the VMH as the “satiety center” and the LH as the “hunger center” (Stellar, 1994).

These hypothalamic nuclei have the ability to sense the level of available fuel energy in the body. This detection of peripheral signals involves various molecular actors such as classical neurotransmitters but also “non-classical” diffusible molecules such as reactive nitrogen species (RNS) and reactive oxygen species (ROS). To this aim, nitric oxide (NO) is an atypical molecular actor which belongs to RNS family, but could also be associated to ROS family since it is a radical gas derived from nitric and oxygen. NO has a very short half-life and can largely diffuse in cells (Palmer et al., 1987). It has a single electron, allowing numerous interactions with cellular components. In the brain, chemical properties of NO permits its diffusion across hypothalamic cells to control neurotransmitter release (Ohkuma and Katsura, 2001), but also synaptic plasticity (Shibuki and Okada, 1991), that leads to the modulation of food intake (Morley and Flood, 1991) and glucose metabolism (Duparc et al., 2011a). In addition to RNS, recent data argue that differential fuel utilization in response to nutrients is linked to ROS formation. This ROS generation is not merely a “byproduct” of substrate oxidation, but has a crucial role in regulating neuronal response in a substrate-dependent manner.

In this review, we will describe the molecular mechanisms generating ROS in response to metabolic signals, in order to control metabolism and food intake. In physiological conditions, ROS production is considered as a signaling actor produced at low level and in a transient manner. On the other hand, over-production of ROS, associated to a dysfunction of ROS buffering systems, can lead to the development of chronic diseases. Thus, central chronic ROS release participates in the establishment of numerous diseases such as type 2 diabetes (T2D), but also in cancer

and neurodegenerative disorders (as Parkinson and Alzheimer disease).

ROS PRODUCTION: FOCUS ON NEURONAL CELLS

INTRODUCTION

ROS are radical species derived from oxygen of which the most known are the superoxide anion (O_2^-), the hydrogen peroxide (H_2O_2) and the hydroxyl radical (OH^-). These “free-radical” ROS have unpaired electrons on an oxygen atom. This property makes ROS very unstable as they react quickly with others surrounding chemical molecules in order to pair their electrons. These radical reactions often lead to a new radical formation generating a chain reaction, and thus activate numerous signaling pathways (Gutteridge and Halliwell, 2000).

Within the cell, all processes using oxygen may produce ROS. However, the mitochondrial transport electron chain is a major source of ROS generation in physiological conditions (Bashan et al., 2009). ROS are also produced by the NADPH oxidases (NOX) which are membrane-bound enzymatic complexes able to transfer electrons from cytosolic NADPH to oxygen (Lambeth, 2004; Hordijk, 2006). Finally, another source of ROS is the endoplasmic reticulum (ER) (Cross and Jones, 1991) and the peroxisome (Schrader and Fahimi, 2006).

In order to limit ROS concentration, cells are equipped with various enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems. Several enzymes directly degrade ROS such as the superoxide dismutase (SOD), the catalase and the glutathione peroxidase (Turrens, 2003). Various non-enzymatic scavengers can also support detoxification of free radicals. The majority are lipophilic (vitamin E, ubiquinone or coenzyme Q, and carotenoids) or hydrophilic (vitamin C, glutathione) (Clark, 2002).

When ROS are moderately and transiently produced, they are able to reversibly modify some surrounding targets and act as “signal” molecules (Droge, 2002). However, when oxidants-antioxidants balance is altered, due to an excessive production of ROS and/or a decrease in antioxidant systems, and is associated to the expansion of oxidative stress (Droge, 2002), ROS become toxic to the cell, and could be involved in the development of specific diseases markers such as insulin resistance and type 2 diabetes (Bashan et al., 2009).

ROS AND NEURONS

ROS are also strongly present in the brain. The large majority of ROS produced by neurons have a mitochondrial origin (Bao et al., 2009). However, localization of NOX in different regions of the central nervous system have been determined by immunohistochemical approaches in rats (Kim et al., 2005) and mice (Serrano et al., 2003). Indeed, NOX are present in hippocampus, cortex, amygdala, striatum, thalamus and hypothalamus.

ROS can act directly on the brain to control many central functions. Neurons can sense, transmit and convert ROS signals into appropriate intracellular responses, including synaptic plasticity. For example, NOX activity in the hippocampus is required to induce normal cellular process in these neurons, such as long-term potentiation (a form of activity-dependent synaptic plasticity) and hippocampus-dependent memory (Infanger et al., 2006). ROS production by mitochondria also occurs in the

hypothalamus, and NOX subunits are also present in the ARC, VMN, and PVN (Infanger et al., 2006). Hypothalamus is a key area involved in control of glucose homeostasis (Knauf et al., 2013). Indeed, a population of specialized hypothalamic neurons is identified as gluco-sensors (Oomura et al., 1964). These neurons are classified into two categories, which differ both by their mode of action and by their precise localization, i.e., neurons excited by glucose (named glucose-excited or GE) and neurons inhibited by glucose (named glucose-inhibited or GI). Raising plasma glucose level after a large meal results in an increased brain level to 4,5 mM and an increase in brain glucose activates GE neurons, while GI remain inactive (Routh, 2002). At the opposite, during a period of fasting, reduction in the concentration of brain glucose inhibits GE neurons and activates GI ones (Routh, 2010). Although K_{ATP} channels seem to be essential for the function of gluco-sensors, several studies show a depolarization of these neurons via K_{ATP} channels independent mechanisms (Ainscow et al., 2002; Fioramonti et al., 2004). Among these mechanisms, mitochondrial ROS (mROS) are clearly involved in hypothalamic glucose sensing (Leloup et al., 2006). Indeed, a transient increase of glucose stimulates mROS generation on hypothalamic slices *ex vivo*. In addition, intra-carotid glucose load (therefore only detectable by the hypothalamus) in rats triggers a significant increase of ARC neuronal activity (Leloup et al., 2006) which is abolished by a co-injection of the antioxidant enzyme catalase. These results demonstrate that hypothalamic glucose sensing requires the acute generation of ROS as signaling molecules to induce a neuronal response.

Strong evidences demonstrate that ROS action in the brain can affect most of the peripheral tissues via the Autonomous Nervous System (ANS). For example, Zimmerman et al., observed that O_2^- was necessary to elicit vasopressor and bradycardiac responses produced by intracerebroventricular (icv) administration of Angiotensin-II (Ang-II) in mice. Indeed, scavenging O_2^- in brain completely abolished cardiovascular actions of Ang-II (Zimmerman et al., 2002). Moreover, central administration of a SOD mimetic attenuates the increase in renal sympathetic nerve activity, norepinephrine release and blood pressure induced by icv injection of Ang-II (Campese et al., 2004, 2005; Lu et al., 2004). Therefore, ROS in the brain are of crucial importance to provide signals in periphery via autonomous nervous system.

Thus, ROS have a strong role as signaling molecules in the central nervous system, and more particularly in the hypothalamus. Since hypothalamus is a key area involved in the control of energy homeostasis, we are now going to focus on the role of hypothalamic ROS in the regulation of energy metabolism and food intake.

INVOLVEMENT OF HYPOTHALAMIC ROS IN THE CONTROL OF METABOLISM AND FOOD INTAKE

We have previously discussed that a physiological increase of ROS levels has a signaling role in the hypothalamus. This brain area receives signals from the periphery such as nutrients (glucose and lipids) and hormones, which in turn are able to modulate the activity of hypothalamic neurons. This effect on hypothalamic neurons, including POMC and NPY/AgRP neurons, further impact peripheral fuel metabolism via the ANS or

neuroendocrine mediators. Here, we will describe the effect of nutrient action (such as glucose and lipids) and hormones on hypothalamic ROS release, associated with peripheral metabolic regulation and food intake.

NUTRIENTS

Glucose and lipids are directly detected by hypothalamic neurons in order to implement the adaptive response for the metabolism. An intracarotid injection of glucose, which targets specifically the hypothalamus, generates a transient release of hypothalamic ROS (Leloup et al., 2006). This release of hypothalamic ROS induces, via the parasympathetic nervous system outflow, a peak of insulin 1–3 min later with no change in peripheral blood glucose. Scavenging ROS generation in the brain by the use of antioxidant molecules significantly disturbs insulin secretion induced by the cerebral glucose load, demonstrating the key role of hypothalamic ROS in the control of energy metabolism. In this experimental model, ROS production involved in glucose sensing has a mitochondrial origin. In fact, glucose co-injected with the mitochondrial uncoupler CCCP decreases significantly the peak of insulin (Leloup et al., 2006). If we focus on food intake, a VMH glucose infusion attenuates the increase of food intake after refeeding following an overnight fast, via a mechanism dependent on hypothalamic mROS production (Carneiro et al., 2012).

Concerning lipids, the literature also showed that these circulating nutrients can directly act as signaling molecules in the hypothalamus (Lam et al., 2005). A provoked acute hypertriglyceridemia in rats generates an acute ROS production in the VMH 30 min after an intraperitoneal injection of lipids (Benani et al., 2007). This hypothalamic ROS release is local, rapid and transient since it returns to basal levels within 4 h after injection. Therefore, this hypothalamic ROS modulation is able to inhibit food intake only 1 h after lipid injection. This anorectic effect is directly attributable to hypothalamic ROS release since icv infusion of antioxidant drugs, such as glutathion and trolox (an analog of vitamin E), abolishes the decrease of food intake. Similarly to glucose, lipids generate hypothalamic mitochondrial ROS production concomitant to an increase in mitochondrial respiration (Benani et al., 2007).

We described above that glucose and lipids generate hypothalamic ROS release through an action on mitochondria. Mitochondrial morphology is associated with mROS production and energy status (Yoon et al., 2011). Mitochondria are dynamic organelles that continuously change their structures under the control of different sets of proteins through fission and fusion mechanisms. A recent study has demonstrated that, in AgRP neurons, changes of mitochondrial morphology (size and number) are associated with the metabolic state of these neurons (Dietrich et al., 2013). Indeed, food deprivation during 24 h leads to an increase in mitochondria density and a decrease in mitochondria size in AgRP neurons, which are characteristic of changes in mitochondria dynamic toward fission, while neighboring anorexic POMC neurons display a decrease in mitochondria density. Conversely, high-fat-diet feeding (HFD) (i.e., positive energy balance) leads to mitochondrial fusion in AgRP neurons. These changes were cell-type specific because this phenomenon did not occur in POMC neurons. The fission

machinery involves dynamin-related protein 1 (DRP1), which is translocated to the mitochondrial membrane where it forms a contractile “ring” involved in the division of mitochondria. Under basal conditions, DRP1 is cytoplasmic. In response to an intracarotid glucose bolus injection, DRP1 level is increased in mitochondria from VMH extract 1 min post-injection, and correlates with hypothalamic mROS production (Carneiro et al., 2012). These results indicate that mitochondrial fission is necessary for the induction of hypothalamic mROS release in response to glucose. Inhibition of DRP1 recruitment in the VMH mitochondria using siRNA is deleterious by the loss of hypothalamic mROS signaling, insulin release and the satiating effect of glucose. On the other hand, fusion machinery involves mitofusins (Mfn 1 and Mfn2). AgRP-specific Mfn1 or Mfn2 knock-out mice gain less weight when fed with a HFD (Dietrich et al., 2013). Interestingly, these changes in fusion-like mitochondrial dynamics are neuron-type specific because POMC-specific Mfn2 knockout mice exhibit hyperphagia, an increase in body weight and a decrease in energy expenditure (Schneeberger et al., 2013). In this mouse model, it is noteworthy that the number of mitochondria-ER contacts was significantly reduced in POMC neurons. This result indicates a synergy of action between hypothalamic RE and mitochondria in metabolic control. The change in mitochondrial dynamics in hypothalamic neurons directly affects distal metabolic organs and suggests a key role of mROS.

Other key molecular actors of mitochondrial function are uncoupling proteins (UCP) which are mitochondrial inner membrane proteins promoting proton leak (Aquila et al., 1985). These proteins control mROS release and specifically UCP2 which was described as a negative regulator of mitochondrial hydrogen peroxide production (Negre-Salvayre et al., 1997). Besides allowing protons to transit from the matrix to the inter-membrane space of the mitochondria, it has been suggested that UCP2 allows the transport of metabolites such as aspartate, malate and oxaloacetate. As such, UCP2 could reduce substrates of Krebs cycle, decrease electrons transport chain activity and also attenuates ROS production (Voza et al., 2014). UCP2 is highly expressed in the hypothalamus (Richard et al., 1998), and more precisely in both POMC and NPY/AgRP neurons. This mitochondrial protein is strongly linked to nutritional status because the hypothalamic mRNA and protein expression of UCP2 is increased during the fasted state (Coppola et al., 2007). A hypothesis developed by Andrews et al., suggests that during negative energy balance (such as fasting or before a meal), NPY/AgRP neurons are activated via a decrease in basal mROS production, probably because of the activation of UCP2 (Andrews et al., 2008). Conversely, mROS levels in POMC neurons are also reduced, but these neurons are silent. In contrast, during positive energy balance, mROS are able to accumulate in POMC neurons to inhibit food intake. As expected, genetic inactivation of UCP2 attenuates the refeeding signal, due to an uncontrolled increase of ROS in NPY/AgRP neurons that lead to decrease their activities. These results underscore the importance of the level of ROS released, depending on the type of neurons.

As previously described, changes in glucose levels are sensed in the brain by GE and GI neurons. Arcuate nucleus POMC neurons are considered as GE while AgRP/NPY neurons are GI.

Parton et al., have demonstrated the essential role of glucose sensing by POMC neurons in the overall physiological control of blood glucose (Parton et al., 2007). Specific genetic deletion of Kir6.2 subunit in K_{ATP} channels, required for glucose detection in POMC neurons, impairs the whole-body response to a systemic glucose load. In the same study, the authors demonstrated that UCP2 negatively regulates glucose sensing in POMC neurons. By using genipin (an UCP2 inhibitor) or UCP2 knock-out mice, they have induced an increase in POMC neurons firing rate. Glucose sensing by POMC neurons became defective in obese mice fed a HFD, suggesting that loss of glucose sensing has a causal role in the development of type 2 diabetes.

Thus, it appears that NPY/AgRP neurons activation is mediated by a decrease in ROS levels while POMC neurons activation is driven by ROS (Andrews et al., 2008). Indeed, icv administration of ROS scavengers induces significantly lower *c-Fos* expression in POMC neurons and increases food intake during light cycle, observed via an increase of *c-Fos* expression in AgRP/NPY neurons (Diano et al., 2011). Similarly, addition of H_2O_2 depolarizes POMC neurons, increases the firing rate, and an icv injection of H_2O_2 causes significantly less feeding of mice after an overnight fast.

From a molecular perspective, POMC neurons seem to use glucose as their main fuel since their firing rate vary as a function of in glucose concentrations (Ibrahim et al., 2003). On the other hand, NPY/AgRP neurons are inhibited by high levels of glucose and may use free fatty acids as their main fuel (Mountjoy et al., 2007; Andrews et al., 2008). This differential fuel utilization underlies the presence of two distinct and competitive mechanisms in these neuronal populations: glycolysis and β -oxidation. When glycolysis is elevated, end-product derived from this reaction inhibit β -oxidation, and conversely, when β -oxidation is increased, glycolysis is inhibited. Both systems are opposite and produce ROS. An increase in the activity of NPY/AgRP neurons is followed by Ca^{2+} influx, which was demonstrated to elevate ROS production in neurons (Hernandez-Fonseca et al., 2008). However, NPY/AgRP neurons do not produce considerable amount of ROS, indicating that these neurons have cellular properties associated with low capacity for ROS production and/or high capacity to buffer ROS. These opposite effects of ROS release in POMC and NPY/AgRP neurons, that contribute to nutrient sensing and appetite regulation, have been demonstrated by the work of Kuo et al., By using an appetite-suppressing sympathomimetic agent, phenylpropranolamine (PPA), authors have shown the involvement of Protein Kinase C (PKC) in the generation of hypothalamic ROS which stimulates POMC neurons activity and inhibits NPY neurons (Kuo et al., 2011). Central inhibition of ROS production by icv infusion of glutathione attenuates PPA anorectic effect together with the icv injection of PKC oligonucleotide antisense. In a similar study, the same authors demonstrated that hypothalamic NF- κ B signaling is also involved in decrease of food intake by PPA treatment. This anorectic effect is mediated by the decrease of NPY expression and the rise of the expression of endogenous antioxidants such as SOD or glutathione peroxidase, demonstrating the impact of ROS (Kuo et al., 2012). Another essential actor which participate to the regulation of ROS production is Ca^{2+} . Voltage-gated Ca^{2+} channels

are expressed throughout the entire hypothalamus contributing to the increase of cytoplasmic Ca^{2+} levels in sensitive neurons (Marques-Da-Silva and Gutierrez-Merino, 2012). The maintenance of intracellular Ca^{2+} homeostasis depends on (1) the precise control of Ca^{2+} -ATPases activity in the plasma membrane, (2) the Ca^{2+} uptake into intracellular compartments, (3) the influx through voltage-operated channels and 4) the effectiveness of Ca^{2+} buffering via Calcium Binding Proteins (CBPs) (Strehler et al., 2007; Nicholls, 2009). Excessive intracellular Ca^{2+} accumulation causes mitochondrial ROS production (Weber et al., 2010) and hypothalamic CBPs such as Secretagogin (Scgn) modulate this ROS release by buffering Ca^{2+} (Gyengesi et al., 2012). Thus, Scgn which is widely expressed in the NPY/AgRP neurons (Gyengesi et al., 2013) from the ARC but not in POMC neurons, could explain the lower production of ROS by these neurons. There seems to be a direct requirement to buffer Ca^{2+} in NPY but not in POMC neurons, to maintain cellular firing rate. Thus, buffering Ca^{2+} controls ROS production and allows the modulation of neurons as a function of the nutritional state (Figure 1).

All these actors involved in transient ROS production in response to nutrients, clearly demonstrate a key role of ROS signaling as a real gauge of energy status, which induces a fine tuning control of energy metabolism and food intake.

HORMONES

Like nutrients, hormones which are key signals of the metabolic state of organs, must be detected by the hypothalamus to control energy homeostasis. We will now discuss the role of the orexigenic hormone ghrelin and of two anorectic hormones leptin and insulin. These hormones reach the hypothalamus, have their receptors on hypothalamic POMC and NPY/AgRP neurons and are clearly involved in the control of food intake and energy metabolism via signaling pathways involving ROS release.

Ghrelin

Ghrelin is a gut-derived hormone secreted into the bloodstream which activates NPY/AgRP neurons and increases food intake (Andrews, 2011). Levels of this hormone rise during the fasting state, making a signal of starvation for neurons. Ghrelin receptor (GHSR), a seven trans-membrane G-coupled protein linked to Gq, is predominantly expressed in NPY/AgRP neurons (Willeesen et al., 1999). In response to intraperitoneal injection of ghrelin, the number of mitochondria in NPY neuronal perikarya is increased in a UCP2-dependent manner while POMC perikarya remains unaffected (Andrews et al., 2008). In the same way, ghrelin induces symmetric, putatively inhibitory synapses on POMC neurons correlated with recruitment of miniature inhibitory post-synaptic currents (mIPSCs) on these cells. Conversely, ghrelin significantly reduces the number of asymmetric, putatively excitatory synapses on POMC neurons. This synaptic plasticity demonstrates how ghrelin hyperpolarizes POMC neurons by activating inhibitory NPY/AgRP (especially GABAergic) inputs. In parallel, ghrelin increases UCP2 expression, which scavenges free radicals in NPY neurons without affecting ROS production in POMC neurons. All these effects previously described are linked to the decrease in ROS levels in NPY/AgRP via UCP2 since the

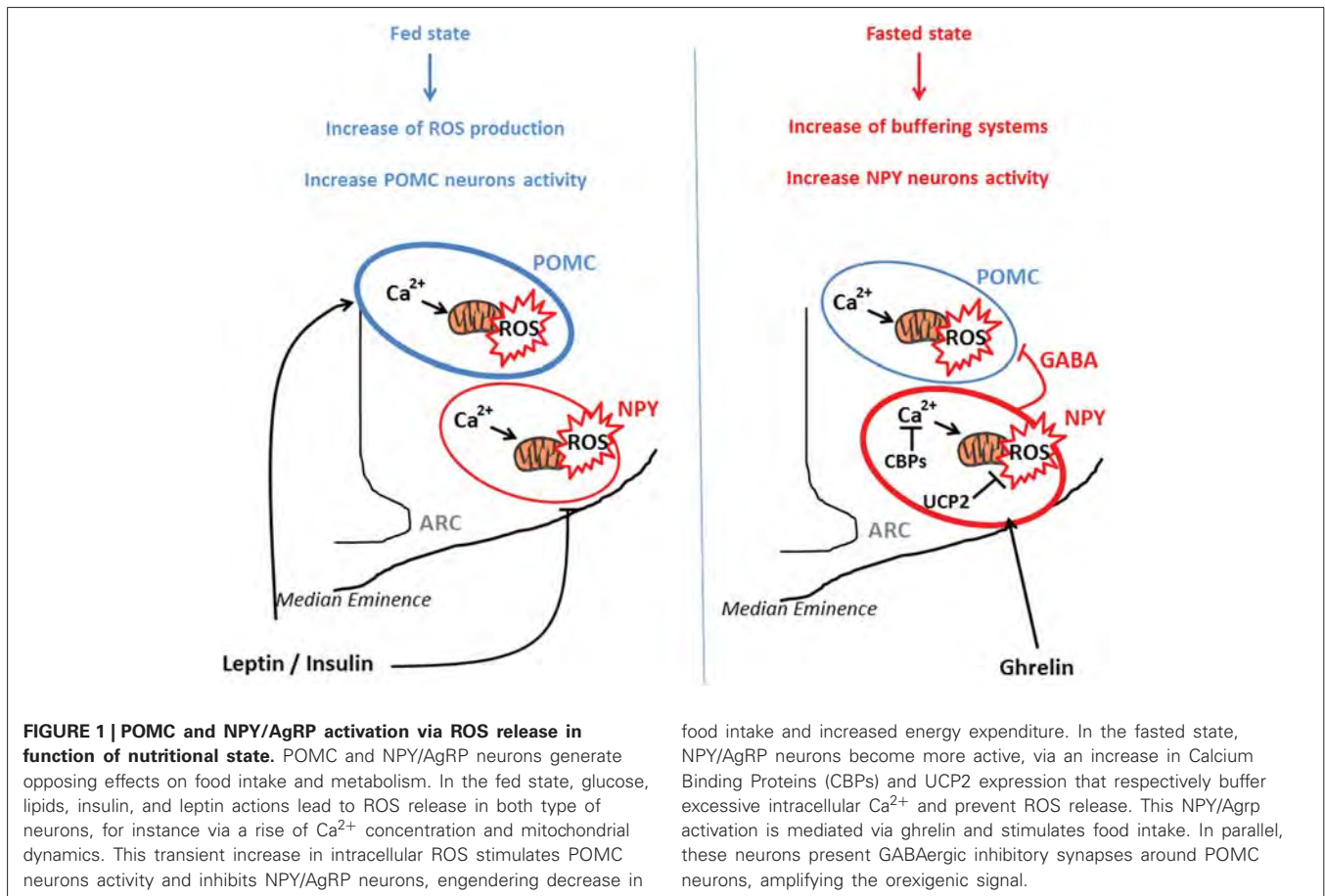
effect of ghrelin is totally lost in UCP2 knock-out mice. The scavenging of ROS by icv infusion of a cocktail of antioxidants in UCP2 knock-out mice restores the action of ghrelin demonstrating the key role of hypothalamic ROS in ghrelin effects (Andrews et al., 2008).

From a molecular perspective, ghrelin activates AMPK in NPY neurons, which importantly raises mitochondrial respiration and ROS production (Andrews et al., 2008). Via the activation of GHSR on NPY neurons, ghrelin generates an increase in intracellular Ca^{2+} levels. Indeed, ghrelin induces a presynaptic signaling pathway that induces direct Ca^{2+} release from internal stores in NPY/AgRP neurons (Yang et al., 2011) and also activates Calmodulin-dependent protein Kinase Kinase (CaMKK) (Cummings et al., 2005). Activated CaMKK induces AMPK activation which generates ATP and fatty acid oxidation that might contribute to the neuron-specific activation of fatty acid oxidation and the resulting buffering of ROS (Horvath et al., 2009). CaMKK is particularly involved in the hypothalamic control of appetite because its deletion in NPY/AgRP neurons reduces food intake and body weight, while deleting CaMKK in POMC neurons does not affect energy homeostasis (Anderson et al., 2008; Gyengesi et al., 2012). Systemic injection of ghrelin fails to induce food intake in CaMKK knock-out mice, demonstrating that CaMKK is also involved in the effect of ghrelin (Anderson et al., 2008). This synergy of effects between ROS and Ca^{2+} is necessary to generate signaling pathways in NPY/AgRP neurons which is involved in the action of ghrelin on food intake. Precise mechanisms need to be determined.

Finally, it is also known that motivation is an essential part of food intake, involving reward system and memory, which are regulated by dopamine neurons. Ghrelin has been shown to play a role for incentive value of food cue by controlling the activity of dopamine neurons (Abizaid et al., 2006; Andrews et al., 2006). Similar to its effect on NPY/AgRP neurons, ghrelin activates dopamine neurons in an UCP2-dependent manner and via a decrease of ROS production. Indeed, UCP2 knock-out mice exhibit a reduced dopamine turnover (Andrews et al., 2006). Besides its direct effect on the dopamine reward system, ghrelin regulates dopamine neurons directly via activation of AgRP neurons and inhibition of PVN, which induces food seeking behavior (Krashes et al., 2011; Atasoy et al., 2012).

Leptin

Leptin is an adipose tissue derived hormone (i.e., adipokine) which plays a central role in the regulation of energy homeostasis. Leptin acts on both NPY/AgRP and POMC neurons through its receptor LepRb (Morton and Schwartz, 2011). Leptin reaches hypothalamus and increases the activity of POMC neurons. This effect on POMC neurons induces a decrease in food intake and a rise in energy expenditure via the action of sympathetic nervous system on Brown Adipose Tissue (BAT) and muscles. Unlike ghrelin which modulates ROS levels in NPY/AgRP neurons, leptin seems to induce ROS levels in POMC neurons (Diano et al., 2011). Indeed, by using dihydroethidium (DHE; a substrate for fluorimetric detection of peroxidase as a readout of ROS), Diano et al., have demonstrated the lowest level of ROS in POMC neurons of leptin knock-out mice (ob/ob). In contrast, a 48 h leptin



food intake and increased energy expenditure. In the fasted state, NPY/AgRP neurons become more active, via an increase in Calcium Binding Proteins (CBPs) and UCP2 expression that respectively buffer excessive intracellular Ca^{2+} and prevent ROS release. This NPY/AgRP activation is mediated via ghrelin and stimulates food intake. In parallel, these neurons present GABAergic inhibitory synapses around POMC neurons, amplifying the orexigenic signal.

treatment in *ob/ob* mice results in elevated DHE expression in POMC neurons. This increase in DHE expression is also found in POMC neurons of fed wild-type mice compared with fasted mice, demonstrating a key role of ROS signaling in POMC neurons on the nutritional state. Moreover, the level of ROS in POMC neurons is correlated with those of leptin in wild-type and *ob/ob* mice, but this correlation is lost in HFD-fed mice. In parallel, the authors noted the presence of peroxisomes in POMC neurons (Diano et al., 2011). Indeed, in POMC neurons from *ob/ob* mice, the number of mitochondria and peroxisomes is very low while it is increased in lean mice. More particularly, mitochondria are outnumbered in lean fed mice compared with lean fasted mice, without differences in peroxisomes number. On the other hand, peroxisomes were almost three-fold higher in POMC neurons of HFD fed mice, suggesting a role of this organelle in leptin resistance and specifically in the disruption of ROS release in POMC neurons. Hydrogen peroxide icv injection in HFD-fed mice resulted in increased c-Fos expression in POMC neurons and decreased feeding in response to peripheral leptin injection. This spectacular experiment has proved that ROS alone could reverse POMC function and mediate leptin actions.

Leptin was also shown to be a key molecular actor involved in synaptic plasticity around POMC neurons (Pinto et al., 2004). In *ob/ob* mice, a significantly greater number of excitatory synapses (EPSCs) on NPY neurons was observed, while the number of

inhibitory synapses (IPSCs) is higher on POMC neurons. After 2 days of intraperitoneal injection of leptin, NPY neurons display an 85% reduction of the number of EPSCs and an almost 70% increase in the number of IPSCs. At the same time, there is also a doubling of the synapses number on POMC neurons, with an almost 300% increase in the number of EPSCs. This regulation resembles those of ghrelin on synaptic plasticity (Andrews et al., 2008), suggesting again an involvement of ROS. Similarly, the effect of leptin are potentiated by intracellular Ca^{2+} like ghrelin (Qiu et al., 2010).

Insulin

In addition to its peripheral effect on glucose storage, insulin acts on the hypothalamus to modulate energy metabolism and food intake (Abraham et al., 2014). In particular, insulin inhibits food intake in the hypothalamus through ROS production. A first study has demonstrated the key role of the mitochondrial respiratory chain in the phosphorylation of insulin receptor on neuronal cells (Storozhevkykh et al., 2007). This study suggests that insulin might trigger ROS production within the hypothalamus, which, in turn, inhibit food intake. Indeed, insulin injection in the third ventricle generates a transient ROS release 15 min post-injection and induces food intake (Jaillard et al., 2009). This insulin-induced ROS increase is transient because no ROS are observed at either 5 or 30 min post-injection. Moreover, this insulin-induced

ROS increase is dependent on the nutritional state, because a decrease of food intake is not observed in fasted mice. The antioxidant trolox delivery by icv injection 30 min prior to insulin completely prevents insulin-stimulated ROS increase and suppresses insulin-induced food intake inhibition. Interestingly, the mROS seems to be not involved in this insulin effect. Indeed, icv injection of an inhibitor of NADPH oxidase (DPI) 30 min before insulin treatment inhibits the effect of insulin on ROS production and food intake.

CONSEQUENCES OF THE ALTERATION OF HYPOTHALAMIC ROS RELEASE IN PATHOLOGICAL STATE

The short-term hypothalamic ROS peak generated by metabolic signals (nutrients and hormones) appears to be fundamental to elicit a proper behavioral, endocrine and autonomic response to nutrient intake. A pathology characterized by a disruption in nutrient sensing and by an inability to maintain energy homeostasis is type 2 diabetes (T2D) (Schwartz and Porte, 2005). T2D is especially characterized by impaired metabolic and hormonal hypothalamic sensing, and by a chronic whole-body low-grade inflammatory background (Purkayastha and Cai, 2013). An important part of this low-grade inflammation is due to oxidative stress. As previously described, transient ROS release is now considered as a molecular signal. When ROS production is chronically elevated, the over-abundance of radical species triggers activation of inflammatory kinases, leading to alterations of tissue functions. This phenomenon is exacerbated by a decrease in the expression of antioxidant enzymes (Gonzalez-Chavez et al., 2011). In particular in the brain, this pathological ROS release induces over-activation of the sympathetic nervous system (Hirooka et al., 2011). This rise of sympathetic excitation is responsible for disorders associated with obesity and T2D such as hypertension, cardiovascular and renal dysfunctions (Campese et al., 2004), and antioxidant icv injection improves this deleterious phenotype. Oxidative stress and inflammation are also developed in the hypothalamus during T2D (Purkayastha and Cai, 2013).

In this review, transgenic models of obesity or nutritional models (HFD) mice will be considered as type 2 diabetic mice.

OXIDATIVE STRESS IN THE HYPOTHALAMUS DURING T2D

The different characteristics of T2D suggest an alteration of redox signaling and ROS release in the hypothalamus. Zucker rats are obese and insulin resistant with dramatic autonomic disturbances including modification of sympathovagal balance (York et al., 1985). In this model, a hypothalamic hypersensitivity to glucose has been demonstrated (Colombani et al., 2009). In lean rats, intracarotid injection of low-dose of glucose (3 mg/kg) does not generate ROS release nor a peak of insulin secretion, while a most important dose of glucose (9 mg/kg) induces insulin release 1–3 min later associated with hypothalamic mROS production. This same low-dose of glucose (3 mg/kg) is sufficient to produce a rapid and transient increase in plasma insulin in Zucker rats. Similarly, low-dose of glucose increases hypothalamic ROS in Zucker rats. These diabetic rats present an altered redox state, together with an increase of hypothalamic mitochondrial activity in response to substrates, and a decrease in antioxidant enzymes

activity. In rats, icv infusion of glutathione for 3 days restores a normal hypothalamic glucose sensing.

In association with these data, our group has observed that ROS, and more particularly H₂O₂ release, is exacerbated in hypothalamus of HFD-fed mice compared with normal mice (Duparc et al., 2011a; Drougard et al., 2014). In this study, we demonstrated that icv injection of high levels of apelin, similar to that observed in the hypothalamus of obese/diabetic mice (Reaux-Le Goazigo et al., 2011), in normal mice, induces a diabetic phenotype with fasting hyperglycemia, fasting hyperinsulinemia and glucose intolerance. In fact, these disturbance of glucose homeostasis via hypothalamic apelin are due to an over-activation of sympathetic nervous system that triggers hepatic glucose production. Central apelin effects are directly linked to hypothalamic over-production of H₂O₂, since an icv injection of trolox 30 min before apelin icv injection inhibits the establishment of T2D characteristics. Production of hypothalamic H₂O₂ seems to have a mitochondrial origin, since icv injection of DPI 30 min before apelin treatment does not inhibit fasting hyperglycemia. This high level of hypothalamic H₂O₂ release reflects an oxidative stress. Indeed, this release is exacerbated in hypothalamus of HFD-fed mice in response to apelin, and is inhibited by trolox pretreatment. Moreover, over-expression of apelin by lentivectors in the VMH promotes an increase of pro-inflammatory cytokines expression (Drougard et al., 2014), which are known to alter the control of metabolism (De Souza et al., 2005).

ALTERATIONS OF ROS SIGNALING IN POMC AND NPY/AgRP NEURONS DURING T2D

POMC neurons

Neuronal alterations observed in genetic diabetic mice in response to glucose are also found in HFD-fed mice (Parton et al., 2007). Approximately 46% of POMC neurons from lean mice significantly increase their firing rate after a rise in glucose concentration from 3 to 5 mM compared with HFD-fed mice, in which only 10% of POMC neurons respond. Moreover, glucose fails to enhance the release of α -MSH in POMC neurons of HFD-fed mice. We have previously described that POMC neurons need to release ROS to be effective in response to glucose, and UCP2 inhibits ROS production. As expected, UCP2 expression is increased in hypothalamus of HFD-fed mice and genipin treatment restores α -MSH release in response to glucose in POMC neurons of HFD-fed mice. These results are confirmed by the protection from obesity, T2D and alteration of glucose sensing in POMC neurons from UCP2 knock-out mice.

An increase in ROS production in POMC neurons compared to NPY neurons under “basal” conditions has been observed, suggesting that POMC neurons might be prone to free radical-induced degeneration (Andrews et al., 2008). The decline in functional POMC neurons may promote increased orexigenic NPY tone, hyperphagia and weight gain. Indeed, ROS levels are significantly higher in POMC neurons of HFD-fed mice compared to chow-fed mice (Diano et al., 2011). The lack of difference in ROS levels in POMC neurons between chow-fed mice and HFD-fed mice is associated with the loss of correlation between leptin and ROS levels in HFD-fed mice. Indeed, the absence of a

positive correlation between elevated leptin levels and ROS release in HFD-fed mice, could be explained by the important rise of peroxisomes in POMC neurons of these mice. This proliferation of peroxisome is governed by the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) (Green, 1995) which is associated with brain inflammation, gliosis (Bernardo and Minghetti, 2006) and ROS production (Yu et al., 2008). PPAR- γ expression is increased in hypothalamic POMC and NPY/AgRP neurons of HFD-fed mice (Diano et al., 2011). These peroxisomes in POMC neurons interfere clearly with ROS signaling, since icv treatment with a PPAR- γ agonist in normal mice elevates peroxisome number, decreases ROS production and increases food intake. Conversely, icv treatment with a PPAR- γ antagonist in HFD-fed mice decreases peroxisome number, increases ROS in POMC neurons and reduces daily food intake. Consistent with these results, icv treatment with a PPAR- γ antagonist in HFD-fed mice increases c-Fos staining and firing rate in POMC neurons, and decreases NPY/AgRP neurons excitation compared with HFD control mice. As expected, PPAR- γ knock-out mice fed with a HFD are protected from obesity and T2D (Long et al., 2014). These mice present a decrease in peroxisomes density in POMC neurons, which allows ROS signaling and firing rate in these neurons. On a metabolic standpoint, these mice are protected from hyperphagia, body weight gain, decrease of energy expenditure and leptin resistance. As previously described, this ROS signaling is overriding in POMC neurons, and icv injection of H₂O₂ in HFD-fed mice induces c-Fos expression in POMC neurons, decreases feeding and improves leptin sensitivity in response to peripheral leptin injection (Diano et al., 2011). It has been shown that only 3% of POMC neurons from HFD-fed mice are sensitive to leptin, and that H₂O₂ treatment leads to an 18% increase of POMC neurons, demonstrating the key role of ROS signaling from POMC neurons for leptin sensitivity.

NPY/AgRP neurons

NPY/AgRP neurons also seem affected, because if ROS generation is uncontrolled in these cells, neuronal firing is impaired. To this aim, emerging concept indicates that T2D is also characterized by ghrelin resistance, since ghrelin fails to induce AgRP or NPY secretion in hypothalamic explants from HFD-fed mice (Andrews et al., 2008; Briggs et al., 2010). This global hypothalamic oxidative stress disrupts all the redox balance in POMC, but also in NPY/AgRP neurons, which alters nutrient sensing and energy balance. Indeed, insulin, an anorectic hormone, fails to induce a decrease of food intake in HFD-fed mice, demonstrating a lack of responsiveness of hypothalamus to peripheral signals (Storozhevskiy et al., 2007).

Mitochondrial dynamics

From the viewpoint of the mitochondrial dynamics, VMH mitochondrial fission via DRP1 is essential to respond to glucose load (Carneiro et al., 2012). Moreover, mitochondrial density in POMC neurons from HFD-fed mice was increased (Diano et al., 2011). These mitochondria present a significant reduction in the number of contacts with ER, indicating that both mitochondrial network complexity and their association to ER in POMC neurons are altered in HFD-fed mice (Schneeberger

et al., 2013). The protein involved in mitochondrial fusion protein Mfn2 seems to be the most crucial protein implicated in the HFD-fed mice phenotype, since its hypothalamic expression is decreased in HFD-fed mice when compared to other mitochondrial fusion/fission proteins such as DRP1 and Mfn1. Indeed, Mfn2 over-expression in ARC neurons decreases food intake and body weight, while Mfn2 knock-out mice demonstrate an increase in food intake and body weight, a decrease of energy expenditure and a resistance to leptin. These mice also present an alteration of the mitochondrial respiratory capacity and an increase in ROS production. This over-production of ROS appears to be a consequence of hypothalamic ER stress. In fact, injection of ROS scavenger does not improve the phenotype of these mice, whereas inhibition of ER stress restores a normal phenotype.

TREATMENTS AGAINST TYPE 2 DIABETES IN CONNECTION WITH THE HYPOTHALAMIC ROS

T2D is a worldwide expanding disease that is difficult to treat because of multiple organ dysfunction. So far, therapies have targeted insulin-sensitive organs such as muscles, liver and adipose tissue to improve hyperglycemia, hyperinsulinemia and resistance to insulin (Altaf et al., 2014). However, considerable progress that have been made in the field of neurophysiology have demonstrated a key role of the brain, and more particularly the hypothalamus, in the control of energy homeostasis. It is now established that ROS release in hypothalamic neurons is necessary to generate the “periphery-hypothalamus-periphery” regulation loop in response to the nutritional state. This hypothalamic ROS balance finely regulated could be altered and generate oxidative stress, which is a disruption of the balance between oxidant and antioxidant molecules in favor of oxidant molecules, masking beneficial effects of ROS (Sies and Cadenas, 1985). The best treatment against T2D is calorie restriction (Bantle, 1988) to avoid abundance of substrates for mitochondria, and reduce the ROS over-production. This change in lifestyle is efficient in humans in the prediabetic state, however patient’s adherence is poor. Regarding direct targeting of oxidative stress, treatments with antioxidants could have the potential to prevent or delay the development of diabetic complications. Despite the preponderance of evidence from animal studies supporting this hypothesis, large scale prospective studies using antioxidant treatments in humans have been disappointingly inconclusive, probably because of issues with dosage and bioavailability of these molecules (Johansen et al., 2005; Pazdro and Burgess, 2010).

OXIDATIVE STRESS, A LINK BETWEEN T2D AND OTHERS DISEASES

Over-production of ROS (arising either from mitochondrial electron-transport chain or excessive stimulation of NADPH oxidase) results in oxidative stress, a deleterious process that can be an important mediator of cell damage. Indeed, hypothalamic oxidative stress during T2D is a risk factor for many chronic diseases such as neurodegenerative disorders (Valko et al., 2007). It has been clearly demonstrated that T2D increases the risk of the development of Alzheimer and Parkinson diseases via brain oxidative stress (Butterfield et al., 2014; Santiago and Potashkin, 2014). It is particularly interesting to underlie that

both neuronal pathologies are characterized by mitochondrial dysfunctions inducing alteration of brain ROS release.

Given the failure of care therapies against T2D coupled to the massive expansion of the disease and the associated-pathologies; it is critical to elaborate integrated therapeutics. Indeed, we have shown in this review the key role of ROS production in hypothalamus with a different pattern of release between POMC and NPY/AgRP neurons. ROS signaling is largely altered in T2D, and the hypothalamus has an “open-access” to bloodstream signals via the median eminence. Via this anatomical characteristic, it is now primordial to evaluate the consequences of new therapies on this hypothalamic balance sensing. Therefore, it will be interesting to elaborate non-invasive treatments to normalize this hypothalamic ROS production via targeting all molecular actors involved in this ROS release control. To this aim, a study of our group has demonstrated the alteration of hypothalamic NO release via the dysfunction of gut-brain axis in response to glucose in db/db mice (Duparc et al., 2011b). Modulation of this gut-brain axis could be an attractive therapeutic strategy to normalize hypothalamic ROS production.

CONCLUSION

Energy metabolism and food intake are complex processes that involve homeostatic mechanisms driven by hypothalamic network signaling pathways. This review brings light to the fact that hypothalamic ROS levels, controlled by various molecules and fuel signals, play an important role in this hypothalamic control of energy balance. The control of hypothalamic ROS release involves many molecular actors such as mitochondrial dynamics, NADPH oxidase activity, synaptic plasticity, peroxisomes, endoplasmic reticulum,... At high levels that saturate buffering mechanisms, ROS may initiate cellular degeneration in either NPY/AgRP or POMC neurons, and impair energy homeostasis, resulting in pathologies such as obesity and type 2 diabetes. In addition to the brain, future therapeutic strategies have to take into account the large part played by ROS signaling in other structures (including pancreas, adipose tissue, intestine, liver and heart).

REFERENCES

- Abizaid, A., Liu, Z. W., Andrews, Z. B., Shanabrough, M., Borok, E., Elsworth, J. D., et al. (2006). Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J. Clin. Invest.* 116, 3229–3239. doi: 10.1172/JCI29867
- Abraham, M. A., Filippi, B. M., Kang, G. M., Kim, M. S., and Lam, T. K. (2014). Insulin action in the hypothalamus and dorsal vagal complex. *Exp. Physiol.* 99, 1104–1109. doi: 10.1113/expphysiol.2014.079962
- Ainscow, E. K., Mirshamsi, S., Tang, T., Ashford, M. L., and Rutter, G. A. (2002). Dynamic imaging of free cytosolic ATP concentration during fuel sensing by rat hypothalamic neurones: evidence for ATP-independent control of ATP-sensitive K⁽⁺⁾ channels. *J. Physiol.* 544, 429–445. doi: 10.1113/jphysiol.2002.022434
- Altaj, Q. A., Barnett, A. H., and Tahrani, A. A. (2014). Novel therapeutics for type 2 diabetes: insulin resistance. *Diabetes Obes. Metab.* doi: 10.1111/dom.12400. [Epub ahead of print].
- Anderson, K. A., Ribar, T. J., Lin, F., Noeldner, P. K., Green, M. F., Muehlbauer, M. J., et al. (2008). Hypothalamic CaMKK2 contributes to the regulation of energy balance. *Cell Metab.* 7, 377–388. doi: 10.1016/j.cmet.2008.02.011
- Andrews, Z. B. (2011). Central mechanisms involved in the orexigenic actions of ghrelin. *Peptides* 32, 2248–2255. doi: 10.1016/j.peptides.2011.05.014
- Andrews, Z. B., Liu, Z. W., Wallingford, N., Erion, D. M., Borok, E., Friedman, J. M., et al. (2008). UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* 454, 846–851. doi: 10.1038/nature07181
- Andrews, Z. B., Rivera, A., Elsworth, J. D., Roth, R. H., Agnati, L., Gago, B., et al. (2006). Uncoupling protein-2 promotes nigrostriatal dopamine neuronal function. *Eur. J. Neurosci.* 24, 32–36. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04906.x
- Aquila, H., Link, T. A., and Klingenberg, M. (1985). The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane. *EMBO J.* 4, 2369–2376.
- Atasoy, D., Betley, J. N., Su, H. H., and Sternson, S. M. (2012). Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature* 488, 172–177. doi: 10.1038/nature11270
- Bantle, J. P. (1988). The dietary treatment of diabetes mellitus. *Med. Clin. North Am.* 72, 1285–1299.
- Bao, L., Avshalumov, M. V., Patel, J. C., Lee, C. R., Miller, E. W., Chang, C. J., et al. (2009). Mitochondria are the source of hydrogen peroxide for dynamic brain-cell signaling. *J. Neurosci.* 29, 9002–9010. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1706-09.2009
- Bashan, N., Kovsan, J., Kachko, I., Ovadia, H., and Rudich, A. (2009). Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol. Rev.* 89, 27–71. doi: 10.1152/physrev.00014.2008
- Bellinger, L. L., and Bernardis, L. L. (2002). The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies. *Physiol. Behav.* 76, 431–442. doi: 10.1016/S0031-9384(02)00756-4
- Benani, A., Troy, S., Carmona, M. C., Fioramonti, X., Lorsignol, A., Leloup, C., et al. (2007). Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: redox regulation of food intake. *Diabetes* 56, 152–160. doi: 10.2337/db06-0440
- Bernard, C. (1849). “Cooperation between brain and islet in glucose homeostasis and diabetes,” in *Leçons de Physiologie Expérimentale Appliquées à la Médecine* (Paris: J.-B. Baillière).
- Bernardis, L. L., and Bellinger, L. L. (1993). The lateral hypothalamic area revisited: neuroanatomy, body weight regulation, neuroendocrinology and metabolism. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17, 141–193. doi: 10.1016/S0149-7634(05)80149-6
- Bernardo, A., and Minghetti, L. (2006). PPAR-gamma agonists as regulators of microglial activation and brain inflammation. *Curr. Pharm. Des.* 12, 93–109. doi: 10.2174/138161206780574579
- Briggs, D. I., Enriori, P. J., Lemus, M. B., Cowley, M. A., and Andrews, Z. B. (2010). Diet-induced obesity causes ghrelin resistance in arcuate NPY/AgRP neurons. *Endocrinology* 151, 4745–4755. doi: 10.1210/en.2010-0556
- Brobeck, J. R. (1946). Mechanism of the development of obesity in animals with hypothalamic lesions. *Physiol. Rev.* 26, 541–559.
- Butterfield, D. A., Di Domenico, F., and Barone, E. (2014). Elevated risk of type 2 diabetes for development of Alzheimer disease: a key role for oxidative stress in brain. *Biochim. Biophys. Acta* 1842, 1693–1706. doi: 10.1016/j.bbdis.2014.06.010
- Campese, V. M., Shaohua, Y., and Huiquin, Z. (2005). Oxidative stress mediates angiotensin II-dependent stimulation of sympathetic nerve activity. *Hypertension* 46, 533–539. doi: 10.1161/01.HYP.0000179088.57586.26
- Campese, V. M., Ye, S., Zhong, H., Yanamadala, V., Ye, Z., and Chiu, J. (2004). Reactive oxygen species stimulate central and peripheral sympathetic nervous system activity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287, H695–H703. doi: 10.1152/ajpheart.00619.2003
- Carneiro, L., Allard, C., Guissard, C., Fioramonti, X., Turrel-Cuzin, C., Bailbe, D., et al. (2012). Importance of mitochondrial dynamin-related protein 1 in hypothalamic glucose sensitivity in rats. *Antioxid. Redox Signal.* 17, 433–444. doi: 10.1089/ars.2011.4254
- Clark, J. T., Kalra, P. S., Crowley, W. R., and Kalra, S. P. (1984). Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology* 115, 427–429. doi: 10.1210/endo-115-1-427
- Clark, S. F. (2002). The biochemistry of antioxidants revisited. *Nutr. Clin. Pract.* 17, 5–17. doi: 10.1177/011542650201700105
- Colombani, A. L., Carneiro, L., Benani, A., Galinier, A., Jaillard, T., Duparc, T., et al. (2009). Enhanced hypothalamic glucose sensing in obesity: alteration of redox signaling. *Diabetes* 58, 2189–2197. doi: 10.2337/db09-0110
- Cone, R. D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat. Neurosci.* 8, 571–578. doi: 10.1038/nn1455
- 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. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 25(Suppl. 5), S63–S67. doi: 10.1038/sj.ijo.0801913
- Coppola, A., Liu, Z. W., Andrews, Z. B., Paradis, E., Roy, M. C., Friedman, J. M., et al. (2007). A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an

- interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell Metab.* 5, 21–33. doi: 10.1016/j.cmet.2006.12.002
- Cross, A. R., and Jones, O. T. (1991). Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim. Biophys. Acta* 1057, 281–298. doi: 10.1016/S0005-2728(05)80140-9
- Cummings, D. E., Overduin, J., Shannon, M. H., and Foster-Schubert, K. E. (2005). Hormonal mechanisms of weight loss and diabetes resolution after bariatric surgery. *Surg. Obes. Relat. Dis.* 1, 358–368. doi: 10.1016/j.soard.2005.03.208
- De Souza, C. T., Araujo, E. P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R. L., Boschero, A. C., et al. (2005). Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 146, 4192–4199. doi: 10.1210/en.2004-1520
- Diano, S., Liu, Z. W., Jeong, J. K., Dietrich, M. O., Ruan, H. B., Kim, E., et al. (2011). Peroxisome proliferation-associated control of reactive oxygen species sets melanocortin tone and feeding in diet-induced obesity. *Nat. Med.* 17, 1121–1127. doi: 10.1038/nm.2421
- Dicken, M. S., Tooker, R. E., and Hentges, S. T. (2012). Regulation of GABA and glutamate release from proopiomelanocortin neuron terminals in intact hypothalamic networks. *J. Neurosci.* 32, 4042–4048. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6032-11.2012
- Dietrich, M. O., Liu, Z. W., and Horvath, T. L. (2013). Mitochondrial dynamics controlled by mitofusins regulate AgRP neuronal activity and diet-induced obesity. *Cell* 155, 188–199. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.004
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001
- Drougard, A., Duparc, T., Brenachot, X., Carneiro, L., Gouaze, A., Fournel, A., et al. (2014). Hypothalamic apelin/reactive oxygen species signaling controls hepatic glucose metabolism in the onset of diabetes. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 557–573. doi: 10.1089/ars.2013.5182
- Duparc, T., Colom, A., Cani, P. D., Massaly, N., Rastrelli, S., Drougard, A., et al. (2011a). Central apelin controls glucose homeostasis via a nitric oxide-dependent pathway in mice. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 1477–1496. doi: 10.1089/ars.2010.3454
- Duparc, T., Naslain, D., Colom, A., Muccioli, G. G., Massaly, N., Delzenne, N. M., et al. (2011b). Jejunum inflammation in obese and diabetic mice impairs enteric glucose detection and modifies nitric oxide release in the hypothalamus. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 415–423. doi: 10.1089/ars.2010.3330
- Fekete, C., Sarkar, S., Rand, W. M., Harney, J. W., Emerson, C. H., Bianco, A. C., et al. (2002). Agouti-related protein (AGRP) has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis; comparisons between the effect of AGRP and neuropeptide Y on energy homeostasis and the HPT axis. *Endocrinology* 143, 3846–3853. doi: 10.1210/en.2002-220338
- Fioramonti, X., Lorsignol, A., Taupignon, A., and Penicaud, L. (2004). A new ATP-sensitive K⁺ channel-independent mechanism is involved in glucose-excited neurons of mouse arcuate nucleus. *Diabetes* 53, 2767–2775. doi: 10.2337/diabetes.53.11.2767
- Gonzalez-Chavez, A., Elizondo-Argueta, S., Gutierrez-Reyes, G., and Leon-Pedroza, J. I. (2011). Pathophysiological implications between chronic inflammation and the development of diabetes and obesity. *Cir. Cir.* 79, 209–216.
- Green, S. (1995). PPAR: a mediator of peroxisome proliferator action. *Mutat. Res.* 333, 101–109. doi: 10.1016/0027-5107(95)00136-0
- Gutteridge, J. M., and Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 899, 136–147. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06182.x
- Gyengesi, E., Andrews, Z. B., Paxinos, G., and Zaborszky, L. (2013). Distribution of secretagogin-containing neurons in the basal forebrain of mice, with special reference to the cholinergic corticopetal system. *Brain Res. Bull.* 94, 1–8. doi: 10.1016/j.brainresbull.2013.01.009
- Gyengesi, E., Paxinos, G., and Andrews, Z. B. (2012). Oxidative Stress in the Hypothalamus: the Importance of Calcium Signaling and Mitochondrial ROS in Body Weight Regulation. *Curr. Neuropharmacol.* 10, 344–353. doi: 10.2174/157015912804499438
- Hernandez-Fonseca, K., Cardenas-Rodriguez, N., Pedraza-Chaverri, J., and Massieu, L. (2008). Calcium-dependent production of reactive oxygen species is involved in neuronal damage induced during glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* 86, 1768–1780. doi: 10.1002/jnr.21634
- Hirooka, Y., Kishi, T., Sakai, K., Takeshita, A., and Sunagawa, K. (2011). Imbalance of central nitric oxide and reactive oxygen species in the regulation of sympathetic activity and neural mechanisms of hypertension. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 300, R818–R826. doi: 10.1152/ajpregu.00426.2010
- Hordijk, P. L. (2006). Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. *Circ. Res.* 98, 453–462. doi: 10.1161/01.RES.0000204727.46710.5e
- Horvath, T. L., Andrews, Z. B., and Diano, S. (2009). Fuel utilization by hypothalamic neurons: roles for ROS. *Trends Endocrinol. Metab.* 20, 78–87. doi: 10.1016/j.tem.2008.10.003
- Horvath, T. L., Bechmann, I., Naftolin, F., Kalra, S. P., and Leranth, C. (1997). Heterogeneity in the neuropeptide Y-containing neurons of the rat arcuate nucleus: GABAergic and non-GABAergic subpopulations. *Brain Res.* 756, 283–286. doi: 10.1016/S0006-8993(97)00184-4
- Ibrahim, N., Bosch, M. A., Smart, J. L., Qiu, J., Rubinstein, M., Ronnekleiv, O. K., et al. (2003). Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels. *Endocrinology* 144, 1331–1340. doi: 10.1210/en.2002-221033
- Infanger, D. W., Sharma, R. V., and Davisson, R. L. (2006). NADPH oxidases of the brain: distribution, regulation, and function. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1583–1596. doi: 10.1089/ars.2006.8.1583
- Jaillard, T., Roger, M., Galinier, A., Guillou, P., Benani, A., Leloup, C., et al. (2009). Hypothalamic reactive oxygen species are required for insulin-induced food intake inhibition: an NADPH oxidase-dependent mechanism. *Diabetes* 58, 1544–1549. doi: 10.2337/db08-1039
- Johansen, J. S., Harris, A. K., Rychly, D. J., and Ergul, A. (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc. Diabetol.* 4:5. doi: 10.1186/1475-2840-4-5
- Kennedy, G. C. (1953). The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 140, 578–596. doi: 10.1098/rspb.1953.0009
- Kim, M. J., Shin, K. S., Chung, Y. B., Jung, K. W., Cha, C. I., and Shin, D. H. (2005). Immunohistochemical study of p47Phox and gp91Phox distributions in rat brain. *Brain Res.* 1040, 178–186. doi: 10.1016/j.brainres.2005.01.066
- Kim, M. S., Small, C. J., Stanley, S. A., Morgan, D. G., Seal, L. J., Kong, W. M., et al. (2000). The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. *J. Clin. Invest.* 105, 1005–1011. doi: 10.1172/JCI8857
- Knauf, C., Drougard, A., Fournel, A., Duparc, T., and Valet, P. (2013). Hypothalamic actions of apelin on energy metabolism: new insight on glucose homeostasis and metabolic disorders. *Horm. Metab. Res.* 45, 928–934. doi: 10.1055/s-0033-1351321
- Krashes, M. J., Koda, S., Ye, C., Rogan, S. C., Adams, A. C., Cusher, D. S., et al. (2011). Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 1424–1428. doi: 10.1172/JCI46229
- Kuo, D. Y., Chen, P. N., Chu, S. C., and Hsieh, Y. S. (2012). Knocking down the transcript of NF-kappaB modulates the reciprocal regulation of endogenous antioxidants and feeding behavior in phenylpropranolamine-treated rats. *Arch. Toxicol.* 86, 453–463. doi: 10.1007/s00204-011-0761-7
- Kuo, D. Y., Chen, P. N., Yang, S. F., Chu, S. C., Chen, C. H., Kuo, M. H., et al. (2011). Role of reactive oxygen species-related enzymes in neuropeptide y and proopiomelanocortin-mediated appetite control: a study using atypical protein kinase C knockdown. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 2147–2159. doi: 10.1089/ars.2010.3738
- Lam, T. K., Schwartz, G. J., and Rossetti, L. (2005). Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nat. Neurosci.* 8, 579–584. doi: 10.1038/nn1456
- Lambeth, J. D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 181–189. doi: 10.1038/nri1312
- Leibowitz, S. F., Hammer, N. J., and Chang, K. (1981). Hypothalamic paraventricular nucleus lesions produce overeating and obesity in the rat. *Physiol. Behav.* 27, 1031–1040. doi: 10.1016/0031-9384(81)90366-8
- Leloup, C., Magnan, C., Benani, A., Bonnet, E., Alquier, T., Offer, G., et al. (2006). Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing. *Diabetes* 55, 2084–2090. doi: 10.2337/db06-0086
- Long, L., Toda, C., Jeong, J. K., Horvath, T. L., and Diano, S. (2014). PPARgamma ablation sensitizes proopiomelanocortin neurons to leptin during high-fat feeding. *J. Clin. Invest.* 124, 4017–4027. doi: 10.1172/JCI76220
- Lu, N., Helwig, B. G., Fels, R. J., Parimi, S., and Kenney, M. J. (2004). Central Tempol alters basal sympathetic nerve discharge and attenuates sympathetic excitation to central ANG II. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287, H2626–H2633. doi: 10.1152/ajpheart.00030.2004

- Marques-Da-Silva, D., and Gutierrez-Merino, C. (2012). L-type voltage-operated calcium channels, N-methyl-D-aspartate receptors and neuronal nitric-oxide synthase form a calcium/redox nano-transducer within lipid rafts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 420, 257–262. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.02.145
- Morley, J. E., and Flood, J. F. (1991). Evidence that nitric oxide modulates food intake in mice. *Life Sci.* 49, 707–711. doi: 10.1016/0024-3205(91)90102-H
- Morton, G. J., and Schwartz, M. W. (2011). Leptin and the central nervous system control of glucose metabolism. *Physiol. Rev.* 91, 389–411. doi: 10.1152/physrev.00007.2010
- 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. doi: 10.1007/s00125-006-0473-3
- Negre-Salvayre, A., Hirtz, C., Carrera, G., Cazenave, R., Trolly, M., Salvayre, R., et al. (1997). A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J.* 11, 809–815.
- Nicholls, D. G. (2009). Mitochondrial calcium function and dysfunction in the central nervous system. *Biochim. Biophys. Acta* 1787, 1416–1424. doi: 10.1016/j.bbabi.2009.03.010
- Ohkuma, S., and Katsura, M. (2001). Nitric oxide and peroxynitrite as factors to stimulate neurotransmitter release in the CNS. *Prog. Neurobiol.* 64, 97–108. doi: 10.1016/S0304-0082(00)00041-1
- Olney, J. W. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164, 719–721. doi: 10.1126/science.164.3880.719
- Oomura, Y., Kimura, K., Ooyama, H., Maeno, T., Iki, M., and Kuniyoshi, M. (1964). Reciprocal activities of the ventromedial and lateral hypothalamic areas of cats. *Science* 143, 484–485. doi: 10.1126/science.143.3605.484
- Palmer, R. M., Ferrige, A. G., and Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524–526. doi: 10.1038/327524a0
- Park, E. S., Yi, S. J., Kim, J. S., Lee, H. S., Lee, I. S., Seong, J. K., et al. (2004). Changes in orexin-A and neuropeptide Y expression in the hypothalamus of the fasted and high-fat diet fed rats. *J. Vet. Sci.* 5, 295–302.
- Parton, L. E., Ye, C. P., Coppari, R., Enriori, P. J., Choi, B., Zhang, C. Y., et al. (2007). Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 449, 228–232. doi: 10.1038/nature06098
- Pazdro, R., and Burgess, J. R. (2010). The role of vitamin E and oxidative stress in diabetes complications. *Mech. Ageing Dev.* 131, 276–286. doi: 10.1016/j.mad.2010.03.005
- Pinto, S., Roseberry, A. G., Liu, H., Diano, S., Shanabrough, M., Cai, X., et al. (2004). Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science* 304, 110–115. doi: 10.1126/science.1089459
- Purkayastha, S., and Cai, D. (2013). Neuroinflammatory basis of metabolic syndrome. *Mol. Metab.* 2, 356–363. doi: 10.1016/j.molmet.2013.09.005
- Qiu, J., Fang, Y., Ronnekleiv, O. K., and Kelly, M. J. (2010). Leptin excites pro-opiomelanocortin neurons via activation of TRPC channels. *J. Neurosci.* 30, 1560–1565. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4816-09.2010
- Reaux-Le Goazigo, A., Bodineau, L., De Mota, N., Jeandel, L., Chartrel, N., Knauf, C., et al. (2011). Apelin and the pro-opiomelanocortin system: a new regulatory pathway of hypothalamic alpha-MSH release. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301, E955–E966. doi: 10.1152/ajpendo.00090.2011
- Richard, D., Rivest, R., Huang, Q., Bouillaud, F., Sanchis, D., Champigny, O., et al. (1998). Distribution of the uncoupling protein 2 mRNA in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 397, 549–560.
- Rodríguez, E. M., Blázquez, J. L., and Guerra, M. (2010). The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides* 31, 757–776. doi: 10.1016/j.peptides.2010.01.003
- Rossi, M., Kim, M. S., Morgan, D. G., Small, C. J., Edwards, C. M., Sunter, D., et al. (1998). A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone *in vivo*. *Endocrinology* 139, 4428–4431. doi: 10.1210/endo.139.10.6332
- Routh, V. H. (2002). Glucose-sensing neurons: are they physiologically relevant? *Physiol. Behav.* 76, 403–413. doi: 10.1016/S0031-9384(02)00761-8
- Routh, V. H. (2010). Glucose sensing neurons in the ventromedial hypothalamus. *Sensors (Basel)* 10, 9002–9025. doi: 10.3390/s101009002
- Sanacora, G., Kershaw, M., Finkelstein, J. A., and White, J. D. (1990). Increased hypothalamic content of prepro-neuropeptide Y messenger ribonucleic acid in genetically obese Zucker rats and its regulation by food deprivation. *Endocrinology* 127, 730–737. doi: 10.1210/endo-127-2-730
- Santiago, J. A., and Potashkin, J. A. (2014). System-based approaches to decode the molecular links in Parkinson's disease and diabetes. *Neurobiol. Dis.* 72(Pt A), 84–91. doi: 10.1016/j.nbd.2014.03.019
- Schneeberger, M., Dietrich, M. O., Sebastian, D., Imbernon, M., Castano, C., Garcia, A., et al. (2013). Mitofusin 2 in POMC neurons connects ER stress with leptin resistance and energy imbalance. *Cell* 155, 172–187. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.003
- Schrader, M., and Fahimi, H. D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 1755–1766. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.09.006
- Schwartz, M. W., and Porte, D. Jr. (2005). Diabetes, obesity, and the brain. *Science* 307, 375–379. doi: 10.1126/science.1104344
- Serrano, E., Kolluri, N. S., Wientjes, F. B., Card, J. P., and Klann, E. (2003). NADPH oxidase immunoreactivity in the mouse brain. *Brain Res.* 988, 193–198. doi: 10.1016/S0006-8993(03)03364-X
- Shibuki, K., and Okada, D. (1991). Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature* 349, 326–328. doi: 10.1038/349326a0
- Shimizu, N., Oomura, Y., Plata-Salaman, C. R., and Morimoto, M. (1987). Hyperphagia and obesity in rats with bilateral ibotenic acid-induced lesions of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Brain Res.* 416, 153–156. doi: 10.1016/0006-8993(87)91508-3
- Sies, H., and Cadenas, E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 311, 617–631. doi: 10.1098/rstb.1985.0168
- Stellar, E. (1994). The physiology of motivation. 1954. *Psychol. Rev.* 101, 301–311. doi: 10.1037/0033-295X.101.2.301
- Storozhevych, T. P., Senilova, Y. E., Persiyantseva, N. A., Pinelis, V. G., and Pomytkin, I. A. (2007). Mitochondrial respiratory chain is involved in insulin-stimulated hydrogen peroxide production and plays an integral role in insulin receptor autophosphorylation in neurons. *BMC Neurosci.* 8:84. doi: 10.1186/1471-2202-8-84
- Strehler, E. E., Caride, A. J., Filoteo, A. G., Xiong, Y., Penniston, J. T., and Enyedi, A. (2007). Plasma membrane Ca²⁺ ATPases as dynamic regulators of cellular calcium handling. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1099, 226–236. doi: 10.1196/annals.1387.023
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335–344. doi: 10.1113/jphysiol.2003.049478
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001
- Voza, A., Parisi, G., De Leonardis, F., Lasorsa, F. M., Castegna, A., Amorese, D., et al. (2014). UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 960–965. doi: 10.1073/pnas.1317400111
- Weber, A. M., Wong, F. K., Tufford, A. R., Schlichter, L. C., Matveev, V., and Stanley, E. F. (2010). N-type Ca²⁺ channels carry the largest current: implications for nanodomains and transmitter release. *Nat. Neurosci.* 13, 1348–1350. doi: 10.1038/nn.2657
- Wilding, J. P., Gilbey, S. G., Bailey, C. J., Batt, R. A., Williams, G., Ghatei, M. A., et al. (1993). Increased neuropeptide-Y messenger ribonucleic acid (mRNA) and decreased neurotensin mRNA in the hypothalamus of the obese (ob/ob) mouse. *Endocrinology* 132, 1939–1944.
- Willesen, M. G., Kristensen, P., and Romer, J. (1999). Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 70, 306–316. doi: 10.1159/000054491
- Wynne, K., Stanley, S., McGowan, B., and Bloom, S. (2005). Appetite control. *J. Endocrinol.* 184, 291–318. doi: 10.1677/joe.1.05866
- Yang, Y., Atasoy, D., Su, H. H., and Sternson, S. M. (2011). Hunger states switch a flip-flop memory circuit via a synaptic AMPK-dependent positive feedback loop. *Cell* 146, 992–1003. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.039
- Yasuda, T., Masaki, T., Kakuma, T., and Yoshimatsu, H. (2004). Hypothalamic melanocortin system regulates sympathetic nerve activity in brown adipose tissue. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 229, 235–239.
- Yoon, Y., Galloway, C. A., Jhun, B. S., and Yu, T. (2011). Mitochondrial dynamics in diabetes. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 439–457. doi: 10.1089/ars.2010.3286
- York, D. A., Marchington, D., Holt, S. J., and Allars, J. (1985). Regulation of sympathetic activity in lean and obese Zucker (fa/fa) rats. *Am. J. Physiol.* 249, E299–E305.

- Yu, X., Shao, X. G., Sun, H., Li, Y. N., Yang, J., Deng, Y. C., et al. (2008). Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma exerts neuroprotection by inhibiting oxidative stress following pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res.* 1200, 146–158. doi: 10.1016/j.brainres.2008.01.047
- Zimmerman, M. C., Lazartigues, E., Lang, J. A., Sinnayah, P., Ahmad, I. M., Spitz, D. R., et al. (2002). Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ. Res.* 91, 1038–1045. doi: 10.1161/01.RES.0000043501.47934.FA

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 30 November 2014; paper pending published: 07 January 2015; accepted: 07 February 2015; published online: 24 February 2015.

Citation: Drougard A, Fournel A, Valet P and Knauf C (2015) Impact of hypothalamic reactive oxygen species in the regulation of energy metabolism and food intake. Front. Neurosci. 9:56. doi: 10.3389/fnins.2015.00056

This article was submitted to Neuroendocrine Science, a section of the journal Frontiers in Neuroscience.

Copyright © 2015 Drougard, Fournel, Valet and Knauf. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Personal pdf file for
C. Knauf, A. Drougard, A. Fournel, T. Duparc, P. Valet

With compliments of Georg Thieme Verlag

www.thieme.de

Hypothalamic Actions of Apelin on Energy Metabolism: New Insight on Glucose Homeostasis and Metabolic Disorders

DOI 10.1055/s-0033-1351321
Horm Metab Res 2013; 45: 928–934

For personal use only.
No commercial use, no depositing in repositories.

Publisher and Copyright
© 2013 by
Georg Thieme Verlag KG
Rüdigerstraße 14
70469 Stuttgart
ISSN 0018-5043

Reprint with the
permission by
the publisher only

 **Thieme**

Hypothalamic Actions of Apelin on Energy Metabolism: New Insight on Glucose Homeostasis and Metabolic Disorders

Authors

C. Knauf^{1,2}, A. Drougard^{1,2}, A. Fournel^{1,2}, T. Duparc³, P. Valet^{1,2}

Affiliations

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Toulouse, France

²UPS, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Université Paul Sabatier, France

³Metabolism and Nutrition Research Group, Louvain Drug Research Institute, Université catholique de Louvain, LDRI, Brussels, Belgium

Key words

- apelin
- glucose metabolism
- hypothalamus
- type 2 diabetes
- obesity

Abstract

Hypothalamus is key area implicated in control of glucose homeostasis. This structure integrates nervous and peripheral informations to adapt a response modifying peripheral glucose utilization and maintaining energetic balance. Among peripheral signals, adipokines such as adiponectin and leptin are of special importance since deregulations of their actions are closely associated to metabolic disorders such as obesity and type 2 diabetes. During the past ten years, we have identified a new adipokine named apelin which has emerging role in the control of metabolism. The originality of the apelinergic system is to be largely represented in peripheral tissues

(adipose tissue, intestine, etc.) and in the brain. Then, apelin is released by adipose tissue as all adipokines, but also present another crucial role as neurotransmitter in hypothalamic neurons. By acting in the whole body, apelin exerts pleiotropic actions and is now considered as a major determinant of physiological functions. Besides its general beneficial effects on peripheral targets, central action of apelin remains still a matter of debate. In this review, we have made a parallel between peripheral vs. central actions of apelin in term of signalization and effects. Then, we have focused our attention on hypothalamic apelin and its potential role in glucose metabolism and associated pathologies.

Introduction

An alteration of the maintenance of energy balance, and particularly glucose homeostasis, can lead to metabolic disorders including obesity and type 2 diabetes. In this complex system, which includes hormonal and nervous regulation, the hypothalamus plays a major role as a center of integration of various nervous and peripheral signals including nutrients, afferent nerves and adipokines such as leptin and adiponectin. Recently, we have identified the role of an adipokine, apelin, which has the originality to be expressed in hypothalamic neurons. Thus, apelin can exert multiple peripheral and central actions, which have large consequences on numerous physiological functions and associated pathologies. This review focuses on the role of apelin, which binds to its receptor APJ, and especially on its implication in the control of energy metabolism by targeting the hypothalamus.

Apelin and the Apelin Receptor

APJ receptor

In 1998, Tatemoto et al. discovered the peptide binding the orphan APJ receptor and named it apelin (for APJ Endogenous Ligand) [1]. The APJ receptor is a G-protein-coupled receptor (GPCR) identified in 1993 in humans [2]. The specificity of this receptor is a close sequence homology with the type 1 angiotensin II receptor. However, APJ does not bind the angiotensin II. The gene encoding this receptor is located on the locus q22 of chromosome 11 and its RNA transcripts are found first in several brain areas. Hypothalamus contains the highest density of APJ transcripts and more particularly in the paraventricular (PVN), supraoptic (SON) and arcuate nuclei (ARC) [3,4]. Labeling of APJ is also found in extrahypothalamic structures such as cortex, pineal gland, olfactory bulb, dentate gyrus and choroid plexus [3]. On peripheral tissues, lungs and thyroid express strongly APJ as insulin-responsive tissue like adipose tissue, skeletal muscles, heart, and at lower level in the liver [5,6].

received 26.04.2013
accepted 08.07.2013

Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1351321>

Published online:

August 15, 2013

Horm Metab Res 2013;
45: 928–934

© Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York
ISSN 0018-5043

Correspondence

C. Knauf

INSERM U1048 – I2MC
Bat L4, 1 Avenue Jean Poulhès
CHU Rangueil BP 84225
31432 Toulouse Cedex 4
France

Tel.: +33/5/6132 5635

Fax: +33/5/6132 5623

claud.knauf@inserm.fr

Apelin

The human apelin gene is localized on the chromosome Xq25-q26.1 [7]. It encodes a 77-amino acid polypeptide with a secretory signal sequence and called preproapelin. Then, this precursor is cleaved by endopeptidases into proapelin (55 amino acid) and into various biologically active forms whose the predominant molecular forms are apelin-13, -17 and -36 [6]. Apelin is a peptide, originally extracted from bovine stomach tissue [1], which presents the originality to be expressed widely in the whole body, and in the brain [8,9] supporting a role as a hormone and a neurotransmitter. Similar to APJ, apelin isoforms are expressed in many brains regions including thalamus, hippocampus, midbrain, pineal gland, frontal cortex, and in the magnocellular neurons of hypothalamus areas such as preoptic area, periventricular, ventromedial, and dorsomedial nuclei [7] suggesting pleiotropic actions in physiology and/or physiopathology. Apelin isoforms are also expressed in many peripheral tissues [10] like heart [11], kidney [12], lung [6], mammary gland [6], and adipose tissue [8]. Predominant molecular forms in the hypothalamus and in the plasma are apelin-13 and apelin-36 [6] whereas Pyr(1)-apelin-13 seems to be the major form present in the heart [11]. This pyroglutamine residue offers a better protection and higher resistance for apelin to enzymatic degradation. For this reason, Pyr(1)-apelin-13 has been largely used to study *in vivo* or *in vitro* responses [13]. In fact, apelin has a short circulating half-life and can also be degraded by the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) [14].

Apelin/APJ signaling pathway

APJ is a GPCR, which could be internalized by the recruitment of β -arrestins leading to its desensitization. Apelin-13 and apelin-36 differ in receptor binding affinity and in their ability to affect the intracellular trafficking. Apelin-13 has greater affinity and potency for the APJ than apelin-36 [5]. Moreover, the apelin-13-internalized receptor is rapidly recycled to the cell surface through a Rab4-dependent mechanism while the apelin-36-internalized receptor is associated with β -arrestin1 and then is targeted for degradation in lysosomes by Rab7 [15]. Thus, the apelinergic system presents another originality since a single receptor (APJ) can be differentially trafficked as a result of activation by multiple isoforms of the same ligand. As a result, many data from literature suggest that the couple APJ/apelin is involved in many signaling pathways. APJ is preferentially coupled to Gi protein, and consequently apelin is able to 1) inhibit adenylyl cyclase, generating lower rise in cAMP [16] and 2) activate extracellular-regulated kinase (ERKs), more particularly induces p42 and p44 phosphorylation by a Protein Kinase C (PKC) dependent-pathway [17]. Apelin/APJ is also able to phosphorylate p70S6 kinase from activation of 2 signaling cascades implicating PI3 kinase and ERK, respectively, which are linked to a different pattern of p70S6K phosphorylation [18]. Via the implementation of signaling cascades implicating PI3 kinase, apelin can also activate phospholipase C (PLC) as mediator largely involved in the regulation of energetic metabolism such as endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) [19], AMPK [20] and Akt [21].

Physiological effects of apelin on peripheral tissues

Through these different signaling pathways, apelinergic system is involved in several physiological mechanisms. At the cellular level, apelin/APJ is implicated in the proliferation of endothelial progenitors during the formation of cardiovascular system, but also in the control of immune system with anti-inflammatory

effect on activated T lymphocytes [22]. In the same way, apelin stimulates endothelial cell proliferation and especially retinal angiogenesis [23] since apelin-knockout mice have a retardation of retinal vascular development [24]. This emerging vascular role of apelin seems to imply this molecule as a therapeutic target in cancer [25]. At the tissue level, apelin is involved in the regulation of cardiovascular system by an action on blood vessels and on heart. In fact, apelin generates a decrease of blood pressure via nitric oxide (NO) pathway [26] but also an increase of cardiac contractility [27]. Apelin has a cardioprotective role against oxidative stress and apoptosis [28,29] evidenced by low plasma levels measured in patient with cardiac pathologies [30]. This dual effect, direct and indirect, opens perspectives in treatment of cardiovascular diseases. Another preferential peripheral target of apelin is the digestive tract. Intestinal apelin stimulates gastric cell proliferation [31], duodenal bicarbonate secretion, enteric cholecystokinin release [32], and gastric acid secretion [33]. More recently, our group showed that glucose specifically promotes Pyr(1)-apelin-13 secretion in the intestine leading to increased glucose absorption by an AMPK-dependent mechanism [34].

Specific peripheral actions of apelin on energy metabolism

Metabolic disorders are characterized by multiple phenotypic alterations reflected by 2 known pathologies, that is, obesity and type 2 diabetes. Type 2 diabetes is commonly described as a pathology with various symptoms including hyperglycemia, hyperinsulinemia, and insulin resistance, which refers to a state where physiological concentrations of insulin are poorly effective [35]. This pathological state is strongly linked to obesity and it is characterized by an impairment to respond to high levels of insulin.

Adipocytes produce and secrete adipokines. Disruption of their global actions can influence the emergence of type 2 diabetes [36]. We have demonstrated in 2005 that apelin is not only produced but also secreted by adipocytes showing that apelin belongs to the family of adipokines [8]. Reinforcing the concept is shown in human since plasma levels are expressed at a concentration close to picomolar, consistent with the range of a circulating hormone. Apelin release is strongly related to insulin since it has been shown that its injection decrease insulin levels *in vivo* and *in vitro* [37], while insulin treatment on cultured adipocytes generates an increase of apelin expression and secretion [38]. Among the adipokines produced and secreted by adipocytes, apelin is considered as a promising target for treating metabolic disorders. In the peripheral organs, increased secretion and expression of apelin in different mouse models of obesity and obese subjects is strongly associated with insulin regulation. We demonstrated that apelin produced by the peripheral organs is considered beneficial with antidiabetic properties and represents a promising target for managing insulin resistance. Acute intravenous injection of apelin in normal mice has shown a powerful glucose-lowering effect by stimulating glucose utilization in skeletal muscle via eNOS, AMPK, and Akt-dependent pathways. Apelin restored glucose tolerance and increased glucose utilization in skeletal muscle and adipose tissue in obese and insulin-resistant mice fed a high-fat diet. Two weeks of chronic apelin treatment in insulin-resistant mice was shown to improve insulin sensitivity [39]. The role of apelin in glucose homeostasis has been confirmed in apelin knockout mice that have decreased insulin sensitivity [39]. Apelin improves also lipid metabolism by a decrease of adiposity,

serum levels of triglycerides and an increase of energy expenditure by brown adipose tissue (BAT) activity [40]. Moreover, chronic apelin treatment optimizes muscle mitochondrial performance through increased mitochondrial biogenesis and a tighter matching between fatty acid oxidation and the tricarboxylic acid cycle [41]. More recently, we demonstrated the specific relationships between the gut microbiota, which regulates glucose metabolism [42,43], and regulation of the apelinergic system in the adipose tissue [44]. Indeed, we showed that apelin/APJ expression was upregulated by the bacteria-derived compounds lipopolysaccharides in pathological situations such as metabolic diseases.

The originality of apelin is that it can act as an adipokine, but also as a neurotransmitter secreted by neurons in the central nervous system (CNS). In the context of T2D, apelin levels are increased in the plasma of human and mice [8,45] but also in the hypothalamus of mice [46]. As opposed to peripheral effect [20], central mechanisms of apelin action on glucose homeostasis are not totally elucidated, and will be developed in the next part of this review.

Apelin and the Brain

Physiological effect on the brain

As previously described, apelin and its receptor APJ are expressed in different areas of CNS. APJ/Apelin is abundantly expressed in the oligodendrocytes and neurons in human and at lower levels in astrocytes [47]. At the opposite, APJ was not expressed in microglia in the spinal cord [48]. This distribution implies apelin in various behavioral phenomena such as pain by an antinociceptive effect involving μ -opioid receptors [49], and as learning and memory consolidation via α -adrenergic, 5-HT₂ serotonergic, cholinergic, dopaminergic, GABAergic, and NO mediations [50]. Another characteristic of central apelin's action is its ability to protect neurons against excitotoxicity by several mechanisms [51]. In these studies, the authors demonstrate that apelin can protect cultured cortical neurons via an inhibition of reactive oxygen species (ROS) production, mitochondrial depolarization and apoptosis activation, mediated by ERK/Akt signaling pathways. Inversely, apelin cannot protect cultured hippocampal neurons without the presence of VEGF suggesting different actions depending on the area of the brain.

The hypothalamus is one of the area of the brain where apelin and its receptor are strongly expressed. In this structure, APJ is present in the medial parvocellular regions of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) and scattered magnocellular neurons of the PVN and the supraoptic nucleus (SON), which are key structures in the regulation of endocrine and autonomic responses for the maintenance of homeostasis [52]. APJ/Apelin is also present in the pituitary gland suggesting a role in the control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA). Indeed, it has been demonstrated the involvement of APJ as neuromodulator in modifying HPA axis activity in response to acute stress stimuli [53]. This study shows a decrease of ACTH release in APJ-deficient mice in response to hypoglycemic stress clearly confirming a role of central apelin in neuroendocrine functions. In the same way, apelin is co-expressed with vasopressin (AVP) and oxytocin in magnocellular neurons generating a functional role in fluid homeostasis [9]. APJ-deficient mice exhibit a decrease of water intake and an increase of AVP levels [54] while the intracerebroventricular (icv) injection of apelin inhibits AVP neurons

activity and activates diuresis [16]. It has already been shown that 24-h of water deprivation on rat lead to a decrease in AVP content and to an increase of apelin content in magnocellular neurons of PVN and SON. Treatment with AVP receptor antagonist on these neurons inhibits the increase of apelin content while treatment of AVP receptor agonist allows its rise suggesting the involvement of AVP in the regulation of neuronal apelin. Quantitative analysis demonstrated that 89% of apelin neurons contained POMC, whereas less than 10% contained NPY. However, numerous NPY nerve fibers are detected close to apelin neuronal cell bodies implying potential control of NPY on POMC/apelin neurons activity [46]. Indeed, NPY has been shown to inhibit the activity of POMC neurons via Y1 and Y5 receptors [55]. More than half of the arcuate nucleus (ARC) POMC neurons express apelin receptor mRNA, and agonist of apelin strongly increases α -MSH release from rat hypothalamic explants, whereas inactive apelin fragment does not [46]. This information suggests that apelin may be somatodendritically or axonally released from POMC neurons, stimulating in an autocrine manner the release of α -MSH, a neuropeptide reducing food intake and inducing weight loss. In accordance with this data, studies reveal an anorexigenic effect of icv apelin injection with the involvement of corticoliberins [56,57]. Contradictorily, Taheri et al. showed that apelin has no effect on food intake into fed rats while stimulates food intake in a dose-dependent manner by icv injection into fasting rats [58]. The effect generated by apelin seems to depend on animal model, on dose of apelin injected, nutritional status and metabolic status. It has been recently shown that the anorexigen effect of apelin is lost in obese/diabetic rats correlating with a decrease of hypothalamic APJ expression which could explain the lack of decrease of food intake in this model [57].

Cell signaling pathways in the brain

Concerning neuronal signaling pathways involved in apelin effects, we can retrieve similarly pathway than periphery (see Fig. 1). In fact, apelin generates Akt, ERK1/2 and Raf phosphorylation in hippocampal cultures [59]. Likewise in MC3T3-E1 cells, c-Jun N-terminal kinase and PI3-kinase/AKT signaling are activated in response to apelin while in cultured cortical neurons PKC phosphorylation is induced [60]. Finally, several forms of the APJ peptide ligand alleviate NMDA-mediated Ca²⁺ accumulation in neurons [51].

Besides an action on α -MSH release in hypothalamus, few studies have investigated central signaling pathway mediated by apelin and involved in the regulation of glucose metabolism. Duparc et al. demonstrate that icv injection of apelin into fed mice improves glucose homeostasis via NO-dependent pathway [61]. As previously described, apelin can phosphorylate eNOS that generates NO release which improves glucose metabolism in muscle. This regulation is also present in the hypothalamus since in response to icv apelin injection, hypothalamic eNOS is phosphorylated to decrease fed glycemia, improve glucose and insulin tolerance without modifying plasma insulin concentration. All these beneficial effects are abolished in eNOS-deficient mice and obese/diabetic mice proving the fundamental role of hypothalamic reactive nitrogen species (RNS) like NO in this regulation. Emerging data point to a pivotal role of hypothalamic ROS in the energy homeostasis regulation. Recent study has shown that apelin directly increases neuronal activity via stimulation of NADPH oxidase-derived superoxide in neurons cultured from ventral brainstem [62]. Superoxide belongs to the

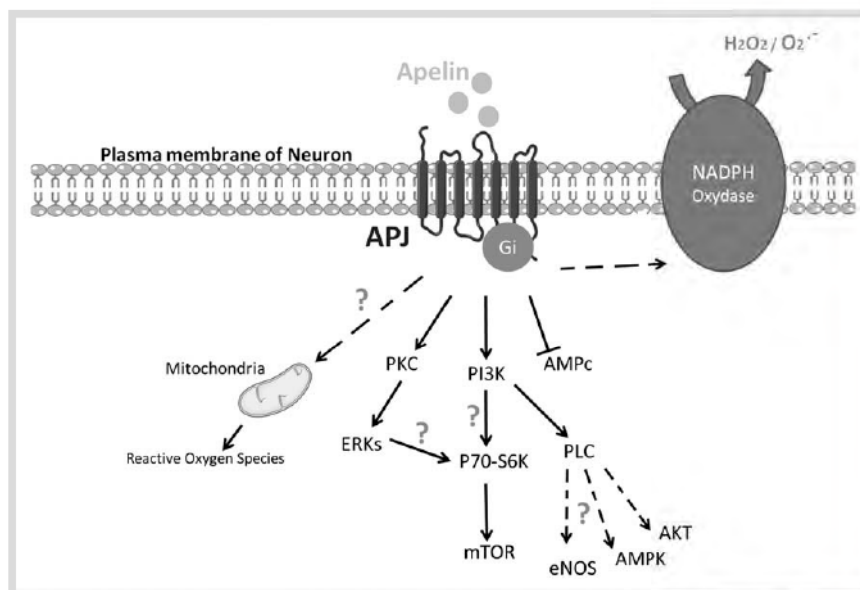


Fig. 1 Potential intracellular targets of neuronal apelin action.

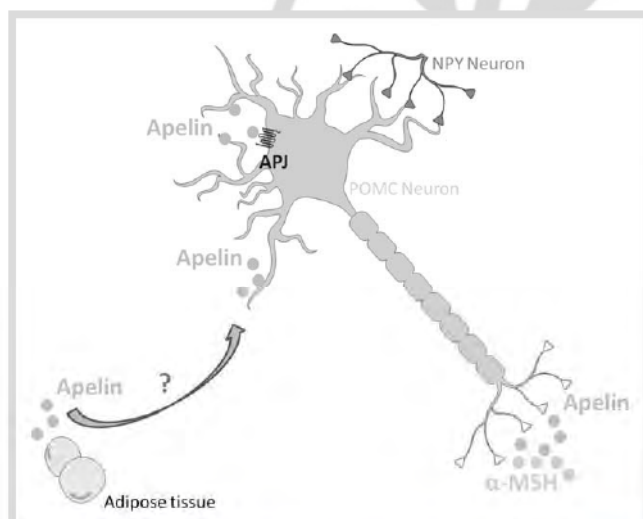


Fig. 2 Autocrine regulation of α -MSH release by apelin on POMC neurons. The large majority of apelin neurons contain POMC. POMC neurons express APJ and agonist of apelin strongly increases α -MSH release. It is suggested that apelin may be somatodendritically or axonally released stimulating in an autocrine manner the release of α -MSH. Moreover, numerous NPY nerve fibers are detected close to apelin neuronal cell bodies implying potential control of NPY neurons on apelin/POMC neurons activity. Finally, we can speculate that peripheral apelin may reach the hypothalamus via the blood-brain barrier in order to modulate the activity of apelin/POMC neurons.

ROS family, which is well known to be involved in the central regulation of glucose homeostasis [63,64]. As previously described, apelin can act on mitochondria and its metabolites but also on NADPH oxidase activity, 2 main producers of hypothalamic ROS [63, 65], suggesting that this family of mediator could be implied in hypothalamic apelin signaling pathway.

Central apelin and glucose metabolism

Peripheral apelin improves glucose and lipids metabolism in muscle, and conserves its effect during metabolic disorders leading to consider apelin as a promising target for therapeutic advances [20,41], like leptin and adiponectin. These major adi-

pokines could act on periphery but also in the brain, more precisely in the hypothalamus. This structure is located in the floor of the third ventricle and could receive hormonal and metabolic informations via a physiologically modified blood-brain barrier conferring the property of the hypothalamus to sense directly peripheral variations like all neurohemal structures [66]. Higuchi et al. have demonstrated that hypothalamic apelin concentration is increased after intra-peritoneal (ip) apelin injection [67]. Moreover, ip apelin injection increases c-Fos staining especially in the hypothalamus (PVN, lateral hypothalamic area) and brainstem [67], reinforcing the hypothesis that peripheral apelin can target brain structures. Then, we can speculate that apelin, as an adipokine released by adipose tissue, could reach hypothalamus and modulate its apelin levels directly or by action on apelinergic neurons (see Fig. 2). Duparc et al. [61] showed that plasma levels of apelin in normal mice during 24h are increased during feeding activity (night period) and conversely decreased during the day. This regulation is completely lost in obese/diabetic mice where the levels are substantially increased during the entire 24h-day. These results can be linked with hypothalamic apelin levels which are also increased in these models [46]. Recently, we have shown that apelin stimulates hypothalamic NO release, which generates improving of glucose metabolism in fed mice [61]. This central effect could be mediated by the rise of plasma apelin levels during fed period. Based on all these informations, we propose that glucose utilization observed during the fed period could be linked to a dual effect of apelin on brain and peripheral tissue, via a common NO signaling.

Beneficial effect of central apelin is blunted in obese/diabetic mice, which 1) are not sensitive to a slight physiological increase of central apelin level [61] and 2) present an altered hypothalamic eNOS expression [68]. However, icv injection of high dose of apelin, similar to that observed in the hypothalamus of obese/diabetic mice, triggers fasted hyperglycemia in normal mice and increases hyperglycemia of obese/diabetic mice. This suggests that unlike leptin resistance observed in the brain if obese/diabetic mice, hypothalamus is still able to be stimulated by apelin in pathophysiological state. Then, we can suppose that a rise of hypothalamic apelin levels could be involved in the transition

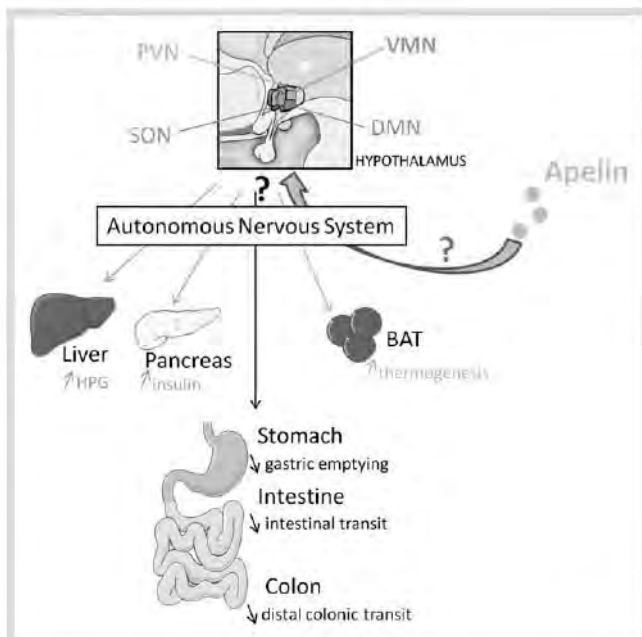


Fig. 3 Communication between the hypothalamus and peripheral organs in the glucose metabolism. Different hypothalamic nuclei could be targeted by central and/or peripheral apelin such as the supraoptic nucleus (SON), paraventricular nucleus (PVN), the dorsal medial nucleus (DMN), and the ventromedial nucleus (VMN). Then, peripheral tissues activity could be modified via the autonomous nervous system.

from normal to diabetic condition, and participates to the maintenance of a diabetic state in a long term period.

In response to icv apelin injection at a high-dose during fasted period, the c-Fos staining is increased in the ventro-medial hypothalamus (VMN) and decreased in the ARC without changing the c-Fos staining in dorso-medial hypothalamus (DMN). At the opposite, icv low-dose of apelin with beneficial properties generates a c-Fos signal in the DMN during fast and fed periods. These data confirm that hypothalamus is still sensitive to apelin, but bring into the light the complexity of the action of central apelin, which has differential effects depending on the nutritional condition, the quantity of apelin presents in the hypothalamus, and the evolution of the diabetic state.

Which peripheral organs could be targeted by central apelin during the establishment of a type 2 diabetes? (○ Fig. 3). As previously explained, icv injection of high levels of apelin generates fasted hyperglycemia and hyperinsulinemia, characteristic of a type 2 diabetes, suggesting that 1) the pancreas can modify its insulin release to generate hyperinsulinemia and 2) the liver can increase glucose production output leading to hyperglycemia [69]. Numerous studies have implicated the autonomous nervous system (ANS) in the control of pancreatic and hepatic functions. It has been recognized as a powerful additional modulator of peripheral tissues such as liver [70], and dysfunction of ANS is observed during diabetes [71]. To focus on central targets of apelin's action, the specific injection of apelin into the PVN can increase sympathetic nerve activity innervating BAT, resulting to an increase in BAT temperature [72]. These data are of potential interest for the control of energy balance by central apelin since BAT is a crucial organ involved in the control of glucose metabolism. Central apelin can also act on gastrointestinal motility via the ANS. Thus, icv injection of apelin inhibits distal colonic transit in mice [73], gastric emptying and intestinal transit [74] com-

plementing its direct established role in the glucose absorption in the intestine [34].

Conclusion

Since the discovery of apelinergic system, many implications of this adipokine and/or neurotransmitter in physiological systems have been revealed. The demonstration that apelin belongs to the family of the rare adipokines, which are expressed in both adipose tissue and brain, gives a prominent role in the treatment of metabolic diseases. Therapeutic strategies have to take into account the dual role of apelin in periphery and in the brain on glucose metabolism. To this aim, central molecular actors mediating the deleterious effect of apelin on glucose metabolism have to be determined.

Acknowledgements

The authors thank the Société Française de Nutrition (SFN) for its financial support.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest in the authorship or publication of this contribution.

References

- 1 Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251: 471–476
- 2 O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, Heng HH, Tsui LC, Kennedy JL, Shi X, Petronis A, George SR, Nguyen T. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 1993; 136: 355–360
- 3 De Mota N, Lenkei Z, Llorens-Cortes C. Cloning, pharmacological characterization and brain distribution of the rat apelin receptor. *Neuroendocrinology* 2000; 72: 400–407
- 4 Pope GR, Roberts EM, Lolait SJ, O'Carroll AM. Central and peripheral apelin receptor distribution in the mouse: species differences with rat. *Peptides* 2012; 33: 139–148
- 5 Hosoya M, Kawamata Y, Fukusumi S, Fujii R, Habata Y, Hinuma S, Kitada C, Honda S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J Biol Chem* 2000; 275: 21061–21067
- 6 Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S, Hosoya M, Fujii R, Hinuma S, Nishizawa N, Kitada C, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1538: 162–171
- 7 Lee DK, Cheng R, Nguyen T, Fan T, Kariyawasam AP, Liu Y, Osmond DH, George SR, O'Dowd BF. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J Neurochem* 2000; 74: 34–41
- 8 Boucher J, Masri B, Daviaud D, Gesta S, Guigne C, Mazzucotelli A, Castan-Laurell I, Tack I, Knibiehler B, Carpené C, Audigier Y, Saulnier-Blache JS, Valet P. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 2005; 146: 1764–1771
- 9 De Mota N, Reaux-Le Goazigo A, El Messari S, Chartrel N, Roesch D, Dujardin C, Kordon C, Vaudry H, Moos F, Llorens-Cortes C. Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 10464–10469
- 10 Castan-Laurell I, Dray C, Knauf C, Kunduzova O, Valet P. Apelin, a promising target for type 2 diabetes treatment? *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23: 234–241

- 11 Maguire JJ, Kleinz MJ, Pitkin SL, Davenport AP. [Pyr1]apelin-13 identified as the predominant apelin isoform in the human heart: vasoactive mechanisms and inotropic action in disease. *Hypertension* 2009; 54: 598–604
- 12 Bo Y, Yuan LP. Glomerular expression of apelin and its association with proteinuria. *Indian J Pediatr* 2012; 79: 1028–1032
- 13 Kleinz MJ, Davenport AP. Emerging roles of apelin in biology and medicine. *Pharmacol Ther* 2005; 107: 198–211
- 14 Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A, Tummino P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2002; 277: 14838–14843
- 15 Lee DK, Ferguson SS, George SR, O'Dowd BF. The fate of the internalized apelin receptor is determined by different isoforms of apelin mediating differential interaction with beta-arrestin. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 395: 185–189
- 16 Reaux A, De Mota N, Skultetyova I, Lenkei Z, El Messari S, Gallatz K, Corvol P, Palkovits M, Llorens-Cortes C. Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J Neurochem* 2001; 77: 1085–1096
- 17 Masri B, Lahlou H, Mazarguil H, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin (65–77) activates extracellular signal-regulated kinases via a PTX-sensitive G protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 539–545
- 18 Masri B, Morin N, Cornu M, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin (65–77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *FASEB J* 2004; 18: 1909–1911
- 19 Zhong JC, Yu XY, Huang Y, Yung LM, Lau CW, Lin SG. Apelin modulates aortic vascular tone via endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway in diabetic mice. *Cardiovasc Res* 2007; 74: 388–395
- 20 Dray C, Knauf C, Daviaud D, Waget A, Boucher J, Buleon M, Cani PD, Attane C, Guigne C, Carpenne C, Burcelin R, Castan-Laurell I, Valet P. Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 2008; 8: 437–445
- 21 Liu C, Su T, Li F, Li L, Qin X, Pan W, Feng F, Chen F, Liao D, Chen L. PI3K/Akt signaling transduction pathway is involved in rat vascular smooth muscle cell proliferation induced by apelin-13. *Acta Biochim Biophys Sinica* 2010; 42: 396–402
- 22 Kidoya H, Kunii N, Naito H, Muramatsu F, Okamoto Y, Nakayama T, Takakura N. The apelin/APJ system induces maturation of the tumor vasculature and improves the efficiency of immune therapy. *Oncogene* 2012; 31: 3254–3264
- 23 Eyries M, Siegfried G, Ciumas M, Montagne K, Agrapart M, Lebrin F, Soubrier F. Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. *Circ Res* 2008; 103: 432–440
- 24 Kasai A, Shintani N, Kato H, Matsuda S, Gomi F, Haba R, Hashimoto H, Takada M, Tano Y, Baba A. Retardation of retinal vascular development in apelin-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 1717–1722
- 25 Rayalam S, Della-Fera MA, Kasser T, Warren W, Baile CA. Emerging role of apelin as a therapeutic target in cancer: a patent review. *Recent Patents Anticancer Drug Discov* 2011; 6: 367–372
- 26 Tatamoto K, Takayama K, Zou MX, Kumaki I, Zhang W, Kumano K, Fujimiya M. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept* 2001; 99: 87–92
- 27 Szokodi I, Tavi P, Foldes G, Voutilainen-Myllyla S, Ilves M, Tokola H, Pikkariainen S, Piuhola J, Rysa J, Toth M, Ruskoaho H. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res* 2002; 91: 434–440
- 28 Zhang Z, Yu B, Tao GZ. Apelin protects against cardiomyocyte apoptosis induced by glucose deprivation. *Chin Med J (Engl)* 2009; 122: 2360–2365
- 29 Foussal C, Lairez O, Calise D, Pathak A, Guilbeau-Frugier C, Valet P, Parini A, Kunduzova O. Activation of catalase by apelin prevents oxidative stress-linked cardiac hypertrophy. *FEBS Lett* 2010; 584: 2363–2370
- 30 Chong KS, Gardner RS, Morton JJ, Ashley EA, McDonagh TA. Plasma concentrations of the novel peptide apelin are decreased in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2006; 8: 355–360
- 31 Wang G, Anini Y, Wei W, Qi X, AM OC, Mochizuki T, Wang HQ, Hellmich MR, Englander EW, Greeley GH Jr. Apelin, a new enteric peptide: localization in the gastrointestinal tract, ontogeny, and stimulation of gastric cell proliferation and of cholecystokinin secretion. *Endocrinology* 2004; 145: 1342–1348
- 32 Flemstrom G, Makela K, Purhonen AK, Sjoblom M, Jedstedt G, Walkowiak J, Herzig KH. Apelin stimulation of duodenal bicarbonate secretion: feeding-dependent and mediated via apelin-induced release of enteric cholecystokinin. *Acta Physiologica* 2011; 201: 141–150
- 33 Ohno S, Yakabi K, Ro S, Ochiai M, Onouchi T, Sakurada T, Takabayashi H, Ishida S, Takayama K. Apelin-12 stimulates acid secretion through an increase of histamine release in rat stomachs. *Regul Pept* 2012; 174: 71–78
- 34 Dray C, Sakar Y, Vinel C, Daviaud D, Masri B, Garrigues L, Wanecq E, Galvani S, Negre-Salvayre A, Barak LS, Monsarrat B, Burlet-Schiltz O, Valet P, Castan-Laurell I, Ducroc R. The intestinal glucose-apelin cycle controls carbohydrate absorption in mice. *Gastroenterology* 2013; 144: 771–780
- 35 Biddinger SB, Kahn CR. From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. *Annu Rev Physiol* 2006; 68: 123–158
- 36 Harwood HJ Jr. The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology* 2012; 63: 57–75
- 37 Sorhede Winzell M, Magnusson C, Ahren B. The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice. *Regul Pept* 2005; 131: 12–17
- 38 Boucher J, Castan-Laurell I, Daviaud D, Guigne C, Buleon M, Carpenne C, Saulnier-Blache JS, Valet P. Adipokine expression profile in adipocytes of different mouse models of obesity. *Horm Metab Res* 2005; 37: 761–767
- 39 Yue P, Jin H, Aillaud M, Deng AC, Azuma J, Asagami T, Kundu RK, Reaven GM, Quertermous T, Tsao PS. Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 298: E59–E67
- 40 Higuchi K, Masaki T, Gotoh K, Chiba S, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T, Yoshimatsu H. Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology* 2007; 148: 2690–2697
- 41 Attane C, Foussal C, Le Gonidec S, Benani A, Daviaud D, Wanecq E, Guzman-Ruiz R, Dray C, Bezaire V, Rancoule C, Kuba K, Ruiz-Gayo M, Levade T, Penninger J, Burcelin R, Penicaud L, Valet P, Castan-Laurell I. Apelin treatment increases complete Fatty Acid oxidation, mitochondrial oxidative capacity, and biogenesis in muscle of insulin-resistant mice. *Diabetes* 2012; 61: 310–320
- 42 Cani PD, Amar J, Iglesias AM, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmee E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrieres J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56: 1761–1772
- 43 Delzenne NM, Neyrinck AM, Cani PD. Gut microbiota and metabolic disorders: How prebiotic can work? *Br J Nutr* 2013; 109 (Suppl 2): S81–S85
- 44 Geurts L, Lazarevic V, Derrien M, Everard A, Van Roye M, Knauf C, Valet P, Girard M, Muccioli GG, Francois P, de Vos WM, Schrenzel J, Delzenne NM, Cani PD. Altered gut microbiota and endocannabinoid system tone in obese and diabetic leptin-resistant mice: impact on apelin regulation in adipose tissue. *Front Microbiol* 2011; 2: 149
- 45 Soriguer F, Garrido-Sanchez L, Garcia-Serrano S, Garcia-Almeida JM, Garcia-Arnes J, Tinahones FJ, Garcia-Fuentes E. Apelin levels are increased in morbidly obese subjects with type 2 diabetes mellitus. *Obes Surg* 2009; 19: 1574–1580
- 46 Reaux-Le Goazigo A, Bodineau L, De Mota N, Jeandel L, Chartrel N, Knauf C, Raad C, Valet P, Llorens-Cortes C. Apelin and the proopiomelanocortin system: a new regulatory pathway of hypothalamic alpha-MSH release. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 301: E955–E966
- 47 Choe W, Albright A, Sulcove J, Jaffer S, Hesselgesser J, Lavi E, Crino P, Kolson DL. Functional expression of the seven-transmembrane HIV-1 co-receptor APJ in neural cells. *J Neurovirol* 2000; 6 (Suppl 1): S61–S69
- 48 Kasai A, Kinjo T, Ishihara R, Sakai I, Ishimaru Y, Yoshioka Y, Yamamuro A, Ishige K, Ito Y, Maeda S. Apelin deficiency accelerates the progression of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 2011; 6: e23968
- 49 Lv SY, Qin YJ, Wang NB, Yang YJ, Chen Q. Supraspinal antinociceptive effect of apelin-13 in a mouse visceral pain model. *Peptides* 2012; 37: 165–170
- 50 Telegdy G, Adamik A, Jaszberenyi M. Involvement of neurotransmitters in the action of apelin-13 on passive avoidance learning in mice. *Peptides* 2013; 39: 171–174
- 51 Zeng XJ, Yu SP, Zhang L, Wei L. Neuroprotective effect of the endogenous neural peptide apelin in cultured mouse cortical neurons. *Exp Cell Res* 2010; 316: 1773–1783
- 52 O'Carroll AM, Lolait SJ. Regulation of rat APJ receptor messenger ribonucleic acid expression in magnocellular neurones of the paraventricular and supraoptic nuclei by osmotic stimuli. *J Neuroendocrinol* 2003; 15: 661–666
- 53 Newstrom MJ, Pope GR, Roberts EM, Lolait SJ, O'Carroll AM. Stress-dependent and gender-specific neuroregulatory roles of the apelin receptor in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to acute stress. *J Endocrinol* 2013; 216: 99–109

- 54 Roberts EM, Pope GR, Newson MJ, Landgraf R, Lolait SJ, O'Carroll AM. Stimulus-specific neuroendocrine responses to osmotic challenges in apelin receptor knockout mice. *J Neuroendocrinol* 2010; 22: 301–308
- 55 Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; 404: 661–671
- 56 Sunter D, Hewson AK, Dickson SL. Intracerebroventricular injection of apelin-13 reduces food intake in the rat. *Neurosci Lett* 2003; 353: 1–4
- 57 Clarke KJ, Whitaker KW, Reyes TM. Diminished metabolic responses to centrally-administered apelin-13 in diet-induced obese rats fed a high-fat diet. *J Neuroendocrinol* 2009; 21: 83–89
- 58 Taheri S, Murphy K, Cohen M, Sujkovic E, Kennedy A, Dhillon W, Dakin C, Sajedi A, Ghatei M, Bloom S. The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 1208–1212
- 59 O'Donnell LA, Agrawal A, Sabnekar P, Dichter MA, Lynch DR, Kolson DL. Apelin, an endogenous neuronal peptide, protects hippocampal neurons against excitotoxic injury. *J Neurochem* 2007; 102: 1905–1917
- 60 Tang SY, Xie H, Yuan LQ, Luo XH, Huang J, Cui RR, Zhou HD, Wu XP, Liao EY. Apelin stimulates proliferation and suppresses apoptosis of mouse osteoblastic cell line MC3T3-E1 via JNK and PI3-K/Akt signaling pathways. *Peptides* 2007; 28: 708–718
- 61 Duparc T, Colom A, Cani PD, Massaly N, Rastrelli S, Drougard A, Le Gondec S, Mouledous L, Frances B, Leclercq J, Llorens-Cortes C, Pospisilik JA, Delzenne NM, Valet P, Castan-Laurell I, Knauf C. Central apelin controls glucose homeostasis via a nitric oxide-dependent pathway in mice. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15: 1477–1496
- 62 Yao F, Modgil A, Zhang Q, Pingili A, Singh N, O'Rourke ST, Sun C. Pressor effect of apelin-13 in the rostral ventrolateral medulla: role of NAD(P)H oxidase-derived superoxide. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 336: 372–380
- 63 Leloup C, Tourrel-Cuzin C, Magnan C, Karaca M, Castel J, Carneiro L, Colombani AL, Ktorza A, Casteilla L, Penicaud L. Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 2009; 58: 673–681
- 64 Leloup C, Casteilla L, Carriere A, Galinier A, Benani A, Carneiro L, Penicaud L. Balancing mitochondrial redox signaling: a key point in metabolic regulation. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14: 519–530
- 65 Jaillard T, Roger M, Galinier A, Guillou P, Benani A, Leloup C, Casteilla L, Penicaud L, Lorsignol A. Hypothalamic reactive oxygen species are required for insulin-induced food intake inhibition: an NADPH oxidase-dependent mechanism. *Diabetes* 2009; 58: 1544–1549
- 66 Rodriguez EM, Blazquez JL, Guerra M. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides* 2010; 31: 757–776
- 67 Takayama K, Iwazaki H, Hirabayashi M, Yakabi K, Ro S. Distribution of c-Fos immunoreactive neurons in the brain after intraperitoneal injection of apelin-12 in Wistar rats. *Neurosci Lett* 2008; 431: 247–250
- 68 Cabou C, Cani PD, Campistron G, Knauf C, Mathieu C, Sartori C, Amar J, Scherrer U, Burcelin R. Central insulin regulates heart rate and arterial blood flow: an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism altered during diabetes. *Diabetes* 2007; 56: 2872–2877
- 69 Drougard A, Duparc T, Brenachot X, Carneiro L, Gouazé A, Fournel A, Geurts L, Cadoudal T, Prats AC, Pénicaud L, Vieau D, Lesage J, Leloup C, Benani A, Cani PD, Valet P, Knauf C. Hypothalamic apelin/ROS signaling controls hepatic glucose metabolism in the onset of diabetes. *Antioxid Redox Signal* 2013, in press
- 70 Kalsbeek A, Yi CX, La Fleur SE, Fliers E. The hypothalamic clock and its control of glucose homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21: 402–410
- 71 Penicaud L, Cousin B, Leloup C, Lorsignol A, Casteilla L. The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energy balance. *Nutrition* 2000; 16: 903–908
- 72 Masaki T, Yasuda T, Yoshimatsu H. Apelin-13 microinjection into the paraventricular nucleus increased sympathetic nerve activity innervating brown adipose tissue in rats. *Brain Res Bull* 2012; 87: 540–543
- 73 Yang YJ, Lv SY, Xiu MH, Xu N, Chen Q. Intracerebroventricular administration of apelin-13 inhibits distal colonic transit in mice. *Peptides* 2010; 31: 2241–2246
- 74 Lv SY, Yang YJ, Qin YJ, Xiong W, Chen Q. Effect of centrally administered apelin-13 on gastric emptying and gastrointestinal transit in mice. *Peptides* 2011; 32: 978–982

Le dialogue intestin, tissu adipeux et hypothalamus influence l'obésité et le diabète de type 2

Communication between intestine, adipose tissue and hypothalamus is involved in obesity and type 2 diabetes

A. Drougard · A. Fournel · P. Valet · C. Knauf

© Springer-Verlag France 2013

Résumé Le cerveau, et plus particulièrement l'hypothalamus, est le centre intégrateur de nombreux signaux d'origines diverses impliqués dans le contrôle de la satiété et du métabolisme énergétique. Par l'intermédiaire des systèmes endocrinien et/ou nerveux, les tissus périphériques (tube digestif, tissu adipeux parmi les principaux) peuvent alors envoyer des messages à l'hypothalamus, qui en retour modulera la prise alimentaire et l'utilisation périphérique du glucose. Ainsi, la genèse d'un message périphérique aberrant et/ou l'arrivée d'une information erronée dans l'hypothalamus peuvent participer à l'apparition des maladies métaboliques (obésité, diabète de type 2). En plus des troubles périphériques liés à ces pathologies, il devient d'une importance majeure de traiter ces « troubles hypothalamiques » en agissant, dans la mesure du possible, directement sur des cibles hypothalamiques ou au contraire en ciblant des acteurs moléculaires, cellulaires et tissulaires périphériques connus pour communiquer avec l'hypothalamus. Dès lors, le traitement des maladies métaboliques passerait par une vision globale de l'organisme via la communication inter-organes et le système nerveux central comme centre intégrateur.

Mots clés Hypothalamus · Métabolisme · Obésité · Adipokines · Intestin

Abstract The brain, and more particularly the hypothalamus, is an integrative center for numerous signals from various origins implicated in the control of satiety and energy metabolism. Peripheral tissues (gut, adipose tissue)

are able to send endocrine and/or nervous messages to the hypothalamus which, in turn controls food intake and peripheral glucose utilization. Then, the generation of an abnormal peripheral message and/or the arrival of aberrant information directly in the hypothalamus could be involved in the settlement of metabolic disorders (obesity and type 2 diabetes). In addition to peripheral disorders related to such diseases, it becomes of crucial importance to address these major "hypothalamic disorders" by acting, when possible, directly on hypothalamic targets or instead targeting molecular, cellular and tissue actors known to be in close communication with the hypothalamus. Therefore, the treatment of metabolic disorders needs a global vision of the body through the inter-organ communication, and the central nervous system behaving as an integrative center.

Keywords Hypothalamus · Metabolism · Obesity · Adipokines · Intestine

Introduction

La communication inter-organe est essentielle au maintien du contrôle du métabolisme énergétique. Dans ce dialogue complexe impliquant les systèmes nerveux et endocrinien, l'hypothalamus prend une part non-négligeable dans la régulation de l'homéostasie énergétique en jouant le rôle de centre intégrateur d'informations d'origines diverses. Ainsi, l'hypothalamus va recevoir des messages de type nerveux, endocriniens ou métaboliques, et va générer une réponse adaptée permettant de moduler la prise alimentaire et la dépense énergétique. Son rôle majeur dans le contrôle de l'homéostasie énergétique a été démontré par l'utilisation de modèles animaux présentant des lésions de noyaux hypothalamiques [1,2], ce qui a permis d'identifier l'implication de différentes régions, à savoir l'hypothalamus ventromédian (VMN), l'hypothalamus dorsomédian (DMN), l'aire latérale hypothalamique (LHA), le noyau paraventriculaire

A. Drougard · A. Fournel · P. Valet · C. Knauf (✉)
Institut national de la santé et de la recherche médicale
(INSERM), U1048, Toulouse, France
e-mail : claude.knauf@inserm.fr

Université Paul Sabatier, UPS,
Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires (I2MC),
CHU Rangueil, 1, avenue Jean Poulhès,
BP84225, 31432 Toulouse cedex 4, France

(NPV) et le noyau arqué (ARC). Les projections neuronales entre ces différentes régions sont nombreuses, augmentant ainsi les échanges d'informations entre les différentes structures, mais augmentant également la difficulté de compréhension des mécanismes de régulation (Fig. 1). Parmi toutes les structures hypothalamiques, l'ARC présente l'originalité d'être localisé au dessus de l'éminence médiane, zone où la barrière hémato-encéphalique présente des modifications morpho-fonctionnelles permettant le passage de certaines molécules informatives telles que les hormones et les métabolites [3]. L'ARC est donc une des premières structures capables de détecter des variations du taux d'hormones périphériques circulantes. De plus, l'ARC est en connexion avec le tronc cérébral, ce qui lui donne la possibilité de recevoir également des informations périphériques via une voie nerveuse afférente [4,5].

En ciblant l'ARC, l'ensemble de ces facteurs va moduler l'activité de neurones orexigènes, le système NPY/AgRP (Neuropeptide Y/Agouti and Related Peptide) ; et de neurones anorexigènes, le système POMC/CART (ProOpiomelanocortin et Cocaine-and-Amphetamine-Related Transcript), connu également pour augmenter la dépense énergétique en activant les récepteurs à la mélanocortine (MC3R et MC4R) [6]. Ainsi, une dérégulation de ces systèmes au cours du développement et/ou en réponse à un régime alimentaire in-

dapté participe à l'apparition de maladies métaboliques. Dès lors, l'identification des acteurs moléculaires impliqués dans le contrôle central de l'homéostasie énergétique est d'une importance cruciale dans la mise en place de nouveaux traitements luttant contre l'obésité ou le diabète de type 2.

L'objectif général de cette revue est de faire un bilan des acteurs moléculaires impliqués dans des communications inter-organes mettant en jeu l'hypothalamus dans les conditions physiopathologiques. Ainsi, l'intestin, le tissu adipeux et certaines hormones métaboliques vont pouvoir moduler l'activité neuronale hypothalamique.

Obésité/Diabète et axe « intestin-cerveau »

Lors de la prise alimentaire, le glucose est détecté par des cellules spécialisées, cellules « senseurs » au glucose, localisées au niveau du pancréas [7], du tractus digestif [8] et du cerveau [9]. Lors de la prise alimentaire, les premiers senseurs détectant les variations de glucose sont ceux présents dans le tube digestif, et plus précisément dans la paroi intestinale et dans la veine hépato-portale [10-12]. Ces senseurs transmettent alors des messages nerveux et/ou hormonaux aux autres tissus périphériques (pancréas, muscles,...), mais également à l'hypothalamus [13]. Chez la souris, l'injection

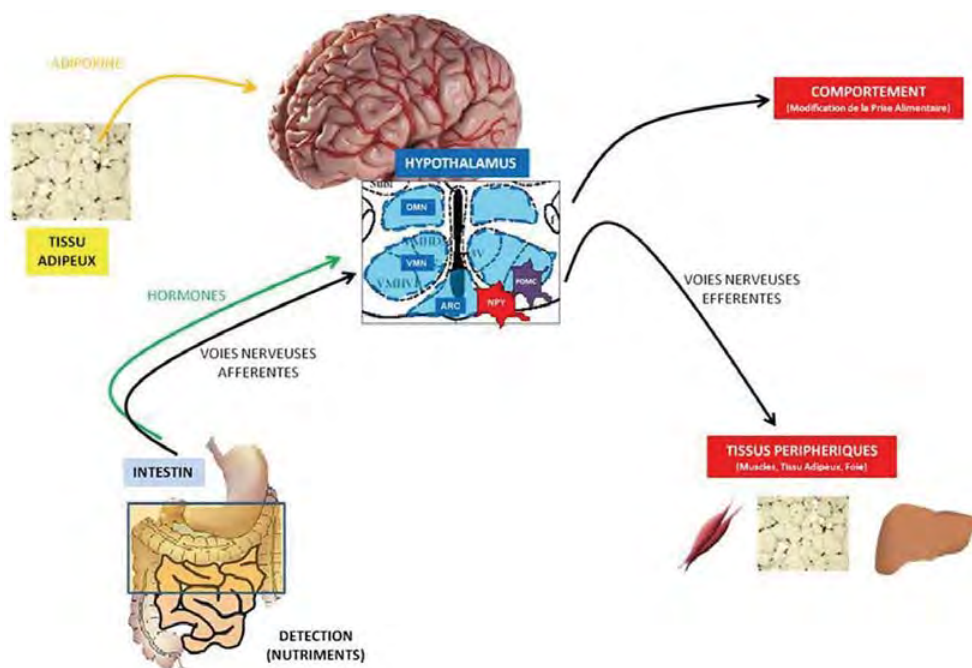


Fig. 1 Communication inter-organes dans le contrôle du métabolisme énergétique et de la prise alimentaire. L'hypothalamus reçoit des informations nerveuses et/ou hormonales en provenance de l'intestin (capable de détecter la présence de certains nutriments) et du tissu adipeux (adipokines). La modification d'activité des neurones à NPY et à POMC résultant de la sommation de ces informations aboutit à une modification du comportement alimentaire et à une modification de l'utilisation périphérique du glucose. Au cours de l'obésité, des perturbations de détection de nutriments dans l'intestin et de la sécrétion des adipokines aboutissent à une réponse inadaptée de l'hypothalamus, augmentant la prise alimentaire et provoquant une insulino-résistance périphérique

intra-gastrique (ig) de glucose, à une dose stimulant spécifiquement ces senseurs entériques (sans modifier la glycémie périphérique et donc sans stimuler les autres senseurs), génère un message nerveux afférent se traduisant par une augmentation de l'expression de c-Fos (marqueur d'activité neuronale) dans le tronc cérébral, et une diminution de ce même marqueur dans l'ARC, le VMN et le DMN [13]. La modification d'activité neuronale mesurée dans l'hypothalamus correspond à un ciblage des neurones à NPY à la base de la création d'un message nerveux efférent permettant d'augmenter l'utilisation du glucose au niveau musculaire [13]. Chez la souris en régime hyperlipidique, cet axe intestin-cerveau-périphérie est fortement perturbé. En effet, le même type d'injection ig de glucose ne modifie ni l'expression de c-Fos dans le cerveau, ni l'utilisation du glucose en périphérie suggérant ainsi que 1) les senseurs entériques détectent mal le glucose et/ou envoient un message erroné au cerveau, et 2) une altération des systèmes de détection entérique au glucose participe à la mise en place de l'obésité (modification de l'activité des neurones à NPY) et du diabète de type 2 (insulino-résistance). Cette dernière hypothèse est renforcée par le travail de Duparc et al [14] qui montre, dans un modèle de souris obèses/diabétiques génétiquement modifiées (db/db), l'absence d'augmentation de libération hypothalamique de monoxyde d'azote (NO) en réponse à une injection ig de glucose comparée aux souris contrôles [14]. Le NO étant un acteur moléculaire hypothalamique contrôlant l'utilisation périphérique de glucose [15], une altération des systèmes de détection entérique au glucose pourrait participer à l'apparition de troubles métaboliques. Des données de la littérature suggèrent actuellement qu'une inflammation intestinale, liée à un régime nutritionnel inadapté [13] ou liée à une modification génétique [14], serait à l'origine des perturbations de l'axe intestin-cerveau.

L'implication de cet axe intestin-cerveau-périphérie est clairement démontré au cours de la chirurgie bariatrique, notamment lors du gastric bypass, permettant une perte de poids pouvant atteindre 50 % du poids initial. Dans ce type de chirurgie, l'ensemble des mécanismes nerveux et endocriniens, qui étaient perturbés chez l'individu obèse/diabétique, sont à nouveau "remaniés" afin de permettre une réponse améliorée de l'axe intestin-cerveau en agissant aussi bien sur les hormones gastro-intestinales que sur les voies nerveuses afférentes [16]. Les conséquences de cette chirurgie bariatrique sur le tronc cérébral et l'hypothalamus ont largement été décrites dans différents modèles expérimentaux, et le ciblage indirect de ces régions du système nerveux aboutit à une diminution de la prise alimentaire et de la prise de poids. Récemment, Breen et al [17] ont montré que la détection des nutriments au niveau intestinal, via un relais central, jouait un rôle clé dans l'amélioration de l'homéostasie glucidique chez le rat opéré d'un « gastric bypass ».

Enfin, certains chercheurs tentent de faire le lien entre les modifications de la flore intestinale observées au cours du diabète et de l'obésité, et des modifications potentielles de l'activité hypothalamique (prise alimentaire, dépense énergétique) [18].

Obésité/Diabète et axe « tissu adipeux-cerveau »

Le tissu adipeux est capable de sécréter de nombreux facteurs appelés adipokines connus pour être impliqués dans le contrôle du métabolisme énergétique, et dont la sécrétion est fortement perturbée lors des maladies métaboliques [19,20]. Leurs interactions avec les tissus périphériques (muscles, pancréas, foie,...) et le cerveau sont extrêmement nombreuses [21]. Récemment, en plus de la leptine, l'adipokine la plus étudiée dans le contrôle central de l'obésité et des maladies métaboliques, notre groupe a été le premier à identifier le rôle de l'apeline dans le maintien de l'homéostasie glucidique [22].

Leptine

Les effets hypothalamiques de la leptine sont largement décrits dans la littérature à savoir inhibition de la prise alimentaire, diminution de la prise de poids et de la glycémie, stimulation de la thermogenèse et de l'oxydation des acides gras [23]. En agissant sur son récepteur fortement exprimé dans l'hypothalamus [23], la leptine peut ainsi inhiber l'activité des neurones à NPY [24,25] et stimuler celle des neurones à POMC [24]. La délétion génique du récepteur à la leptine dans l'hypothalamus [26] ou spécifiquement dans les neurones à POMC chez la souris [27] aboutit à l'apparition d'un phénotype obèse. De plus, il est clairement établi que l'obésité provoque une résistance centrale à la leptine. Cette résistance pourrait être liée à une diminution du transport à la leptine dans le cerveau et/ou une altération de la transduction du signal de la leptine [28].

Apeline

Parmi les adipokines potentiellement impliquées dans le contrôle du métabolisme glucidique, notre groupe s'intéresse au rôle de l'apeline, découverte en 1998 [29], et identifiée par notre équipe comme adipokine en 2005 [30]. L'apeline est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 77 acides aminés qui va ensuite être clivé en un peptide de 55 acides aminés, lequel pourra donner à son tour des peptides de différentes tailles (l'apeline 13 pyroglutaminée étant la forme la plus active). L'ARNm du gène codant l'apeline est exprimé dans de nombreux tissus périphériques comme le tissu adipeux, les poumons, le cœur et les gonades, mais

également au niveau central. En périphérie, l'apeline possède un effet inotrope positif sur le système cardiovasculaire, une action sur l'homéostasie des fluides corporels et est capable de stimuler la prolifération cellulaire [31]. Au niveau central, et plus précisément au niveau de l'hypothalamus, l'apeline a 1) des effets controversés sur la prise alimentaire, effets semblant dépendre du modèle animal et des doses perfusées [32-34], et 2) une puissante action diurétique via l'inhibition de la libération de vasopressine [35]. L'apeline est le ligand endogène du récepteur orphelin APJ, récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine de type Gi/Go, dont l'activation conduit à une réponse cellulaire impliquant de nombreuses voies de signalisation. Ce récepteur est exprimé dans presque tout l'organisme, mais de façon plus marquée dans l'hypothalamus, le cœur, les poumons et le tissu adipeux [36]. L'apeline a donc la particularité d'être une des rares adipokines ayant également un rôle de neurotransmetteur : il a été mis en évidence l'existence de neurones apelinergiques au niveau de l'hypothalamus, du noyau supra-optique et du noyau caudé [37].

Notre groupe a récemment montré que l'apeline, injectée en périphérie par voie intraveineuse (iv), avait des effets bénéfiques chez des souris normales mais également chez des souris rendues obèses et diabétiques suite à un régime hyperlipidique [22]. En effet, une injection iv d'apeline provoque une diminution de la glycémie, une amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline [22,38], ainsi qu'une augmentation de l'utilisation du glucose par les muscles et le tissu adipeux blanc [22]. De plus, l'apeline est capable d'augmenter l'absorption du glucose au niveau intestinal [39]. Concernant ses effets dans le système nerveux, notre groupe a démontré que l'injection intracérébro-ventriculaire (icv) d'apeline a des effets différentiels en fonction du statut nutritionnel et de la dose injectée. Ainsi, de faibles doses d'apeline injectées en icv, doses similaires à celles retrouvées chez la souris normale, améliorent la tolérance au glucose et à l'insuline chez la souris normale en condition nourrie [40]. A l'inverse, de fortes doses d'apeline injectées en icv, similaires à celles retrouvées dans l'hypothalamus de souris obèses/diabétiques [41], provoquent une insulino-résistance périphérique chez la souris normale à jeun [40]. Ces résultats suggèrent que 1) l'action directe de l'apeline sur les neurones hypothalamiques est totalement différente en fonction de l'état diabétique du modèle étudié, et 2) l'apeline par son action centrale participe à la mise en place de l'obésité et du diabète de type 2. Contrairement au phénomène de résistance à la leptine observé au cours de l'obésité, l'action de l'apeline dans le système nerveux central est conservée, puisque l'injection icv chez la souris obèse augmente la glycémie à jeun, amplifiant l'hyperglycémie à jeun caractéristique d'un diabète de type 2 [40]. Une partie des effets hypothalamiques de l'apeline pourrait passer par une action sur les neurones à POMC, qui exprime le

récepteur APJ, et dont la stimulation par l'apeline génère une libération d'alpha-MSH [41]. Les effets centraux de l'apeline sur le contrôle des fonctions périphériques impliquent également le système nerveux autonome [42].

Conclusion

Ainsi, un régime alimentaire inadapté génère l'apparition d'un message périphérique aberrant (nerveux, hormonal) pouvant avoir une origine adipocytaire et/ou intestinale. En plus des modifications périphériques largement décrites dans la littérature, ces messages erronés peuvent moduler l'activité du système nerveux central, et plus précisément l'hypothalamus, ce dernier étant l'élément intégrateur final contrôlant la prise alimentaire et l'utilisation périphérique du glucose. Ainsi, cibler les actions moléculaires hypothalamiques de messages périphériques pourrait être à la base de futures approches thérapeutiques pour les maladies métaboliques.

Références

1. Mayer J, Thomas DW (1967) Regulation of food intake and obesity. *Science* 156:328–37.
2. Stellar E (1954) The physiology of motivation. *Psychol Rev* 61:5–22
3. Rodríguez EM, Blázquez JL, Guerra M (2010) The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieu: The former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides*. *Peptides* 31:757–76
4. Thorens B, Larsen PJ (2004) Gut-derived signaling molecules and vagal afferents in the control of glucose and energy homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7:471–8
5. Williams G, Bing C, Cai XJ, et al (2001) The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav* 74:683–701
6. Suzuki K, Jayasena CN, Bloom SR (2012) Obesity and appetite control. *Exp Diabetes Res* doi: 10.1155/2012/824305. Epub 2012 Aug 1
7. Thorens B (2001) GLUT2 in pancreatic and extra-pancreatic gluco-detection (review). *Mol Membr Biol* 18:265–73
8. Shirazi-Beechey SP, Moran AW, Batchelor D.J, et al (2011) Glucose sensing and signalling; regulation of intestinal glucose transport. *Proc Nutr Soc* 70:185–93
9. Routh VH (2010) Glucose sensing neurons in the ventromedial hypothalamus. *Sensors (Basel)* 10:9002–25
10. Burcelin R, Dolci W, Thorens B (2000) Glucose sensing by the hepatoportal sensor is GLUT-2 dependent . In vivo analysis in GLUT-2null mice. *Diabetes* 49:1643–8
11. Burcelin R, Dolci W, Thorens B (2000) Portal glucose infusion in the mouse induces hypoglycemia. Evidence that the hepatoportal glucose sensor stimulates glucose utilization. *Diabetes* 49: 1635–42
12. Burcelin R, Da Costa A, Drucker D, Thorens B (2001) Glucose competence of the hepatoportal vein sensor requires the presence of an activated glucagon-like peptide-1 receptor. *Diabetes* 50:1720–8

13. Knauf C, Cani PD, Kim DH, et al (2008) Role of central nervous system glucagon-like Peptide-1 receptors in enteric glucose sensing. *Diabetes* 57:2603–12.
14. Duparc T, Naslain D, Colom A, et al (2011) Jejunum inflammation in obese and diabetic mice impairs enteric glucose detection and modifies nitric oxide release in the hypothalamus. *Antioxid Redox Signal* 14:415–23
15. Shankar R, Zhu J, Ladd B, et al (1998) Central nervous system nitric oxide synthase activity regulates insulin secretion and insulin action. *J Clin Invest* 102:1403–12
16. Berthoud HR, Shin AC, Zheng H (2011) Obesity surgery and gut-brain communication. *Physiol Behav* 105:106–19
17. Breen DM, Rasmussen BA, Kokorovic A, et al (2012) Jejunal nutrient sensing is required for duodenal-jejunal bypass surgery to rapidly lower glucose concentrations in uncontrolled diabetes. *Nat Med* 18:950–5
18. Pimentel GD, Micheletti TO, Pace F, et al (2012) Gut-central nervous system axis is a target for nutritional therapies. *Nutr J* doi: 10.1186/1475-2891-11-22.
19. Cook KS, Min HY, Johnson D, et al (1987) Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science* 237:402–5
20. Flier JS, Cook KS, Usher P, Spiegelman BM (1987) Severely impaired adipsin expression in genetic and acquired obesity. *Science* 237:405–8
21. Harwood HJ Jr (2012) The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology* 63:57–75
22. Dray C, Knauf C, Daviaud D, et al (2008) Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 8:437–45
23. Flier JS (2004) Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116:337–50
24. Ahima RS, Qi Y, Singhal NS (2006) Adipokines that link obesity and diabetes to the hypothalamus. *Prog Brain Res* 153:155–74
25. Israel D, Chua S Jr (2010) Leptin receptor modulation of adiposity and fertility. *Trends Endocrinol Metab* 21:10–6
26. Cohen P, Zhao C, Cai X, et al (2001) Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. *J Clin Invest* 108:1113–21
27. Balthasar N, Dalgaard LT, Lee CE, et al (2005) Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell* 123:493–505
28. Jung CH, Kim MS (2013) Molecular mechanisms of central leptin resistance in obesity. *Arch Pharm Res* 36:201–7
29. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, et al (1998) Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 251:471–6
30. Boucher J, Masri B, Daviaud D, et al (2005) Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 146:1764–71
31. Masri B, Knibiehler B, Audigier Y (2005) Apelin signalling: a promising pathway from cloning to pharmacology. *Cell Signal* 17:415–26
32. Clarke KJ, Whitaker KW, Reyes TM (2009) Diminished metabolic responses to centrally-administered apelin-13 in diet-induced obese rats fed a high-fat diet. *J Neuroendocrinol* 21:83–9
33. Lv SY, Qin YJ, Wang HT, et al (2012) Centrally administered apelin-13 induces depression-like behavior in mice. *Brain Res Bull* 88:574–80
34. Sunter D, Hewson AK, Dickson SL (2003) Intracerebroventricular injection of apelin-13 reduces food intake in the rat. *Neurosci Lett* 353:1–4
35. Llorens-Cortes C, Moos F (2012) Apelin and vasopressin: two work better than one. *J Neuroendocrinol* 24:1085–6
36. Castan-Laurell I, Dray C, Knauf C, et al (2012) Apelin, a promising target for type 2 diabetes treatment? *Trends Endocrinol Metab* 23:234–41
37. Reaux A, De Mota N, Skultetyova I, et al (2001) Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J Neurochem* 77:1085–96
38. Attane, C., Foussal, C., Le Gonidec, S., Benani, A., Daviaud, D., Wanecq, E., Guzman-Ruiz, R., Dray C, Bezaire V, Rancoule C, et al (2012) Apelin treatment increases complete Fatty Acid oxidation, mitochondrial oxidative capacity, and biogenesis in muscle of insulin-resistant mice. *Diabetes* 61:310–20
39. Dray C, Sakar Y, Vinel C, et al (2013) The Intestinal Glucose-Apelin Cycle Controls Carbohydrate Absorption in Mice. *Gastroenterology* doi: 10.1053/j.gastro.2013.01.004
40. Duparc T, Colom A, Cani PD, et al (2011) Central apelin controls glucose homeostasis via a nitric oxide-dependent pathway in mice. *Antioxid Redox Signal* 15:1477–96
41. Reaux-Le Goazigo A, Bodineau L, De Mota N, et al (2011) Apelin and the proopiomelanocortin system: a new regulatory pathway of hypothalamic alpha-MSH release. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301:E955–66
42. Masaki T, Yasuda T, Yoshimatsu H (2012) Apelin-13 microinjection into the paraventricular nucleus increased sympathetic nerve activity innervating brown adipose tissue in rats. *Brain Res Bull* 87:540–3

Références bibliographiques

1. Amaral, A.I., *Effects of hypoglycaemia on neuronal metabolism in the adult brain: role of alternative substrates to glucose*. J Inher Metab Dis, 2013. **36**(4): p. 621-34.
2. Bell, G.I., et al., *Molecular biology of mammalian glucose transporters*. Diabetes Care, 1990. **13**(3): p. 198-208.
3. Scheepers, A., H.G. Joost, and A. Schurmann, *The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2004. **28**(5): p. 364-71.
4. Karnieli, E., et al., *Insulin-stimulated translocation of glucose transport systems in the isolated rat adipose cell. Time course, reversal, insulin concentration dependency, and relationship to glucose transport activity*. J Biol Chem, 1981. **256**(10): p. 4772-7.
5. Robichon, C., J. Girard, and C. Postic, *[Can the hyperactivity of lipogenesis cause hepatic steatosis? A role for ChREBP]*. Med Sci (Paris), 2008. **24**(10): p. 841-6.
6. Surholt, B. and E.A. Newsholme, *Maximum activities and properties of glucose 6-phosphatase in muscles from vertebrates and invertebrates*. Biochem J, 1981. **198**(3): p. 621-9.
7. Croset, M., et al., *Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ*. Diabetes, 2001. **50**(4): p. 740-6.
8. Mithieux, G., et al., *Contribution of intestine and kidney to glucose fluxes in different nutritional states in rat*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2006. **143**(2): p. 195-200.
9. Matschinsky, F.M., *Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm*. Diabetes, 1996. **45**(2): p. 223-41.
10. MacDonald, P.E., J.W. Joseph, and P. Rorsman, *Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005. **360**(1464): p. 2211-25.
11. Capeau, J., *[Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance]*. Med Sci (Paris), 2003. **19**(8-9): p. 834-9.
12. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
13. Larance, M., G. Ramm, and D.E. James, *The GLUT4 code*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(2): p. 226-33.
14. Baura, G.D., et al., *Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain*. J Clin Invest, 1993. **92**(4): p. 1824-30.
15. Banks, W.A., J.B. Jaspan, and A.J. Kastin, *Selective, physiological transport of insulin across the blood-brain barrier: novel demonstration by species-specific radioimmunoassays*. Peptides, 1997. **18**(8): p. 1257-62.
16. Havrankova, J., J. Roth, and M. Brownstein, *Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat*. Nature, 1978. **272**(5656): p. 827-9.
17. Obici, S., et al., *Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production*. Nat Med, 2002. **8**(12): p. 1376-82.
18. Perrin, C., C. Knauf, and R. Burcelin, *Intracerebroventricular infusion of glucose, insulin, and the adenosine monophosphate-activated kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, controls muscle glycogen synthesis*. Endocrinology, 2004. **145**(9): p. 4025-33.
19. Bruning, J.C., et al., *Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction*. Science, 2000. **289**(5487): p. 2122-5.
20. Obici, S., et al., *Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats*. Nat Neurosci, 2002. **5**(6): p. 566-72.

21. Konner, A.C., et al., *Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production*. *Cell Metab*, 2007. **5**(6): p. 438-49.
22. Lotfy, M., et al., *Recent Progress in the Use of Glucagon and Glucagon Receptor Antagonists in the Treatment of Diabetes Mellitus*. *Open Med Chem J*, 2014. **8**: p. 28-35.
23. Inokuchi, A., et al., *Central action of glucagon in rat hypothalamus*. *Am J Physiol*, 1986. **250**(1 Pt 2): p. R120-6.
24. Amir, S., *Central glucagon-induced hyperglycemia is mediated by combined activation of the adrenal medulla and sympathetic nerve endings*. *Physiol Behav*, 1986. **37**(4): p. 563-6.
25. Ahren, B., *Glucagon--Early breakthroughs and recent discoveries*. *Peptides*, 2015. **67**: p. 74-81.
26. Elrick, H., et al., *Plasma Insulin Response to Oral and Intravenous Glucose Administration*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1964. **24**: p. 1076-82.
27. Sandoval, D.A. and D.A. D'Alessio, *Physiology of proglucagon peptides: role of glucagon and GLP-1 in health and disease*. *Physiol Rev*, 2015. **95**(2): p. 513-48.
28. Patzelt, C. and G. Schug, *The major proglucagon fragment: an abundant islet protein and secretory product*. *FEBS Lett*, 1981. **129**(1): p. 127-30.
29. Holst, J.J., *The physiology of glucagon-like peptide 1*. *Physiol Rev*, 2007. **87**(4): p. 1409-39.
30. Baggio, L.L. and D.J. Drucker, *Biology of incretins: GLP-1 and GIP*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(6): p. 2131-57.
31. Herrmann, C., et al., *Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients*. *Digestion*, 1995. **56**(2): p. 117-26.
32. Depoortere, I., *Taste receptors of the gut: emerging roles in health and disease*. *Gut*, 2014. **63**(1): p. 179-90.
33. Psichas, A., F. Reimann, and F.M. Gribble, *Gut chemosensing mechanisms*. *J Clin Invest*, 2015. **125**(3): p. 908-17.
34. Roberge, J.N. and P.L. Brubaker, *Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by glucose-dependent insulinotropic peptide in a novel enteroendocrine loop*. *Endocrinology*, 1993. **133**(1): p. 233-40.
35. Cani, P.D., et al., *GLUT2 and the incretin receptors are involved in glucose-induced incretin secretion*. *Mol Cell Endocrinol*, 2007. **276**(1-2): p. 18-23.
36. Rocca, A.S. and P.L. Brubaker, *Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion*. *Endocrinology*, 1999. **140**(4): p. 1687-94.
37. Brubaker, P.L. and Y. Anini, *Direct and indirect mechanisms regulating secretion of glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2*. *Can J Physiol Pharmacol*, 2003. **81**(11): p. 1005-12.
38. Mentlein, R., B. Gallwitz, and W.E. Schmidt, *Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum*. *Eur J Biochem*, 1993. **214**(3): p. 829-35.
39. Kreymann, B., et al., *Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man*. *Lancet*, 1987. **2**(8571): p. 1300-4.
40. Nauck, M., et al., *Insulinotropic properties of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in man: interactions with glucose, phenylalanine, and cholecystokinin-8*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1989. **69**(3): p. 654-62.
41. Gault, V.A., et al., *Effects of the novel (Pro3)GIP antagonist and exendin(9-39)amide on GIP- and GLP-1-induced cyclic AMP generation, insulin secretion and postprandial insulin release in obese diabetic (ob/ob) mice: evidence that GIP is the major physiological incretin*. *Diabetologia*, 2003. **46**(2): p. 222-30.
42. Nauck, M.A., et al., *Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans*. *Am J Physiol*, 1997. **273**(5 Pt 1): p. E981-8.
43. Gu, W., et al., *Pharmacological targeting of glucagon and glucagon-like peptide 1 receptors has different effects on energy state and glucose homeostasis in diet-induced obese mice*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011. **338**(1): p. 70-81.

44. Mohammad, S., et al., *Gastric inhibitory peptide controls adipose insulin sensitivity via activation of cAMP-response element-binding protein and p110beta isoform of phosphatidylinositol 3-kinase*. J Biol Chem, 2011. **286**(50): p. 43062-70.
45. Perea, A., et al., *GLP-1 (7-36) amide: effects on glucose transport and metabolism in rat adipose tissue*. Horm Metab Res, 1997. **29**(9): p. 417-21.
46. Conti, F., *Claude Bernard: primer of the second biomedical revolution*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(9): p. 703-8.
47. Rodriguez, E.M., J.L. Blazquez, and M. Guerra, *The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid*. Peptides, 2010. **31**(4): p. 757-76.
48. Brobeck, J.R., *Mechanism of the development of obesity in animals with hypothalamic lesions*. Physiol Rev, 1946. **26**(4): p. 541-59.
49. Luiten, P.G., G.J. ter Horst, and A.B. Steffens, *The hypothalamus, intrinsic connections and outflow pathways to the endocrine system in relation to the control of feeding and metabolism*. Prog Neurobiol, 1987. **28**(1): p. 1-54.
50. Nonogaki, K., *New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism*. Diabetologia, 2000. **43**(5): p. 533-49.
51. Jitrapakdee, S., *Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(1): p. 33-45.
52. Ciobanu, L. and D.L. Dumitrascu, *Gastrointestinal motility disorders in endocrine diseases*. Pol Arch Med Wewn, 2011. **121**(4): p. 129-36.
53. Meruvu, S., et al., *Thyroid hormone analogues: where do we stand in 2013?* Thyroid, 2013. **23**(11): p. 1333-44.
54. Mayer, J., *Regulation of energy intake and the body weight: the glucostatic theory and the lipostatic hypothesis*. Ann N Y Acad Sci, 1955. **63**(1): p. 15-43.
55. Oomura, Y., et al., *Reciprocal Activities of the Ventromedial and Lateral Hypothalamic Areas of Cats*. Science, 1964. **143**(3605): p. 484-5.
56. Routh, V.H., *Glucose sensing neurons in the ventromedial hypothalamus*. Sensors (Basel), 2010. **10**(10): p. 9002-25.
57. Routh, V.H., *Glucose-sensing neurons: are they physiologically relevant?* Physiol Behav, 2002. **76**(3): p. 403-13.
58. Silver, I.A. and M. Erecinska, *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*. J Neurosci, 1994. **14**(8): p. 5068-76.
59. Steinbusch, L., G. Labouebe, and B. Thorens, *Brain glucose sensing in homeostatic and hedonic regulation*. Trends Endocrinol Metab, 2015. **26**(9): p. 455-66.
60. Leloup, C., et al., *Specific inhibition of GLUT2 in arcuate nucleus by antisense oligonucleotides suppresses nervous control of insulin secretion*. Brain Res Mol Brain Res, 1998. **57**(2): p. 275-80.
61. Kang, L., et al., *Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons*. Diabetes, 2004. **53**(3): p. 549-59.
62. Kang, L., et al., *Glucokinase is a critical regulator of ventromedial hypothalamic neuronal glucosensing*. Diabetes, 2006. **55**(2): p. 412-20.
63. Miki, T., et al., *ATP-sensitive K⁺ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis*. Nat Neurosci, 2001. **4**(5): p. 507-12.
64. Hallows, K.R., et al., *Inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by novel interaction with the metabolic sensor AMP-activated protein kinase*. J Clin Invest, 2000. **105**(12): p. 1711-21.

65. Canabal, D.D., et al., *Hyperglycemia impairs glucose and insulin regulation of nitric oxide production in glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007. **293**(2): p. R592-600.
66. Canabal, D.D., et al., *Glucose, insulin, and leptin signaling pathways modulate nitric oxide synthesis in glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007. **292**(4): p. R1418-28.
67. Jaffrey, S.R. and S.H. Snyder, *Nitric oxide: a neural messenger*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995. **11**: p. 417-40.
68. Murphy, B.A., et al., *Fasting enhances the response of arcuate neuropeptide Y-glucose-inhibited neurons to decreased extracellular glucose*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009. **296**(4): p. C746-56.
69. Young, J.K., J.H. Baker, and M.I. Montes, *The brain response to 2-deoxy glucose is blocked by a glial drug*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2000. **67**(2): p. 233-9.
70. Allard, C., et al., *Hypothalamic astroglial connexins are required for brain glucose sensing-induced insulin secretion*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2014. **34**(2): p. 339-46.
71. Bolborea, M. and N. Dale, *Hypothalamic tanycytes: potential roles in the control of feeding and energy balance*. *Trends Neurosci*, 2013. **36**(2): p. 91-100.
72. Orellana, J.A., et al., *Glucose increases intracellular free Ca(2+) in tanycytes via ATP released through connexin 43 hemichannels*. *Glia*, 2012. **60**(1): p. 53-68.
73. Marty, N., et al., *Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(12): p. 3545-53.
74. Leloup, C., et al., *Glucose and hypothalamic astrocytes: More than a fueling role?* *Neuroscience*, 2015.
75. Cortes-Campos, C., et al., *MCT expression and lactate influx/efflux in tanycytes involved in glia-neuron metabolic interaction*. *PLoS One*, 2011. **6**(1): p. e16411.
76. Turnley, A.M., et al., *Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system*. *J Neurochem*, 1999. **72**(4): p. 1707-16.
77. Woods, A., et al., *LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade*. *Curr Biol*, 2003. **13**(22): p. 2004-8.
78. Woods, A., et al., *Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells*. *Cell Metab*, 2005. **2**(1): p. 21-33.
79. Fryer, L.G., et al., *Activation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via stimulation of nitric oxide synthase*. *Diabetes*, 2000. **49**(12): p. 1978-85.
80. Fryer, L.G., et al., *Characterization of the role of the AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in skeletal muscle cells*. *Biochem J*, 2002. **363**(Pt 1): p. 167-74.
81. Winder, W.W., *AMP-activated protein kinase: possible target for treatment of type 2 diabetes*. *Diabetes Technol Ther*, 2000. **2**(3): p. 441-8.
82. Carling, D., *The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control*. *Trends Biochem Sci*, 2004. **29**(1): p. 18-24.
83. Bergeron, R., et al., *Effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside infusion on in vivo glucose and lipid metabolism in lean and obese Zucker rats*. *Diabetes*, 2001. **50**(5): p. 1076-82.
84. Andersson, U., et al., *AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(13): p. 12005-8.
85. Viollet, B., et al., *The AMP-activated protein kinase alpha2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(1): p. 91-8.
86. McCrimmon, R.J., et al., *Potential role for AMP-activated protein kinase in hypoglycemia sensing in the ventromedial hypothalamus*. *Diabetes*, 2004. **53**(8): p. 1953-8.
87. Lindsley, J.E. and J. Rutter, *Nutrient sensing and metabolic decisions*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2004. **139**(4): p. 543-59.

88. Inoki, K., J. Kim, and K.L. Guan, *AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2012. **52**: p. 381-400.
89. Dennis, P.B., et al., *Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor*. *Science*, 2001. **294**(5544): p. 1102-5.
90. Um, S.H., D. D'Alessio, and G. Thomas, *Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1*. *Cell Metab*, 2006. **3**(6): p. 393-402.
91. Rachdi, L., et al., *Disruption of Tsc2 in pancreatic beta cells induces beta cell mass expansion and improved glucose tolerance in a TORC1-dependent manner*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(27): p. 9250-5.
92. Le Bacquer, O., et al., *Elevated sensitivity to diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking 4E-BP1 and 4E-BP2*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(2): p. 387-96.
93. Koketsu, Y., et al., *Hepatic overexpression of a dominant negative form of raptor enhances Akt phosphorylation and restores insulin sensitivity in K/KAY mice*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008. **294**(4): p. E719-25.
94. Blouet, C., H. Ono, and G.J. Schwartz, *Mediobasal hypothalamic p70 S6 kinase 1 modulates the control of energy homeostasis*. *Cell Metab*, 2008. **8**(6): p. 459-67.
95. Ono, H., et al., *Activation of hypothalamic S6 kinase mediates diet-induced hepatic insulin resistance in rats*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(8): p. 2959-68.
96. Marletta, M.A., et al., *Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate*. *Biochemistry*, 1988. **27**(24): p. 8706-11.
97. Palmer, R.M., D.S. Ashton, and S. Moncada, *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine*. *Nature*, 1988. **333**(6174): p. 664-6.
98. Mayer, B., M. John, and E. Bohme, *Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin*. *FEBS Lett*, 1990. **277**(1-2): p. 215-9.
99. Bredt, D.S., et al., *Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase*. *Nature*, 1991. **351**(6329): p. 714-8.
100. Nakane, M., et al., *Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle*. *FEBS Lett*, 1993. **316**(2): p. 175-80.
101. Soret, R., et al., *Short-chain fatty acids regulate the enteric neurons and control gastrointestinal motility in rats*. *Gastroenterology*, 2010. **138**(5): p. 1772-82.
102. Forstermann, U., et al., *Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(5): p. 1788-92.
103. Dinerman, J.L., et al., *Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(10): p. 4214-8.
104. Forstermann, U. and W.C. Sessa, *Nitric oxide synthases: regulation and function*. *Eur Heart J*, 2012. **33**(7): p. 829-37, 837a-837d.
105. Shin, T., et al., *Immunohistochemical localization of endothelial and inducible nitric oxide synthase within neurons of cattle with rabies*. *J Vet Med Sci*, 2004. **66**(5): p. 539-41.
106. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. *Nature*, 1999. **399**(6736): p. 601-5.
107. Forstermann, U., et al., *Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control*. *Biochem Pharmacol*, 1995. **50**(9): p. 1321-32.
108. Gross, P.M., et al., *Neurotoxicity in conscious rats following intraventricular SNAP, a nitric oxide donor*. *Neuropharmacology*, 1994. **33**(7): p. 915-27.
109. Janero, D.R., *Nitric oxide (NO)-related pharmaceuticals: contemporary approaches to therapeutic NO modulation*. *Free Radic Biol Med*, 2000. **28**(10): p. 1495-506.
110. Wood, J. and J. Garthwaite, *Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties*. *Neuropharmacology*, 1994. **33**(11): p. 1235-44.

111. Fernhoff, N.B., E.R. Derbyshire, and M.A. Marletta, *A nitric oxide/cysteine interaction mediates the activation of soluble guanylate cyclase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(51): p. 21602-7.
112. Ignarro, L.J., et al., *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9265-9.
113. Azuma, H., M. Ishikawa, and S. Sekizaki, *Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation*. Br J Pharmacol, 1986. **88**(2): p. 411-5.
114. Horton, R.A., et al., *Inhibition of hepatic gluconeogenesis by nitric oxide: a comparison with endotoxic shock*. Biochem J, 1994. **299** (Pt 3): p. 735-9.
115. Sprangers, F., et al., *Nitric oxide inhibits glycogen synthesis in isolated rat hepatocytes*. Biochem J, 1998. **330** (Pt 2): p. 1045-9.
116. Monti, L.D., et al., *Effects of endothelin-1 and nitric oxide on glucokinase activity in isolated rat hepatocytes*. Metabolism, 2000. **49**(1): p. 73-80.
117. Balon, T.W. and J.L. Nadler, *Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle*. J Appl Physiol (1985), 1997. **82**(1): p. 359-63.
118. Young, M.E. and B. Leighton, *Fuel oxidation in skeletal muscle is increased by nitric oxide/cGMP--evidence for involvement of cGMP-dependent protein kinase*. FEBS Lett, 1998. **424**(1-2): p. 79-83.
119. Baron, A.D., et al., *Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation contributes to both insulin sensitivity and responsiveness in lean humans*. J Clin Invest, 1995. **96**(2): p. 786-92.
120. Tanaka, T., et al., *Nitric oxide stimulates glucose transport through insulin-independent GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes*. Eur J Endocrinol, 2003. **149**(1): p. 61-7.
121. Fu, W.J., et al., *Dietary L-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats*. J Nutr, 2005. **135**(4): p. 714-21.
122. Chandrasekharan, B. and S. Srinivasan, *Diabetes and the enteric nervous system*. Neurogastroenterol Motil, 2007. **19**(12): p. 951-60.
123. Cabou, C., et al., *Central insulin regulates heart rate and arterial blood flow: an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism altered during diabetes*. Diabetes, 2007. **56**(12): p. 2872-7.
124. Gutteridge, J.M. and B. Halliwell, *Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **899**: p. 136-47.
125. Bashan, N., et al., *Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species*. Physiol Rev, 2009. **89**(1): p. 27-71.
126. Lambeth, J.D., *NOX enzymes and the biology of reactive oxygen*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 181-9.
127. Hordijk, P.L., *Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins*. Circ Res, 2006. **98**(4): p. 453-62.
128. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.
129. Jones, D.P., *Redefining oxidative stress*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(9-10): p. 1865-79.
130. Nemoto, S., et al., *Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(19): p. 7311-8.
131. Mahadev, K., et al., *The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(5): p. 1844-54.
132. Drougard, A., et al., *Impact of hypothalamic reactive oxygen species in the regulation of energy metabolism and food intake*. Front Neurosci, 2015. **9**: p. 56.
133. Leloup, C., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing*. Diabetes, 2006. **55**(7): p. 2084-90.
134. Monteiro, R. and I. Azevedo, *Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome*. Mediators Inflamm, 2010. **2010**.

135. Colombani, A.L., et al., *Enhanced hypothalamic glucose sensing in obesity: alteration of redox signaling*. *Diabetes*, 2009. **58**(10): p. 2189-97.
136. Cotero, V.E., B.B. Zhang, and V.H. Routh, *The response of glucose-excited neurones in the ventromedial hypothalamus to decreased glucose is enhanced in a murine model of type 2 diabetes mellitus*. *J Neuroendocrinol*, 2010. **22**(2): p. 65-74.
137. Martin, T.L., et al., *Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(28): p. 18933-41.
138. Cota, D., et al., *The role of hypothalamic mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in diet-induced obesity*. *J Neurosci*, 2008. **28**(28): p. 7202-8.
139. Shankar, R., et al., *Central nervous system nitric oxide synthase activity regulates insulin secretion and insulin action*. *J Clin Invest*, 1998. **102**(7): p. 1403-12.
140. Sadler, C.J. and J.P. Wilding, *Reduced ventromedial hypothalamic neuronal nitric oxide synthase and increased sensitivity to NOS inhibition in dietary obese rats: further evidence of a role for nitric oxide in the regulation of energy balance*. *Brain Res*, 2004. **1016**(2): p. 222-8.
141. Shaw, R.J., et al., *The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin*. *Science*, 2005. **310**(5754): p. 1642-6.
142. Kim, Y.D., et al., *Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through AMP-activated protein kinase-dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP*. *Diabetes*, 2008. **57**(2): p. 306-14.
143. Foretz, M., et al., *Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(7): p. 2355-69.
144. Miller, R.A., et al., *Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP*. *Nature*, 2013. **494**(7436): p. 256-60.
145. Wiernsperger, N.F. and C.J. Bailey, *The antihyperglycaemic effect of metformin: therapeutic and cellular mechanisms*. *Drugs*, 1999. **58 Suppl 1**: p. 31-9; discussion 75-82.
146. Musi, N., et al., *Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2002. **51**(7): p. 2074-81.
147. Duca, F.A., et al., *Glucoregulatory Relevance of Small Intestinal Nutrient Sensing in Physiology, Bariatric Surgery, and Pharmacology*. *Cell Metab*, 2015. **22**(3): p. 367-80.
148. Shah, M., et al., *Contribution of endogenous glucagon-like peptide 1 to glucose metabolism after Roux-en-Y gastric bypass*. *Diabetes*, 2014. **63**(2): p. 483-93.
149. Ley, R.E., et al., *Obesity alters gut microbial ecology*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(31): p. 11070-5.
150. Ley, R.E., et al., *Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity*. *Nature*, 2006. **444**(7122): p. 1022-3.
151. Backhed, F., et al., *The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(44): p. 15718-23.
152. Backhed, F., et al., *Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(3): p. 979-84.
153. Turnbaugh, P.J., et al., *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*. *Nature*, 2006. **444**(7122): p. 1027-31.
154. Cani, P.D., et al., *Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance*. *Diabetes*, 2007. **56**(7): p. 1761-72.
155. Cani, P.D., et al., *Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice*. *Diabetes*, 2008. **57**(6): p. 1470-81.
156. Cani, P.D. and N.M. Delzenne, *The gut microbiome as therapeutic target*. *Pharmacol Ther*, 2011. **130**(2): p. 202-12.
157. Delzenne, N.M., et al., *Gut microorganisms as promising targets for the management of type 2 diabetes*. *Diabetologia*, 2015. **58**(10): p. 2206-17.

158. Everard, A., et al., *Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(22): p. 9066-71.
159. Kovatcheva-Datchary, P., et al., *Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of Prevotella*. Cell Metab, 2015. **22**(6): p. 971-82.
160. Niess, J.H. and H.C. Reinecker, *Dendritic cells in the recognition of intestinal microbiota*. Cell Microbiol, 2006. **8**(4): p. 558-64.
161. Okamoto, R. and M. Watanabe, *Molecular and clinical basis for the regeneration of human gastrointestinal epithelia*. J Gastroenterol, 2004. **39**(1): p. 1-6.
162. Ugolev, A.M., et al., *Membrane and intracellular hydrolysis of peptides: differentiation, role and interrelations with transport*. Ciba Found Symp, 1977(50): p. 221-43.
163. Shan, M., et al., *Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals*. Science, 2013. **342**(6157): p. 447-53.
164. Breer, H., et al., *Gastrointestinal chemosensation: chemosensory cells in the alimentary tract*. Histochem Cell Biol, 2012. **138**(1): p. 13-24.
165. Bayliss, W.M. and E.H. Starling, *The movements and innervation of the small intestine*. J Physiol, 1899. **24**(2): p. 99-143.
166. Cooke, H.J., Y.Z. Wang, and R. Rogers, *Coordination of Cl⁻ secretion and contraction by a histamine H₂-receptor agonist in guinea pig distal colon*. Am J Physiol, 1993. **265**(5 Pt 1): p. G973-8.
167. Beck, M., et al., *ChAT and NOS in human myenteric neurons: co-existence and co-absence*. Cell Tissue Res, 2009. **338**(1): p. 37-51.
168. Hansen, M.B., *Neurohumoral control of gastrointestinal motility*. Physiol Res, 2003. **52**(1): p. 1-30.
169. Kunze, W.A. and J.B. Furness, *The enteric nervous system and regulation of intestinal motility*. Annu Rev Physiol, 1999. **61**: p. 117-42.
170. Clerc, N. and J.B. Furness, *Intrinsic primary afferent neurones of the digestive tract*. Neurogastroenterol Motil, 2004. **16 Suppl 1**: p. 24-7.
171. Gershon, M.D., *Nerves, reflexes, and the enteric nervous system: pathogenesis of the irritable bowel syndrome*. J Clin Gastroenterol, 2005. **39**(5 Suppl 3): p. S184-93.
172. Kirchgessner, A.L., H. Tamir, and M.D. Gershon, *Identification and stimulation by serotonin of intrinsic sensory neurons of the submucosal plexus of the guinea pig gut: activity-induced expression of Fos immunoreactivity*. J Neurosci, 1992. **12**(1): p. 235-48.
173. Tonini, M. and M. Costa, *A pharmacological analysis of the neuronal circuitry involved in distension-evoked enteric excitatory reflex*. Neuroscience, 1990. **38**(3): p. 787-95.
174. Furness, J.B., *Types of neurons in the enteric nervous system*. J Auton Nerv Syst, 2000. **81**(1-3): p. 87-96.
175. Hansen, M.B., *The enteric nervous system I: organisation and classification*. Pharmacol Toxicol, 2003. **92**(3): p. 105-13.
176. Brierley, S.M. and D.R. Linden, *Neuroplasticity and dysfunction after gastrointestinal inflammation*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2014. **11**(10): p. 611-27.
177. Hoff, S., et al., *Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody*. J Comp Neurol, 2008. **509**(4): p. 356-71.
178. Cabarrocas, J., T.C. Savidge, and R.S. Liblau, *Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease*. Glia, 2003. **41**(1): p. 81-93.
179. Ruhl, A., *Glial cells in the gut*. Neurogastroenterol Motil, 2005. **17**(6): p. 777-90.
180. Bush, T.G., et al., *Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice*. Cell, 1998. **93**(2): p. 189-201.
181. Bar, K.J., et al., *Glial-derived neurotrophic factor in human adult and fetal intestine and in Hirschsprung's disease*. Gastroenterology, 1997. **112**(4): p. 1381-5.
182. Nagahama, M., et al., *L-arginine immunoreactive enteric glial cells in the enteric nervous system of rat ileum*. Biol Signals Recept, 2001. **10**(5): p. 336-40.

183. Savidge, T.C., M.V. Sofroniew, and M. Neunlist, *Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain*. Lab Invest, 2007. **87**(8): p. 731-6.
184. Iino, S. and K. Horiguchi, *Interstitial cells of cajal are involved in neurotransmission in the gastrointestinal tract*. Acta Histochem Cytochem, 2006. **39**(6): p. 145-53.
185. Ward, S.M., K.M. Sanders, and G.D. Hirst, *Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles*. Neurogastroenterol Motil, 2004. **16 Suppl 1**: p. 112-7.
186. Burns, A.J., et al., *Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the stomach*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 12008-13.
187. Salmhofer, H., et al., *Pivotal role of the interstitial cells of Cajal in the nitric oxide signaling pathway of rat small intestine. Morphological evidence*. Cell Tissue Res, 2001. **305**(3): p. 331-40.
188. Brookes, S.J., et al., *Extrinsic primary afferent signalling in the gut*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013. **10**(5): p. 286-96.
189. Gray, G.M., *Starch digestion and absorption in nonruminants*. J Nutr, 1992. **122**(1): p. 172-7.
190. Levin, R.J., *Digestion and absorption of carbohydrates--from molecules and membranes to humans*. Am J Clin Nutr, 1994. **59**(3 Suppl): p. 690S-698S.
191. Luttikhold, J., et al., *Review article: the role of gastrointestinal hormones in the treatment of delayed gastric emptying in critically ill patients*. Aliment Pharmacol Ther, 2013. **38**(6): p. 573-83.
192. Chandra, R. and R.A. Liddle, *Recent advances in the regulation of pancreatic secretion*. Curr Opin Gastroenterol, 2014. **30**(5): p. 490-4.
193. Chandra, R. and R.A. Liddle, *Neural and hormonal regulation of pancreatic secretion*. Curr Opin Gastroenterol, 2009. **25**(5): p. 441-6.
194. Chey, W.Y. and T. Chang, *Neural hormonal regulation of exocrine pancreatic secretion*. Pancreatology, 2001. **1**(4): p. 320-35.
195. Ferraris, R.P., *Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport*. Biochem J, 2001. **360**(Pt 2): p. 265-76.
196. Wright, E.M., M.G. Martin, and E. Turk, *Intestinal absorption in health and disease--sugars*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2003. **17**(6): p. 943-56.
197. Guilmeau, S., M. Buyse, and A. Bado, *Gastric leptin: a new manager of gastrointestinal function*. Curr Opin Pharmacol, 2004. **4**(6): p. 561-6.
198. Ducroc, R., et al., *Luminal leptin induces rapid inhibition of active intestinal absorption of glucose mediated by sodium-glucose cotransporter 1*. Diabetes, 2005. **54**(2): p. 348-54.
199. Debnam, E.S. and R.J. Levin, *An experimental method of identifying and quantifying the active transfer electrogenic component from the diffusive component during sugar absorption measured in vivo*. J Physiol, 1975. **246**(1): p. 181-96.
200. Kellett, G.L. and E. Brot-Laroche, *Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption*. Diabetes, 2005. **54**(10): p. 3056-62.
201. Kellett, G.L., et al., *Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2*. Annu Rev Nutr, 2008. **28**: p. 35-54.
202. Tobin, V., et al., *Insulin internalizes GLUT2 in the enterocytes of healthy but not insulin-resistant mice*. Diabetes, 2008. **57**(3): p. 555-62.
203. Stumpel, F., et al., *Normal kinetics of intestinal glucose absorption in the absence of GLUT2: evidence for a transport pathway requiring glucose phosphorylation and transfer into the endoplasmic reticulum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11330-5.
204. Santer, R., et al., *Intestinal glucose transport: evidence for a membrane traffic-based pathway in humans*. Gastroenterology, 2003. **124**(1): p. 34-9.
205. Riesenfeld, G., et al., *Glucose absorption and starch digestion in the intestine of the chicken*. J Nutr, 1980. **110**(1): p. 117-21.
206. Camacho, R.C., et al., *Portal venous hyperinsulinemia does not stimulate gut glucose absorption in the conscious dog*. Metabolism, 2004. **53**(10): p. 1290-5.

207. Kim, H.R., et al., *Comparative gene expression profiles of intestinal transporters in mice, rats and humans*. *Pharmacol Res*, 2007. **56**(3): p. 224-36.
208. Vantrappen, G., et al., *The interdigestive motor complex of normal subjects and patients with bacterial overgrowth of the small intestine*. *J Clin Invest*, 1977. **59**(6): p. 1158-66.
209. Takahashi, T., *Interdigestive migrating motor complex -its mechanism and clinical importance*. *J Smooth Muscle Res*, 2013. **49**: p. 99-111.
210. Deloof, E., et al., *The migrating motor complex: control mechanisms and its role in health and disease*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012. **9**(5): p. 271-85.
211. Takakuwa, K., *[Effects of vagotomy on gastrointestinal myoelectric pattern of the conscious dog]*. *Nihon Heikatsukin Gakkai Zasshi*, 1982. **18**(1): p. 19-38.
212. Sarna, S., et al., *Intrinsic nervous control of migrating myoelectric complexes*. *Am J Physiol*, 1981. **241**(1): p. G16-23.
213. Code, C.F. and J.A. Marlett, *The interdigestive myo-electric complex of the stomach and small bowel of dogs*. *J Physiol*, 1975. **246**(2): p. 289-309.
214. Cannon, W.B., *The Movements of the Intestines studied by Means of the Rontgen Rays*. *J Med Res*, 1902. **7**(1): p. 72-5.
215. Hansen, M.B., *The enteric nervous system II: gastrointestinal functions*. *Pharmacol Toxicol*, 2003. **92**(6): p. 249-57.
216. Barrett, B., et al., *Ganong's Review of Medical Physiology*. a LANGE medical book, 2010. **23 rd edition**
217. Gwynne, R.M., et al., *Segmentation induced by intraluminal fatty acid in isolated guinea-pig duodenum and jejunum*. *J Physiol*, 2004. **556**(Pt 2): p. 557-69.
218. Ellis, M., et al., *Serotonin and cholecystokinin mediate nutrient-induced segmentation in guinea pig small intestine*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2013. **304**(8): p. G749-61.
219. Schemann, M. and H.J. Ehrlein, *Postprandial patterns of canine jejunal motility and transit of luminal content*. *Gastroenterology*, 1986. **90**(4): p. 991-1000.
220. Siegle, M.L. and H.J. Ehrlein, *Digestive motor patterns and transit of luminal contents in canine ileum*. *Am J Physiol*, 1988. **254**(4 Pt 1): p. G552-9.
221. Sarr, M.G. and K.A. Kelly, *Myoelectric activity of the autotransplanted canine jejunoileum*. *Gastroenterology*, 1981. **81**(2): p. 303-10.
222. Chung, S.A., D.T. Valdez, and N.E. Diamant, *Adrenergic blockage does not restore the canine gastric migrating motor complex during vagal blockade*. *Gastroenterology*, 1992. **103**(5): p. 1491-7.
223. Sarna, S.K., *Giant migrating contractions and their myoelectric correlates in the small intestine*. *Am J Physiol*, 1987. **253**(5 Pt 1): p. G697-705.
224. Read, N.W. and L.A. Houghton, *Physiology of gastric emptying and pathophysiology of gastroparesis*. *Gastroenterol Clin North Am*, 1989. **18**(2): p. 359-73.
225. Oesch, S., et al., *Effect of gastric distension prior to eating on food intake and feelings of satiety in humans*. *Physiol Behav*, 2006. **87**(5): p. 903-10.
226. Lee, K.J., et al., *Differences in the sensorimotor response to distension between the proximal and distal stomach in humans*. *Gut*, 2004. **53**(7): p. 938-43.
227. Rigaud, D., et al., *Gastric distension, hunger and energy intake after balloon implantation in severe obesity*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1995. **19**(7): p. 489-95.
228. Sabbatini, M., et al., *The pattern of c-Fos immunoreactivity in the hindbrain of the rat following stomach distension*. *Exp Brain Res*, 2004. **157**(3): p. 315-23.
229. Grundy, D., *Neuroanatomy of visceral nociception: vagal and splanchnic afferent*. *Gut*, 2002. **51 Suppl 1**: p. i2-5.
230. Powley, T.L., *The ventromedial hypothalamic syndrome, satiety, and a cephalic phase hypothesis*. *Psychol Rev*, 1977. **84**(1): p. 89-126.
231. Date, Y., et al., *Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans*. *Endocrinology*, 2000. **141**(11): p. 4255-61.

232. Ariyasu, H., et al., *Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(10): p. 4753-8.
233. Kojima, M., et al., *Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach*. Nature, 1999. **402**(6762): p. 656-60.
234. Huda, M.S., J.P. Wilding, and J.H. Pinkney, *Gut peptides and the regulation of appetite*. Obes Rev, 2006. **7**(2): p. 163-82.
235. Date, Y., et al., *The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats*. Gastroenterology, 2002. **123**(4): p. 1120-8.
236. Guan, X.M., et al., *Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues*. Brain Res Mol Brain Res, 1997. **48**(1): p. 23-9.
237. Willesen, M.G., P. Kristensen, and J. Romer, *Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat*. Neuroendocrinology, 1999. **70**(5): p. 306-16.
238. Wren, A.M., et al., *Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(12): p. 5992.
239. Wren, A.M., et al., *The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion*. Endocrinology, 2000. **141**(11): p. 4325-8.
240. Cummings, D.E., *Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight*. Physiol Behav, 2006. **89**(1): p. 71-84.
241. Dong, J., et al., *Role of endogenous ghrelin in the hyperphagia of mice with streptozotocin-induced diabetes*. Endocrinology, 2006. **147**(6): p. 2634-42.
242. Sun, Y., et al., *Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice*. Cell Metab, 2006. **3**(5): p. 379-86.
243. Kojima, M. and K. Kangawa, *Ghrelin: structure and function*. Physiol Rev, 2005. **85**(2): p. 495-522.
244. Hewson, A.K. and S.L. Dickson, *Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats*. J Neuroendocrinol, 2000. **12**(11): p. 1047-9.
245. Nakazato, M., et al., *A role for ghrelin in the central regulation of feeding*. Nature, 2001. **409**(6817): p. 194-8.
246. Banks, W.A., et al., *Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **302**(2): p. 822-7.
247. Buchan, A.M., et al., *Electron immunohistochemical evidence for the human intestinal I cell as the source of CCK*. Gut, 1978. **19**(5): p. 403-7.
248. Rehfeld, J.F., *Immunochemical studies on cholecystokinin. II. Distribution and molecular heterogeneity in the central nervous system and small intestine of man and hog*. J Biol Chem, 1978. **253**(11): p. 4022-30.
249. Lewis, L.D. and J.A. Williams, *Regulation of cholecystokinin secretion by food, hormones, and neural pathways in the rat*. Am J Physiol, 1990. **258**(4 Pt 1): p. G512-8.
250. Matozaki, T., et al., *G protein in stimulation of PI hydrolysis by CCK in isolated rat pancreatic acinar cells*. Am J Physiol, 1988. **255**(5 Pt 1): p. E652-9.
251. Honda, T., et al., *Differential Gene Expression of CCK(A) and CCK(B) Receptors in the Rat Brain*. Mol Cell Neurosci, 1993. **4**(2): p. 143-54.
252. Sankaran, H., et al., *Binding of cholecystokinin to high affinity receptors on isolated rat pancreatic acini*. J Biol Chem, 1980. **255**(5): p. 1849-53.
253. Lloyd, K.C., H.E. Raybould, and J.H. Walsh, *Cholecystokinin inhibits gastric acid secretion through type "A" cholecystokinin receptors and somatostatin in rats*. Am J Physiol, 1992. **263**(3 Pt 1): p. G287-92.
254. Bitar, K.N. and G.M. Makhlof, *Receptors on smooth muscle cells: characterization by contraction and specific antagonists*. Am J Physiol, 1982. **242**(4): p. G400-7.

255. Wank, S.A., *G protein-coupled receptors in gastrointestinal physiology. I. CCK receptors: an exemplary family*. Am J Physiol, 1998. **274**(4 Pt 1): p. G607-13.
256. Bi, S. and T.H. Moran, *Actions of CCK in the controls of food intake and body weight: lessons from the CCK-A receptor deficient OLETF rat*. Neuropeptides, 2002. **36**(2-3): p. 171-81.
257. Gibbs, J., R.C. Young, and G.P. Smith, *Cholecystokinin decreases food intake in rats*. 1973. Obes Res, 1997. **5**(3): p. 284-90.
258. Smith, G.P., et al., *Abdominal vagotomy blocks the satiety effect of cholecystokinin in the rat*. Science, 1981. **213**(4511): p. 1036-7.
259. Ritter, R.C., et al., *Capsaicin attenuates hindbrain neuron responses to circulating cholecystokinin*. Am J Physiol, 1989. **257**(5 Pt 2): p. R1162-8.
260. Day, H.E., et al., *Evidence that cholecystokinin induces immediate early gene expression in the brainstem, hypothalamus and amygdala of the rat by a CCKA receptor mechanism*. Neuropharmacology, 1994. **33**(6): p. 719-27.
261. Chen, D.Y., et al., *The induction and suppression of c-fos expression in the rat brain by cholecystokinin and its antagonist L364,718*. Neurosci Lett, 1993. **149**(1): p. 91-4.
262. Drucker, D.J., *The biology of incretin hormones*. Cell Metab, 2006. **3**(3): p. 153-65.
263. Tang-Christensen, M., et al., *Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats*. Am J Physiol, 1996. **271**(4 Pt 2): p. R848-56.
264. Turton, M.D., et al., *A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding*. Nature, 1996. **379**(6560): p. 69-72.
265. Meeran, K., et al., *Repeated intracerebroventricular administration of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide or exendin-(9-39) alters body weight in the rat*. Endocrinology, 1999. **140**(1): p. 244-50.
266. Abbott, C.R., et al., *The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY(3-36) and glucagon-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem-hypothalamic pathway*. Brain Res, 2005. **1044**(1): p. 127-31.
267. Batterham, R.L. and S.R. Bloom, *The gut hormone peptide YY regulates appetite*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **994**: p. 162-8.
268. Persaud, S.J. and G.A. Bewick, *Peptide YY: more than just an appetite regulator*. Diabetologia, 2014. **57**(9): p. 1762-9.
269. Abbott, C.R., et al., *Blockade of the neuropeptide YY2 receptor with the specific antagonist BIIIE0246 attenuates the effect of endogenous and exogenous peptide YY(3-36) on food intake*. Brain Res, 2005. **1043**(1-2): p. 139-44.
270. Batterham, R.L., et al., *Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake*. Nature, 2002. **418**(6898): p. 650-4.
271. Maljaars, P.W., et al., *Ileal brake: a sensible food target for appetite control. A review*. Physiol Behav, 2008. **95**(3): p. 271-81.
272. Welch, I., K. Saunders, and N.W. Read, *Effect of ileal and intravenous infusions of fat emulsions on feeding and satiety in human volunteers*. Gastroenterology, 1985. **89**(6): p. 1293-7.
273. Welch, I.M., C.P. Sepple, and N.W. Read, *Comparisons of the effects on satiety and eating behaviour of infusion of lipid into the different regions of the small intestine*. Gut, 1988. **29**(3): p. 306-11.
274. Meyer, J.H., et al., *Chemical specificities and intestinal distributions of nutrient-driven satiety*. Am J Physiol, 1998. **275**(4 Pt 2): p. R1293-307.
275. Spiller, R.C., et al., *Further characterisation of the 'ileal brake' reflex in man--effect of ileal infusion of partial digests of fat, protein, and starch on jejunal motility and release of neurotensin, enteroglucagon, and peptide YY*. Gut, 1988. **29**(8): p. 1042-51.
276. Pironi, L., et al., *Fat-induced ileal brake in humans: a dose-dependent phenomenon correlated to the plasma levels of peptide YY*. Gastroenterology, 1993. **105**(3): p. 733-9.
277. Lin, H.C., et al., *Fat-induced ileal brake in the dog depends on peptide YY*. Gastroenterology, 1996. **110**(5): p. 1491-5.

278. Giralt, M. and P. Vergara, *Glucagonlike peptide-1 (GLP-1) participation in ileal brake induced by intraluminal peptones in rat*. *Dig Dis Sci*, 1999. **44**(2): p. 322-9.
279. Wettergren, A., et al., *Glucagon-like peptide-1 7-36 amide and peptide YY have additive inhibitory effect on gastric acid secretion in man*. *Scand J Gastroenterol*, 1997. **32**(6): p. 552-5.
280. Neary, N.M., et al., *Peptide YY3-36 and glucagon-like peptide-17-36 inhibit food intake additively*. *Endocrinology*, 2005. **146**(12): p. 5120-7.
281. Sarr, M.G., et al., *Role of extrinsic innervation in carbohydrate-induced ileal modulation of pancreatic secretion and upper gut function*. *Pancreas*, 1997. **14**(2): p. 166-73.
282. Flier, J.S., *Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic*. *Cell*, 2004. **116**(2): p. 337-50.
283. Friedman, J.M., *Obesity in the new millennium*. *Nature*, 2000. **404**(6778): p. 632-4.
284. Mithieux, G., et al., *Portal sensing of intestinal gluconeogenesis is a mechanistic link in the diminution of food intake induced by diet protein*. *Cell Metab*, 2005. **2**(5): p. 321-9.
285. Mithieux, G., et al., *Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004. **286**(3): p. E370-5.
286. Mithieux, G., *A novel function of intestinal gluconeogenesis: central signaling in glucose and energy homeostasis*. *Nutrition*, 2009. **25**(9): p. 881-4.
287. Duraffourd, C., et al., *Mu-opioid receptors and dietary protein stimulate a gut-brain neural circuitry limiting food intake*. *Cell*, 2012. **150**(2): p. 377-88.
288. Burcelin, R., W. Dolci, and B. Thorens, *Glucose sensing by the hepatoportal sensor is GLUT2-dependent: in vivo analysis in GLUT2-null mice*. *Diabetes*, 2000. **49**(10): p. 1643-8.
289. Delaere, F., et al., *The role of sodium-coupled glucose co-transporter 3 in the satiety effect of portal glucose sensing*. *Mol Metab*, 2012. **2**(1): p. 47-53.
290. Fournel, A., et al., *Glucosensing in the gastrointestinal tract: Impact on glucose metabolism*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2016: p. ajpgi 00015 2016.
291. Mei, N., *Intestinal chemosensitivity*. *Physiol Rev*, 1985. **65**(2): p. 211-37.
292. Hofer, D., B. Puschel, and D. Drenckhahn, *Taste receptor-like cells in the rat gut identified by expression of alpha-gustducin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(13): p. 6631-4.
293. Mace, O.J., et al., *Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2*. *J Physiol*, 2007. **582**(Pt 1): p. 379-92.
294. Sayegh, A.I., M. Covasa, and R.C. Ritter, *Intestinal infusions of oleate and glucose activate distinct enteric neurons in the rat*. *Auton Neurosci*, 2004. **115**(1-2): p. 54-63.
295. Richards, P., et al., *Identification and characterization of GLP-1 receptor-expressing cells using a new transgenic mouse model*. *Diabetes*, 2014. **63**(4): p. 1224-33.
296. Liu, M., S. Seino, and A.L. Kirchgessner, *Identification and characterization of glucoresponsive neurons in the enteric nervous system*. *J Neurosci*, 1999. **19**(23): p. 10305-17.
297. Diez-Sampedro, A., et al., *A glucose sensor hiding in a family of transporters*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(20): p. 11753-8.
298. Baraboi, E.D., et al., *Brain activation following peripheral administration of the GLP-1 receptor agonist exendin-4*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011. **301**(4): p. R1011-24.
299. Knauf, C., et al., *Brain glucagon-like peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(12): p. 3554-63.
300. Knauf, C., et al., *Role of central nervous system glucagon-like Peptide-1 receptors in enteric glucose sensing*. *Diabetes*, 2008. **57**(10): p. 2603-12.
301. Duparc, T., et al., *Jejunum inflammation in obese and diabetic mice impairs enteric glucose detection and modifies nitric oxide release in the hypothalamus*. *Antioxid Redox Signal*, 2011. **14**(3): p. 415-23.
302. Duparc, T., et al., *Central apelin controls glucose homeostasis via a nitric oxide-dependent pathway in mice*. *Antioxid Redox Signal*, 2011. **15**(6): p. 1477-96.

303. Kaser, A., et al., *XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease*. Cell, 2008. **134**(5): p. 743-56.
304. Ding, S., et al., *High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12191.
305. Dickhout, J.G., et al., *Integrated stress response modulates cellular redox state via induction of cystathionine gamma-lyase: cross-talk between integrated stress response and thiol metabolism*. J Biol Chem, 2012. **287**(10): p. 7603-14.
306. Circu, M.L. and T.Y. Aw, *Redox biology of the intestine*. Free Radic Res, 2011. **45**(11-12): p. 1245-66.
307. Troy, S., et al., *Intestinal gluconeogenesis is a key factor for early metabolic changes after gastric bypass but not after gastric lap-band in mice*. Cell Metab, 2008. **8**(3): p. 201-11.
308. Pories, W.J., et al., *Who would have thought it? An operation proves to be the most effective therapy for adult-onset diabetes mellitus*. Ann Surg, 1995. **222**(3): p. 339-50; discussion 350-2.
309. Mithieux, G., *Nutrient control of energy homeostasis via gut-brain neural circuits*. Neuroendocrinology, 2014. **100**(2-3): p. 89-94.
310. Cheung, G.W., et al., *Intestinal cholecystokinin controls glucose production through a neuronal network*. Cell Metab, 2009. **10**(2): p. 99-109.
311. Wang, P.Y., et al., *Upper intestinal lipids trigger a gut-brain-liver axis to regulate glucose production*. Nature, 2008. **452**(7190): p. 1012-6.
312. Lam, T.K., *Neuronal regulation of homeostasis by nutrient sensing*. Nat Med, 2010. **16**(4): p. 392-5.
313. Cummings, D.E. and J. Overduin, *Gastrointestinal regulation of food intake*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 13-23.
314. Chang, C.H., W.Y. Chey, and T.M. Chang, *Cellular mechanism of sodium oleate-stimulated secretion of cholecystokinin and secretin*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. **279**(2): p. G295-303.
315. Takahashi, A., et al., *Involvement of calmodulin and protein kinase C in cholecystokinin release by bombesin from STC-1 cells*. Pancreas, 2000. **21**(3): p. 231-9.
316. Kokorovic, A., et al., *Duodenal mucosal protein kinase C-delta regulates glucose production in rats*. Gastroenterology, 2011. **141**(5): p. 1720-7.
317. Breen, D.M., et al., *Duodenal PKC-delta and cholecystokinin signaling axis regulates glucose production*. Diabetes, 2011. **60**(12): p. 3148-53.
318. Broberger, C., et al., *Expression and regulation of cholecystokinin and cholecystokinin receptors in rat nodose and dorsal root ganglia*. Brain Res, 2001. **903**(1-2): p. 128-40.
319. Schwartz, G.J., *Gut fat sensing in the negative feedback control of energy balance--recent advances*. Physiol Behav, 2011. **104**(4): p. 621-3.
320. Breen, D.M., et al., *Jejunal nutrient sensing is required for duodenal-jejunal bypass surgery to rapidly lower glucose concentrations in uncontrolled diabetes*. Nat Med, 2012. **18**(6): p. 950-5.
321. O'Dowd, B.F., et al., *A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11*. Gene, 1993. **136**(1-2): p. 355-60.
322. De Mota, N., Z. Lenkei, and C. Llorens-Cortes, *Cloning, pharmacological characterization and brain distribution of the rat apelin receptor*. Neuroendocrinology, 2000. **72**(6): p. 400-7.
323. Pitkin, S.L., et al., *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIV. Apelin receptor nomenclature, distribution, pharmacology, and function*. Pharmacol Rev, 2010. **62**(3): p. 331-42.
324. Lee, D.K., et al., *Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor*. J Neurochem, 2000. **74**(1): p. 34-41.

325. O'Carroll, A.M., et al., *Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues.* Biochim Biophys Acta, 2000. **1492**(1): p. 72-80.
326. Pope, G.R., et al., *Central and peripheral apelin receptor distribution in the mouse: species differences with rat.* Peptides, 2012. **33**(1): p. 139-48.
327. Reaux, A., et al., *Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain.* J Neurochem, 2001. **77**(4): p. 1085-96.
328. Medhurst, A.D., et al., *Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin.* J Neurochem, 2003. **84**(5): p. 1162-72.
329. Hosoya, M., et al., *Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin.* J Biol Chem, 2000. **275**(28): p. 21061-7.
330. Tatemoto, K., et al., *Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor.* Biochem Biophys Res Commun, 1998. **251**(2): p. 471-6.
331. Klein, M.J. and A.P. Davenport, *Emerging roles of apelin in biology and medicine.* Pharmacol Ther, 2005. **107**(2): p. 198-211.
332. Japp, A.G., et al., *Acute cardiovascular effects of apelin in humans: potential role in patients with chronic heart failure.* Circulation, 2010. **121**(16): p. 1818-27.
333. Ladeiras-Lopes, R., J. Ferreira-Martins, and A.F. Leite-Moreira, *The apelinergic system: the role played in human physiology and pathology and potential therapeutic applications.* Arq Bras Cardiol, 2008. **90**(5): p. 343-9.
334. Chaves-Almagro, C., et al., *Apelin receptors: From signaling to antidiabetic strategy.* Eur J Pharmacol, 2015. **763**(Pt B): p. 149-59.
335. Kawamata, Y., et al., *Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding.* Biochim Biophys Acta, 2001. **1538**(2-3): p. 162-71.
336. Maguire, J.J., et al., *[Pyr1]apelin-13 identified as the predominant apelin isoform in the human heart: vasoactive mechanisms and inotropic action in disease.* Hypertension, 2009. **54**(3): p. 598-604.
337. Azizi, M., et al., *Reciprocal regulation of plasma apelin and vasopressin by osmotic stimuli.* J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(5): p. 1015-24.
338. Miettinen, K.H., et al., *Utility of plasma apelin and other indices of cardiac dysfunction in the clinical assessment of patients with dilated cardiomyopathy.* Regul Pept, 2007. **140**(3): p. 178-84.
339. De Mota, N., et al., *Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(28): p. 10464-9.
340. Reaux-Le Goazigo, A., et al., *Apelin and the proopiomelanocortin system: a new regulatory pathway of hypothalamic alpha-MSH release.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011. **301**(5): p. E955-66.
341. Reaux-Le Goazigo, A., et al., *Dehydration-induced cross-regulation of apelin and vasopressin immunoreactivity levels in magnocellular hypothalamic neurons.* Endocrinology, 2004. **145**(9): p. 4392-400.
342. Brailoiu, G.C., et al., *Apelin-immunoreactivity in the rat hypothalamus and pituitary.* Neurosci Lett, 2002. **327**(3): p. 193-7.
343. Bodineau, L., et al., *Data supporting a new physiological role for brain apelin in the regulation of hypothalamic oxytocin neurons in lactating rats.* Endocrinology, 2011. **152**(9): p. 3492-503.
344. Boucher, J., et al., *Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity.* Endocrinology, 2005. **146**(4): p. 1764-71.
345. Dray, C., et al., *Apelin and APJ regulation in adipose tissue and skeletal muscle of type 2 diabetic mice and humans.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**(6): p. E1161-9.
346. Glassford, A.J., et al., *HIF-1 regulates hypoxia- and insulin-induced expression of apelin in adipocytes.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **293**(6): p. E1590-6.

347. Wei, L., X. Hou, and K. Tatemoto, *Regulation of apelin mRNA expression by insulin and glucocorticoids in mouse 3T3-L1 adipocytes*. Regul Pept, 2005. **132**(1-3): p. 27-32.
348. Daviaud, D., et al., *TNFalpha up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue*. FASEB J, 2006. **20**(9): p. 1528-30.
349. Han, S., et al., *Increased colonic apelin production in rodents with experimental colitis and in humans with IBD*. Regul Pept, 2007. **142**(3): p. 131-7.
350. Han, S., et al., *Involvement of a Stat3 binding site in inflammation-induced enteric apelin expression*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008. **295**(5): p. G1068-78.
351. Bertrand, C., et al., *Effects of dietary eicosapentaenoic acid (EPA) supplementation in high-fat fed mice on lipid metabolism and apelin/APJ system in skeletal muscle*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e78874.
352. Habata, Y., et al., *Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1452**(1): p. 25-35.
353. Masri, B., et al., *Apelin (65-77) activates extracellular signal-regulated kinases via a PTX-sensitive G protein*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **290**(1): p. 539-45.
354. Sgourakis, N.G., P.G. Bagos, and S.J. Hamodrakas, *Prediction of the coupling specificity of GPCRs to four families of G-proteins using hidden Markov models and artificial neural networks*. Bioinformatics, 2005. **21**(22): p. 4101-6.
355. Szokodi, I., et al., *Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility*. Circ Res, 2002. **91**(5): p. 434-40.
356. Kang, Y., et al., *Apelin-APJ signaling is a critical regulator of endothelial MEF2 activation in cardiovascular development*. Circ Res, 2013. **113**(1): p. 22-31.
357. Dray, C., et al., *Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice*. Cell Metab, 2008. **8**(5): p. 437-45.
358. Attane, C., et al., *Apelin stimulates glucose uptake but not lipolysis in human adipose tissue ex vivo*. J Mol Endocrinol, 2011. **46**(1): p. 21-8.
359. Yue, P., et al., *Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**(1): p. E59-67.
360. Eyries, M., et al., *Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis*. Circ Res, 2008. **103**(4): p. 432-40.
361. Kidoya, H., et al., *The apelin/APJ system induces maturation of the tumor vasculature and improves the efficiency of immune therapy*. Oncogene, 2012. **31**(27): p. 3254-64.
362. Foussal, C., et al., *Activation of catalase by apelin prevents oxidative stress-linked cardiac hypertrophy*. FEBS Lett, 2010. **584**(11): p. 2363-70.
363. Dray, C., et al., *The intestinal glucose-apelin cycle controls carbohydrate absorption in mice*. Gastroenterology, 2013. **144**(4): p. 771-80.
364. Flemstrom, G., et al., *Apelin stimulation of duodenal bicarbonate secretion: feeding-dependent and mediated via apelin-induced release of enteric cholecystokinin*. Acta Physiol (Oxf), 2011. **201**(1): p. 141-50.
365. Ohno, S., et al., *Apelin-12 stimulates acid secretion through an increase of histamine release in rat stomachs*. Regul Pept, 2012. **174**(1-3): p. 71-8.
366. Wang, G., et al., *Apelin, a new enteric peptide: localization in the gastrointestinal tract, ontogeny, and stimulation of gastric cell proliferation and of cholecystokinin secretion*. Endocrinology, 2004. **145**(3): p. 1342-8.
367. Castan-Laurell, I., et al., *Apelin, diabetes, and obesity*. Endocrine, 2011. **40**(1): p. 1-9.
368. Sorhede Winzell, M., C. Magnusson, and B. Ahren, *The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice*. Regul Pept, 2005. **131**(1-3): p. 12-7.
369. Zhu, S., et al., *Apelin stimulates glucose uptake through the PI3K/Akt pathway and improves insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes*. Mol Cell Biochem, 2011. **353**(1-2): p. 305-13.

370. Higuchi, K., et al., *Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice*. *Endocrinology*, 2007. **148**(6): p. 2690-7.
371. Drougard, A., et al., *Hypothalamic apelin/reactive oxygen species signaling controls hepatic glucose metabolism in the onset of diabetes*. *Antioxid Redox Signal*, 2014. **20**(4): p. 557-73.
372. Wang, G., et al., *Ontogeny of apelin and its receptor in the rodent gastrointestinal tract*. *Regul Pept*, 2009. **158**(1-3): p. 32-9.
373. Susaki, E., et al., *Apelin cells in the rat stomach*. *Regul Pept*, 2005. **129**(1-3): p. 37-41.
374. Lambrecht, N.W., et al., *Transcriptomes of purified gastric ECL and parietal cells: identification of a novel pathway regulating acid secretion*. *Physiol Genomics*, 2006. **25**(1): p. 153-65.
375. Wattez, J.S., et al., *Apelin stimulates both cholecystokinin and glucagon-like peptide 1 secretions in vitro and in vivo in rodents*. *Peptides*, 2013. **48**: p. 134-6.
376. Sababi, M. and U.H. Bengtsson, *Enhanced intestinal motility influences absorption in anaesthetized rat*. *Acta Physiol Scand*, 2001. **172**(2): p. 115-22.
377. Postorino, A., et al., *Spontaneous electromechanical activity in the rat duodenum in vitro*. *Arch Int Physiol Biochim*, 1990. **98**(1): p. 35-40.
378. Lee, D.K., et al., *Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action*. *Endocrinology*, 2005. **146**(1): p. 231-6.
379. Cammisotto, P.G., D. Gingras, and M. Bendayan, *Transcytosis of gastric leptin through the rat duodenal mucosa*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. **293**(4): p. G773-9.
380. Bendayan, M., et al., *Biochemical and morpho-cytochemical evidence for the intestinal absorption of insulin in control and diabetic rats. Comparison between the effectiveness of duodenal and colon mucosa*. *Diabetologia*, 1994. **37**(2): p. 119-26.
381. Spencer, N.J., R.A. Bywater, and M.F. Klemm, *Effects of sympathetic nerve stimulation on membrane potential in the circular muscle layer of mouse distal colon*. *Neurogastroenterol Motil*, 1998. **10**(6): p. 543-52.
382. Neshatian, L., et al., *Ranolazine inhibits voltage-gated mechanosensitive sodium channels in human colon circular smooth muscle cells*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2015. **309**(6): p. G506-12.
383. Baud, G., et al., *Bile Diversion in Roux-en-Y Gastric Bypass Modulates Sodium-Dependent Glucose Intestinal Uptake*. *Cell Metab*, 2016.
384. Schemann, M. and G. Mazzuoli, *Multifunctional mechanosensitive neurons in the enteric nervous system*. *Auton Neurosci*, 2010. **153**(1-2): p. 21-5.
385. Mazzuoli-Weber, G. and M. Schemann, *Mechanosensitivity in the enteric nervous system*. *Front Cell Neurosci*, 2015. **9**: p. 408.
386. Scimia, M.C., et al., *APJ acts as a dual receptor in cardiac hypertrophy*. *Nature*, 2012. **488**(7411): p. 394-8.
387. Rasmussen, B.A., et al., *Jejunal leptin-PI3K signaling lowers glucose production*. *Cell Metab*, 2014. **19**(1): p. 155-61.
388. Breen, D.M., et al., *Nutrient-sensing mechanisms in the gut as therapeutic targets for diabetes*. *Diabetes*, 2013. **62**(9): p. 3005-13.
389. Sandoval, D., et al., *Impact of intestinal electrical stimulation on nutrient-induced GLP-1 secretion in vivo*. *Neurogastroenterol Motil*, 2013. **25**(8): p. 700-5.
390. Webling, K.E., et al., *Galanin receptors and ligands*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2012. **3**: p. 146.
391. Pham, T., et al., *Distribution of galanin receptor 1 immunoreactivity in the rat stomach and small intestine*. *J Comp Neurol*, 2002. **450**(3): p. 292-302.
392. Sternini, C., et al., *Role of galanin receptor 1 in peristaltic activity in the guinea pig ileum*. *Neuroscience*, 2004. **125**(1): p. 103-12.

393. Zhang, Z., et al., *Intracerebroventricular administration of galanin antagonist sustains insulin resistance in adipocytes of type 2 diabetic trained rats*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **361**(1-2): p. 213-8.
394. He, B., et al., *Beneficial effect of galanin on insulin sensitivity in muscle of type 2 diabetic rats*. Physiol Behav, 2011. **103**(3-4): p. 284-9.
395. Coquenlorge, S., et al., *Modulation of lipopolysaccharide-induced neuronal response by activation of the enteric nervous system*. J Neuroinflammation, 2014. **11**: p. 202.
396. Everard, A., et al., *Intestinal epithelial MyD88 is a sensor switching host metabolism towards obesity according to nutritional status*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5648.
397. Geurts, L., et al., *Adipose tissue NAPE-PLD controls fat mass development by altering the browning process and gut microbiota*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6495.

Résumé

Au début de ce doctorat, plusieurs études avaient identifié l'intestin grêle, siège de l'absorption du glucose, en tant que premier organe impliqué dans le contrôle de l'homéostasie glucidique lors d'un repas. En particulier, il a été démontré que la détection entérique de glucose permettait d'impacter son utilisation par le muscle et le foie, *via* un relai central impliquant une libération hypothalamique de monoxyde d'azote (NO). De plus, notre groupe a également démontré qu'une altération de la détection entérique du glucose, associée à une réponse neuronale hypothalamique anormale, participait à la mise en place d'un Diabète de Type 2 (DT2).

En plus de ces problèmes de détection de nutriments, les patients obèses et diabétiques souffrent de troubles de la motilité intestinale (en particulier d'une hypercontractilité intestinale), liés à une atteinte du Système Nerveux Entérique (SNE). En effet, ce dernier est constitué d'environ 600 millions de neurones interconnectés chez l'Homme, contrôlant les contractions des muscles lisses intestinaux. D'un point de vue régulation, le SNE communique en permanence avec le Système Nerveux Central (SNC) *via* des voies nerveuses afférentes et efférentes. L'équipe s'intéresse au rôle de l'apeline en tant que nouvelle cible thérapeutique potentielle pour traiter le DT2. En particulier, notre équipe a récemment montré que l'apeline était libérée par les entérocytes dans la partie proximale de l'intestin, et qu'à ce niveau elle contrôlait l'absorption intestinale du glucose. Cependant, le fait que l'apeline puisse également cibler les neurones du SNE, et donc moduler la contractilité intestinale, n'était pas encore démontré.

Lors de ce travail de thèse, nous avons ainsi pu montrer qu'en fonction de sa concentration, l'apeline activait des populations neuronales entériques différentes provoquant une stimulation ou, au contraire, une inhibition des contractions duodénales. La stimulation de cette contractilité duodénale par de faibles concentrations d'apeline entraîne une augmentation de l'absorption intestinale de glucose, mais également une diminution de la libération de NO hypothalamique, aboutissant à une moindre utilisation de ce dernier par le muscle squelettique. A l'inverse, de fortes concentrations d'apeline sont associées à une diminution de cette activité duodénale, entraînant un retour de l'ensemble de ces paramètres à des niveaux contrôlés. Dans un second temps, nous avons voulu tester si cette motilité duodénale pouvait être considérée comme une cible thérapeutique pour traiter le DT2. Pour cela, nous avons effectué un traitement oral quotidien, pendant une semaine, avec la concentration d'apeline capable de diminuer l'activité duodénale, chez des souris obèses-diabétiques. Cette stimulation chronique par l'apeline permet de restaurer la contractilité duodénale de ces souris diabétiques au même niveau que celle de souris saines. De plus, cet effet est associé à une amélioration de leur tolérance au glucose ainsi que leur index de résistance à l'insuline.

Ainsi, ce doctorat a permis de décrire un nouveau mode de communication entre l'intestin et le cerveau dans le contrôle de l'homéostasie glucidique. En effet, moduler les contractions duodénales en modifiant l'activité du SNE permettrait non seulement d'impacter l'absorption intestinale de glucose, mais également d'activer un axe duodénum-hypothalamus aboutissant au contrôle de l'utilisation périphérique de glucose. Dès lors, ce couplage « SNE-contraction duodénale » représenterait une cible thérapeutique prometteuse dans le traitement de maladies métaboliques telles que le DT2.