



HAL
open science

Un nouvel acteur dans la détection hypothalamique du glucose : les canaux Transient Receptor Potential Canonical (TRPC)

Chloé Chretien

► **To cite this version:**

Chloé Chretien. Un nouvel acteur dans la détection hypothalamique du glucose : les canaux Transient Receptor Potential Canonical (TRPC). Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Bourgogne, 2015. Français. NNT : 2015DIJOS027 . tel-01558449

HAL Id: tel-01558449

<https://theses.hal.science/tel-01558449>

Submitted on 7 Jul 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.

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne
Discipline : Sciences de la vie (Physiologie et Neurosciences)

Présentée et soutenue par
Chloé CHRETIEN

**Un nouvel acteur de la détection hypothalamique du
glucose : les canaux Transient Receptor Potential
Canonical (TRPC)**

Le 7 Décembre 2015

Directeur de Thèse : **Dr. Luc PENICAUD**
Co-encadrant de Thèse : **Dr. Xavier FIORAMONTI**

Jury

Pr. Pascal Degrace	Président
Dr. Celine Cruciani-Guglielmacci	Rapporteur
Dr. Michel Dallaporta	Rapporteur
Dr. Anne Lorsignol	Examineur
Dr. Serge Luquet	Examineur
Dr. Luc Pénicaud	Directeur de Thèse
Dr. Xavier Fioramonti	Co-encadrant de Thèse

Remerciements

J'exprime tous mes remerciements à :

L'INRA et le Conseil Régional d'avoir financé ce Doctorat.

Les membres du jury d'avoir accepté de lire et d'évaluer ces travaux. Merci de votre disponibilité.

Le Dr Anne Lorsignol et le Dr Serge Luquet d'avoir accepté de faire parti de mon comité de suivi de thèse. Notre réunion en première année m'a été d'une aide précieuse.

Je tiens à remercier vivement :

Le Dr Luc Pénicaud pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Merci de m'avoir apporté les moyens scientifiques, techniques, et financiers nécessaires à la réalisation de mes travaux. Malgré la direction du laboratoire vous avez su rester présent et à l'écoute tout au long de ma thèse et me pousser toujours à aller plus loin.

Le Pr Corinne Leloup, sans qui, mon intégration au monde de la recherche n'aurait pas été possible: je ne l'oublierai pas. Cela a été un plaisir de travailler et discuter de science avec toi.

Le Dr Xavier Fioramonti pour m'avoir encadré et guidé pendant 4 années au laboratoire. Merci pour l'autonomie que tu m'as laissée pour mener à bien cette thèse, tout en restant disponible! Outre ta présence scientifique, tu as aussi su me soutenir dans les moments de doute et de « ras-le-bol ». Tu as toujours été compréhensif et je t'en suis très reconnaissante. Tout cela m'a permis de réaliser une thèse dans d'excellentes conditions et j'en garderai, malgré toutes les difficultés auxquelles nous avons dû faire face... (la douleur, un polychrome qui explose, des pannes à répétitions, des cellules cancéreuses dans le doigt, une morsure, un emprisonnement au labo...saleté de chat noir!), un très bon souvenir. Je te suis également très reconnaissante de m'avoir « exportée » du laboratoire et offert l'opportunité de participer à des congrès et collaborations. Ce sera un réel plaisir de continuer à travailler ensemble...qui c'est ce que l'avenir réserve! Un grand merci à Stéphanie Fioramonti pour m'avoir appris la culture de neurones et pour m'avoir défoulée avec le footing (tu es une meilleure gazelle que moi) !

L'ensemble de notre équipe « Détection cérébrale des nutriments et homéostasie énergétique ». Un merci particulier à Sylvie Grall, qui aura été ma troisième main durant cette thèse, je n'aurais jamais pu faire toutes ces expériences si tu n'avais pas été là. Tu m'as appris ce qu'est le travail d'équipe dans le calme, le respect et la confiance, grâce à toi j'ai beaucoup grandi. Merci au Dr Fabienne Liénard et au Dr Claire Fenech pour leur aide, leurs conseils et leur bienveillance sur mes travaux. Vous m'avez

fait part de votre expérience et de votre savoir, et aucune de mes questions n'est restée sans réponse. Je tiens à préciser Fabienne, les neurones HGE ne sont pas une légende!

Je remercie sincèrement :

Les Dr Raymond Berges, Fawzia Baba-Aïssa, Jean Gasquel et Aurore Quinault et Sylvie Chaudy pour leur contribution dans ce travail.

Le Dr Stephan Collins pour son regard critique sur la science et son aide.

L'ensemble de l'équipe 15 du Dr Alexandre Benani « Plasticité des circuits neuronaux de la prise alimentaire ». Merci Alex pour ton retour scientifique envers mes travaux.

L'ensemble de l'équipe 4 « Plasticité fonctionnelle des neurones olfactifs » dirigée par le Dr Xavier Grosmaître pour m'avoir apporté une vision plus cognitive des neurosciences, avec des questions toujours très pertinentes. Merci à David Jarriault et Vanessa Soubeyre (ma copine de labo) pour nos discussions scientifiques mais aussi très spirituelles lors des pauses repas!

Le Dr Thierry Alquier, le Dr Zane Andrews, le Dr Vanessa Routh et le Dr Nathalia Shirokova avec qui j'ai eu la chance de collaborer.

Des acteurs discrets, mais tellement importants dans un laboratoire, je remercie sincèrement les personnes du service technique Cédric Serrano et Michel Tavan (qu'est ce qu'on aura rigolé! Vous allez me manquer!), les membres de l'équipe administrative, Olivier Lalouette, Véronique Buet, Fabienne Peltret, Christine Chabert, Sabine Duchesne, Daniella Genet et Patricia Laurent, et enfin notre animalière Anne Lefranc pour son travail exceptionnel et son aide au quotidien.

Enfin, ce Doctorat aura été avant tout une très belle aventure humaine. J'y ai rencontré des personnes formidables parmi les autres Doctorants, Post-Doctorants et Ingénieurs, où beaucoup sont devenus des amis proches. Merci du fond du cœur à ces personnes, pour avoir partagé mes peines et mes joies : Camille Allard, Lionel Carneiro, Xavier Brenachot, Brandon Cline, Alexandra Gouazé, Christophe Guillerault, Amélie Pécourt, Imad Aoudé et Nanette Schneider avec qui j'ai passé un M2R et un début de thèse décoiffant, puis Nicolas Dollion, Héber Rodriguez, Camille Goudet, Lucie Desmoulins, Adrien Molinas, Sébastien Rivière et Danaé Nuzzaci.

Je dédie ce travail :

A mes parents et ma soeur, Papa, Maman, Julie vous avez toujours cru en moi et été là dans les bons et les mauvais moments, à m'épauler et à m'aider. C'est en grande partie grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui.

Résumé

L'hyperglycémie est détectée et intégrée au niveau de l'hypothalamus médio-basal (MBH) qui inhibe la prise alimentaire et déclenche la sécrétion d'insuline. Le MBH renferme des neurones spécialisés gluco-sensibles (GS) qui détectent directement ou indirectement des variations de la concentration extracellulaire en glucose.

Dans une première étude, nous suggérons que la détection indirecte du glucose par les neurones GS hypothalamiques repose sur la libération d'endozépines par les astrocytes, un gliotransmetteur connu pour inhiber la prise alimentaire en réponse à l'hyperglycémie. Nos travaux montrent que les endozépines activent spécifiquement les neurones à pro-opiomélanocortine (POMC) du MBH pour générer leur effet anorexigène.

Dans une seconde étude, nous montrons que la détection directe de l'hyperglycémie implique les neurones hypothalamiques dits high gluco-excité (HGE). Grâce à des approches pharmacologiques et génétiques, nous mettons en évidence que les canaux redox sensibles Transient Receptor Potential Canonical 3 et 4 (TRPC3/4) sont fondamentaux pour la détection du glucose par les neurones HGE *in vitro*, la stimulation de la sécrétion d'insuline et la diminution de la prise alimentaire en réponse à l'hyperglycémie cérébrale *in vivo*. De plus, nos travaux démontrent que les canaux TRPC3 du MBH jouent un rôle clef dans le contrôle de l'homéostasie énergétique.

Les travaux de cette thèse permettent de mettre en évidence deux nouveaux mécanismes de détection hypothalamique de l'hyperglycémie : l'un reposant sur l'implication des canaux TRPC3/4 dans les neurones HGE et l'autre proposant les endozépines astrocytaires comme relaie du signal « glucose » aux neurones POMC.

Mots clefs: homéostasie énergétique, hypothalamus, endozépines, détection du glucose, astrocytes, neurones gluco-sensibles, canaux TRPC, espèces actives de l'oxygène.

Abstract

Hyperglycemia is detected and integrated by the mediobasal hypothalamus (MBH) which, in turn, inhibits food intake and triggers insulin secretion. The MBH houses specialized glucose-sensitive (GS) neurons, which directly or indirectly modulate their electrical activity in response to changes in glucose level.

In a first study, we hypothesized that indirect detection of glucose by MBH GS neurons involves the secretion of endozepline by astrocytes, a gliotransmitter known to inhibit food intake in response to hyperglycemia. The present work shows that endozeplines selectively activate anorexigenic MBH pro-opiomelanotortine (POMC) neurons.

In the second study, we show that the direct detection of increased glucose level involves hypothalamic glucose-excited (HGE) neurons. Using pharmacological and genetic approaches, we demonstrate that the redox-sensitive Transient Receptor Potential Canonical 3 et 4 (TRPC3/4) channels are involved in MBH HGE response to glucose *in vitro* and increased insulin secretion and decreased food intake in response to cerebral hyperglycemia *in vivo*. We also obtained evidences that MBH TRPC3 channel is a critical new player for energy homeostasis.

This thesis work identifies two new mechanisms involved in hypothalamic detection of hyperglycemia: the first based on the involvement of TRPC3/4 channels in HGE neurons and the second highlighting the astroglial endozeplines as a relay of the “glucose” signal to POMC neurons.

Keywords: energy homeostasis, hypothalamus, endozeplines, glucose detection, astrocytes, glucose-sensing neurons, TRPC channels, reactive oxygen species.

Table des matières

Liste des figures	10
Liste des tableaux	13
Liste des abréviations	14
Préambule	17
I. Homéostasie énergétique	17
II. Le système nerveux central : un centre d'intégration clef	18
Introduction	19
I. Le contrôle central de l'homéostasie glucidique.....	20
I.1. L'homéostasie glucidique : définition	20
I.2. Conséquences physiologiques d'une hypoglycémie	20
I.3. Conséquences physiologiques d'une hyperglycémie	22
I.4. Le tronc cérébral et l'hypothalamus	23
I.5. Le rôle de l'hypothalamus dans le contrôle de l'homéostasie glucidique.....	24
I.5.1. Les noyaux impliqués	24
I.5.2. L'importance du MBH	27
I.5.3. Les neuromodulateurs impliqués.....	28
I.5.3.1. Le système à mélanocortine	28
I.5.3.2. Le GABA et le glutamate.....	32
II. La détection du glucose dans le contrôle de l'homéostasie glucidique	34
II.1. Détection périphérique du glucose	34
II.1.1. Le pancréas endocrine	34
II.1.1.1. La cellule β	34
II.1.1.2. La cellule α	36
II.1.2. La veine hépatoportale.....	36
II.1.3. Les corps carotidiens	37
II.2. La détection hypothalamique du glucose	38

II.2.1.	Concentration de glucose dans le cerveau	39
II.2.2.	Les transporteurs de glucose dans le cerveau	41
II.2.3.	Les cellules hypothalamiques sensibles au glucose	42
II.2.3.1.	Les neurones gluco-sensibles.....	42
II.2.3.2.	Les astrocytes	57
II.2.3.3.	Les tanocytes	58
II.2.4.	Couplage glie/neurones dans la détection hypothalamique du glucose	62
II.2.5.	Les neurones gluco-sensibles et le diabète	64
III.	Les canaux Transient Recepteur Potential Canonical (TRPC)	66
III.1.	La super famille des canaux TRP	66
III.2.	Les canaux TRPC	68
III.2.1.	Structure des TRPC	69
III.2.2.	Activation/inhibition physiologique/pharmacologique	70
I.1.1.1.	Activation.....	70
I.1.1.2.	Inhibition	74
III.2.3.	Expression des canaux TRPC.....	76
III.2.4.	TRPC et EAOs.....	78
III.2.5.	Canaux TRPC et contrôle de l'homéostasie énergétique	79
III.2.5.1.	Canaux TRPC et diabète	79
III.2.5.2.	Canaux TRPC centraux.....	80
	Problématique.....	82
	Résultats et Discussions.....	83
I.	Objectif 1 : le transmetteur glial ODN cible les neurones POMC hypothalamiques pour contrôler l'homéostasie énergétique via un mécanisme indépendant du GABA.....	84
I.1.	Contexte de l'étude.....	84
I.2.	Résultats principaux	85
I.3.	Discussion.....	90
II.	Objectif 2 : Rôle des canaux TRPC3 hypothalamiques dans la détection centrale du glucose et le contrôle de l'homéostasie glucidique	92

II.1. Contexte de l'étude.....	92
II.2. Résultats	95
II.2.1. Partie 1 : identifier le canal impliqué dans la détection du glucose des neurones HGE du MBH.....	95
II.2.1.1. Caractérisation de la réponse au glucose des neurones HGE du MBH.....	95
II.2.1.2. Nature des neurones HGE	99
II.2.1.3. Implication des EAOs dans la réponse au glucose des neurones HGE.....	100
II.2.1.4. Implication des canaux TRPC3/4 dans la réponse au glucose des neurones HGE	103
II.2.2. Partie 2 : Déterminer le(s) rôle(s) physiologique(s) des canaux TRPC3 dans le contrôle de l'homéostasie glucidique.....	110
II.2.2.1. Implication des canaux TRPC3 du MBH dans la détection de l'hyperglycémie ..	111
II.2.2.2. Implication des canaux TRPC3 du MBH dans des perturbations métaboliques .	115
II.2.3. Partie 3 : Déterminer si les neurones HGE et les canaux TRPC sont associés à l'altération de la sensibilité hypothalamique au glucose et le développement de pathologies métaboliques induites par un régime alimentaire diabétogène.....	117
II.3. Résultats complémentaires	120
II.3.1. Phénotypage souris TRPC3 ^{total} KO	120
II.3.2. Rôle du canal TRPC3 du MBH dans la détection centrale du glucose	121
II.4. Discussion.....	124
II.4.1. Choix du modèle permettant d'étudier les HGE dans le MBH	124
II.4.1.1. Choix de l'imagerie calcique.....	124
II.4.1.2. Concentration de glucose utilisée	125
II.4.2. Caractérisation des neurones HGE dans le MBH.....	125
II.4.2.1. Détection directe du glucose	126
II.4.2.2. Nature et rôles physiologiques des neurones HGE.....	126
II.4.3. Mécanismes de détection du glucose des neurones HGE.....	128
II.4.3.1. Les EAOs :	128
II.4.3.2. Les canaux TRPC :	129
II.4.3.3. Cascade de transduction entre l'H ₂ O ₂ et les canaux TRPC.....	130

II.4.4. Rôles physiologiques et pathologiques des canaux TRPC3 centraux dans le contrôle de l'homéostasie glucidique et de la prise alimentaire	133
Conclusion et Perspectives.....	136
Annexes.....	143
I. Matériel et méthodes	144
I.1. Animaux	144
I.2. Etudes <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i>	144
I.2.1. Obtention de tranches de cerveau	144
I.2.2. Culture primaire de neurones dissociés de MBH	145
I.2.3. Préparation du milieu conditionné astrocytaire (ACM)	145
I.2.4. L'imagerie cellulaire sur les neurones dissociés de MBH	146
I.2.4.1. Caractéristiques de la sonde Fura-2	146
I.2.4.2. Protocole	146
I.2.4.3. Double imagerie	147
I.2.4.4. Analyse des données	147
I.2.5. Agents pharmacologiques.....	148
I.2.6. RT-qPCR	148
I.3. Etudes <i>in vivo</i>	149
I.3.1. Stéréotaxie	149
I.3.1.1. Implantation de canules	149
I.3.1.2. Génération des souris TRPC3 ^{MBH} KO.....	149
I.3.2. Test tolérance au glucose (GTT) et à l'insuline (ITT).....	150
I.3.3. Sécrétion d'insuline induite par l'hyperglycémie centrale	150
I.3.4. Tests de réalimentation en réponse au glucose.....	151
I.3.5. Analyses biochimiques	151
I.3.6. Analyses statistiques.....	151
II. Publications et communications.....	152
III. Article.....	154
Bibliographie.....	170

Liste des figures

Figure 1 : Balance énergétique équilibrée	17
Figure 2 : Le cerveau participe au maintien de l'homéostasie glucidique	18
Figure 3 : Conséquences de la détection centrale de l'hypoglycémie.....	22
Figure 4 : Schéma d'un cerveau de rongeur montrant les principales régions hypothalamiques impliquées dans la régulation de l'homéostasie glucidique	26
Figure 5 : Localisation privilégiée du NA dans la détection des signaux périphériques	28
Figure 6 : Contrôle de l'homéostasie énergétique par les neurones AgRP/NPY et POMC.....	32
Figure 7 : Sécrétion de l'insuline par les cellules β du pancréas	35
Figure 8 : Représentation schématique de la concentration extracellulaire cérébrale en glucose en fonction de la glycémie plasmatique	40
Figure 9 : Transport du glucose à travers la BHE	42
Figure 10 : Les neurones gluco-sensibles	43
Figure 11 : Schéma de la localisation des neurones GS dans le SNC.....	44
Figure 12 : Mécanismes moléculaires de détection du glucose des neurones GI du VMN.....	51
Figure 13 : Mécanismes moléculaires de détection du glucose des neurones GE du MBH dépendant de la métabolisation du glucose	54
Figure 14 : Les neurones HGE du NA	55
Figure 15 : Localisation des tanycytes	59
Figure 16 : Les hypothèses de la détection de l'augmentation de la concentration de glucose par les tanycytes du MBH	61
Figure 17 : Mécanismes hypothétiques de détection de l'hyperglycémie aiguë dans le MBH	64
Figure 18 : Les canaux TRP	66
Figure 19 : Arbre phylogénétique de la super famille des TRP chez l'homme	67
Figure 20 : Les canaux TRP dépolarisent les cellules excitables et modulent les forces d'entrée du Ca^{2+} dans les cellules non-excitables.....	68
Figure 21 : Structure (A) et topologie (B) des canaux TRPC	70
Figure 22 : Principaux mécanismes d'activation des TRPC	71
Figure 23 : Modèle d'activation des canaux TRPC par le NO.....	79

Figure 24 : Modèle proposé de l'activation des canaux TRPC par la leptine et l'insuline dans les neurones POMC du MBH.....	81
Figure 25 : Implication du système à mélanocortine dans l'effet satiétogène de l'ODN	86
Figure 26: L'ODN dépolarise les neurones POMC du MBH	87
Figure 27: L'ODN diminue la fréquence des sIPSC chez les neurones POMC et non-POMC du MBH.....	88
Figure 28 : CDLOP inhibe les réponses à l'ODN des neurones du MBH	89
Figure 29 : Schéma représentant l'hypothèse de travail.....	94
Figure 30 : Culture primaire de cellules dissociées de MBH.....	95
Figure 31 : Différents profils de réponse au glucose des neurones HGE de MBH.....	96
Figure 32 : Réponses au glucose caractéristiques des neurones GI de MBH	97
Figure 33 : Réponses au glucose caractéristiques des neurones HGI de MBH	97
Figure 34 : Caractérisation des réponses au glucose caractéristiques des neurones HGE de MBH.....	98
Figure 35 : Les neurones HGE ne sont pas des neurones POMC	100
Figure 36 : Les EAOs sont impliquées dans la réponse au glucose des neurones HGE de MBH	101
Figure 37 : Mesure de la production d'EAOs des neurones HGE en réponse au glucose	102
Figure 38 : La réponse au glucose des neurones HGE du MBH est indépendante des canaux K_{ATP}	104
Figure 39 : Effet de la pharmacologie des canaux TRPC sur la réponse au glucose des cellules HGE de MBH.....	107
Figure 40 : Implication des canaux TRPC3 dans la réponse au glucose des neurones HGE du MBH.....	109
Figure 41 : Expression des canaux TRPC4 dans le MBH chez la souris TRPC3 ^{total} KO	110
Figure 42 : Implication des canaux TRPC3 centraux dans la sécrétion nerveuse d'insuline induite par une hyperglycémie cérébrale.....	112
Figure 43 : Implication des canaux TRPC3 centraux dans la sécrétion nerveuse d'insuline induite par une hyperglycémie cérébrale.....	113
Figure 44 : Implication des canaux TRPC3 centraux dans l'effet satiétogène du glucose en réponse à une hyperglycémie systémique	114
Figure 45 : Implication des canaux TRPC3 centraux dans l'effet satiétogène du glucose (icv) lors de l'hyperglycémie	115
Figure 46 : Phénotypage métabolique des souris TRPC3 ^{MBH} KO	116

Figure 47 : Réponse du glucose des neurones HGE du MBH de rat rendu diabétique avec un régime HFHS.....	119
Figure 48 : Phénotypage métabolique des souris TRPC3 ^{total} KO.....	121
Figure 49 : Implication des canaux TRPC3 du MBH dans la sécrétion nerveuse d'insuline induite par une hyperglycémie cérébrale.....	122
Figure 50 : Implication des canaux TRPC3 du MBH dans l'effet satiétogène du glucose (ip) lors de l'hyperglycémie.....	123
Figure 51 : mécanismes hypothétiques d'activation des canaux TRPC3/4 par l'H ₂ O ₂ dans les neurones HGE du MBH	132
Figure 52 : Schéma de conclusion.....	142

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les détecteurs de glucose périphériques	38
Tableau 2 : Récapitulatif des différentes populations de neurones GS dans l'hypothalamus (autre que le MBH), leurs phénotypes et leurs fonctions physiologiques.....	47
Tableau 3 : Répartition des neurones gluco-sensibles au niveau du MBH.....	48
Tableau 4 : Principaux activateurs et inhibiteurs naturels ou synthétiques des canaux TRPC	75
Tableau 5 : Expressions et fonctions physiologiques périphériques et centrales des canaux TRPC.....	76
Tableau 6 : Résumé des neurones hypothalamiques dont la détection des signaux métaboliques implique les canaux TRPC.....	81
Tableau 7 : Composition des régimes standard et HFHS.....	117

Liste des abréviations

[Ca ²⁺] _i :	concentration intracytoplasmique de calcium
2-DG :	2-désoxyglucose
3 ^{ème} V :	3 ^{ème} ventricule
AAV :	adeno-associated virus
ACBP :	protéine de liaison des ACLC-CoA
ACM :	milieu conditionné astrocytaire
aCSF :	artificial cerebrospinal fluid (liquide cérébrospinal artificiel)
AG :	acide gras
AGLC :	acide gras libre à longue chaîne
AgRP :	agouti related peptide
AMPK :	AMP-activated protein kinase
ATP :	adénosine triphosphate
AUC :	area under curve
BHE :	barrière hémato-encéphalique
Ca ²⁺ :	calcium
CART :	cocaine-amphetamine related transcript
CCNS :	conductance cationique non sélective
CFTR :	cystic fibrosis transmembrane regulator
CRR :	réponses de contre-régulation
DAG :	diacylglycérol
DBI :	diazepam binding inhibitor
DMN :	noyau dorsomédian
DMN :	noyau dorsomédian
DMNX :	noyau dorsomoteur du nerf vague
DREADD :	récepteur exclusivement activé par un ligand synthétique
DT2 :	diabète de type 2
EAOs :	espèces actives de l'oxygène
eGFP :	enhanced green fluorescent protein
EM :	éminence médiane
GABA :	acide γ -aminobutyrique

GABA _A :	récepteur du GABA
GK :	glucokinase
GLP1 :	glucagon-like peptide 1
GLP1-R :	récepteur glucagon-like peptide 1
GLUT :	transporteur de glucose
H ₂ O ₂ :	péroxyde d'hydrogène
HFD :	high fat Diet
HFHS:	high fat high sucrose
icv :	intracérébroventriculaire
ip :	intrapéritonéale
K ⁺ :	potassium
KO :	knocked Out
LCR :	liquide céphalorachidien
LH :	hypothalamus latéral
MBH :	hypothalamus médiobasal
MC3(4)-R :	récepteur melanin-concentrating hormone 3 et 4
MCH :	melanin concentrating hormone
mEAOs :	espèces actives de l'oxygène mitochondriales
NA :	noyau arqué
Na ⁺ :	sodium
GE :	gluco-excité ou glucose-excited
GI :	gluco-inhibé ou glucose-inhibited
GS :	gluco-sensible
HGE :	high glucose-excited
HGI :	high glucose-inhibited
nNOS :	NO synthase
NO:	monoxyde d'azote
NPY :	neuropeptide Y
NTS :	noyau du tractus solitaire
OAG :	1-oleyl-2-acétyl-sn-glycérol
ODN :	octadecaneuropeptide
P2X(Y) :	récepteur purinergique
PI3K :	phosphatidylinositol 3-kinase
PLC :	phospholipase C

POMC :	pro-opiomélanocortine
PVN :	noyau paraventriculaire
Pyr3 :	pyrazole 3
RT-PCR :	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SF-1 :	steroidogenic factor 1
sGC :	guanylate cyclase soluble
SGLT :	cotransporteur glucose-sodium dépendant
sIPSC :	courant inhibiteur spontané post-synaptique
SNA :	système nerveux autonome
SNC :	système nerveux central
STD :	standard diet
TRP :	transient receptor potential
TRPC1-7 :	transient receptor potential canonical 1-7
TTX :	tétradotoxine
VMN :	noyau ventromédial
WT :	wild type
α -MSH :	Melanocyte stimulating hormone- α

Préambule

I. Homéostasie énergétique

A la fin du 19^{ème} siècle, Claude Bernard et Walter Canon développent le concept d'homéostasie. L'homéostasie est la capacité de tout système biologique à maintenir une stabilité relative de son milieu interne, malgré les fluctuations environnementales. Il s'agit là d'un équilibre dynamique qui doit d'être contrôlé pour être maintenu. Selon ce concept, bon nombre de fonctions physiologiques sont contrôlées chez les mammifères : la fréquence des battements cardiaques, la pression sanguine, les fonctions respiratoires ou encore la **glycémie** (concentration de glucose dans le sang). On représente souvent l'homéostasie énergétique sous la forme d'une balance équilibrée entre les apports et les dépenses énergétiques. Les apports trouvent principalement leurs origines dans l'alimentation, tandis que les dépenses résultent essentiellement du métabolisme basal et de l'activité physique du sujet (**Figure 1**). La régulation de la glycémie est un des reflets de l'homéostasie énergétique : un individu sain conserve une glycémie autour d'une valeur stable de **5 mM (soit 90 mg/dl)**, et ce malgré la production et l'utilisation variables de glucose.



Figure 1 : Balance énergétique équilibrée

Les apports énergétiques sont équivalents aux dépenses : la balance est équilibrée

II. Le système nerveux central : un centre d'intégration clef

Le **système nerveux central** (SNC) joue un rôle fondamental dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. C'est un centre intégrateur qui coordonne l'activité de nombreux organes périphériques en fonction des conditions métaboliques. Il est informé en permanence des besoins énergétiques et des réserves de l'organisme par trois grands types de signaux :

- métaboliques (**glucose**, acides aminés, acides gras)
- endocriniens (leptine, insuline, ghréline...)
- nerveux (les influx afférents).

Le SNC intègre ces signaux et déclenche en retour des réponses centrales et périphériques adaptées de type comportementales (en régulant la prise alimentaire), endocriniennes (en contrôlant par exemple la sécrétion d'insuline) et végétatives (en modulant l'activité de certains organes par l'intermédiaire du système nerveux autonome (SNA) afin d'orienter les flux métaboliques) (**Figure 2**).

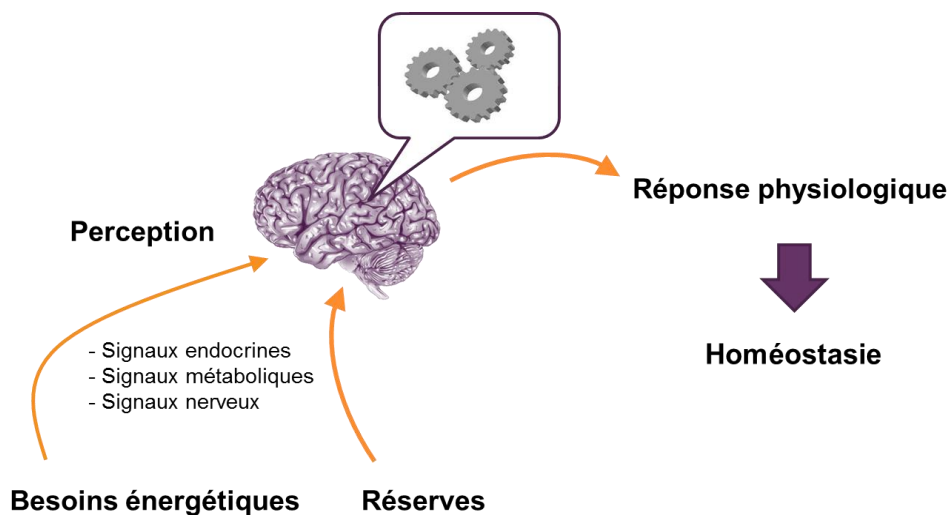


Figure 2 : Le cerveau participe au maintien de l'homéostasie glucidique

Des signaux endocriniens, métaboliques et nerveux atteignent le cerveau pour l'informer des besoins et des réserves énergétiques de l'organisme (mécanismes de perception). Le cerveau intègre ces signaux et déclenche un ensemble de réponses physiologiques pour rétablir l'homéostasie énergétique.

Parmi les nutriments détectés par le SNC, **mon travail de thèse s'est focalisé sur le glucose.**

Introduction

I. Le contrôle central de l'homéostasie glucidique

I.1. L'homéostasie glucidique : définition

Le **glucose** est la molécule énergétique la plus utilisée par l'organisme dans des conditions physiologiques du fait de sa disponibilité immédiate. Le cerveau l'utilise principalement comme source d'énergie en condition physiologique. Il est donc vital de maintenir des taux circulants dans une gamme « acceptable » afin de ne pas mettre l'intégrité de l'organisme en péril. Ainsi, le glucose, en plus d'être un substrat énergétique, joue le rôle de molécule informative du statut énergétique de l'organisme. La moindre variation du taux de glucose circulant est détectée au niveau périphérique et central puis intégrée et enfin à l'origine de réponses physiologiques adaptées. Lorsque l'organisme se trouve en déficit énergétique, la glycémie chute (<5 mM ou $<80-85$ mg/dl), on parle d'hypoglycémie. A l'opposé, lors d'un surplus énergétique, la glycémie augmente, on parle d'hyperglycémie (>5 mM ou $>95-100$ mg/dl). Le contrôle de la glycémie est le fruit d'une régulation fine et primordiale à l'échelle de tout l'organisme : organes, tissus, cellules : on parle d'**homéostasie glucidique**.

I.2. Conséquences physiologiques d'une hypoglycémie

En situation d'hypoglycémie (lors d'un jeûne, d'un exercice physique, ou d'une injection excessive d'insuline chez les patients diabétiques), la diminution de la concentration de glucose est détectée par des senseurs périphériques et par le SNC. En retour, ces senseurs modulent l'activité du SNA (augmentation du tonus sympathique et diminution du tonus parasympathique). Dans les années 1950 il a été montré que le glucose pouvait agir au niveau du cerveau pour réguler l'homéostasie énergétique. Jean Mayer montra ainsi que la prise alimentaire est initiée en réponse à une légère diminution de la glycémie. Il spécula alors que des détecteurs de glucose étaient présents dans le cerveau (Mayer, 1953). Dix ans plus tard, Oomura et coll. et Anand et coll. montrèrent, indépendamment et pour la première fois, la présence de neurones dont l'activité électrique est modulée par des variations de la concentration en glucose (Anand et al., 1964; Oomura et al., 1969). Depuis, l'utilisation de modèles d'hypoglycémie (injection d'insuline en périphérie) ou de glucopénie (diminution de l'entrée et/ou de l'utilisation de glucose par les cellules via l'injection

intracérébroventriculaire (icv) de 2-désoxyglucose (2-DG), un analogue non métabolisable du glucose) a confirmé l'idée qu'une hypoglycémie peut stimuler la prise alimentaire (Lanfray et al., 2013; Pénicaud et al., 1986).

Parallèlement à l'augmentation de la sensation de faim, la détection d'une hypoglycémie par le SNC initie un ensemble de réponses neuroendocriniennes séquentielles appelé **réponses de la contre-régulation** (CRR), qui permet un retour rapide de la glycémie à sa valeur basale. Lorsque la glycémie chute, on observe une diminution de la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas et une augmentation de l'activité du SNA sympathique et de la sécrétion de glucagon par les cellules α pancréatiques. L'ensemble de ces réponses augmentent la production hépatique de glucose (glycogénolyse). De l'adrénaline et du cortisol sont ensuite sécrétés par les glandes surrénales qui stimulent la néoglucogénèse et limitent l'absorption du glucose par les tissus insulino-sensibles (muscles, foie, tissu adipeux). Notons que le cortisol et l'adrénaline agissent surtout en limitant le degré d'hypoglycémie lorsque celle-ci se prolonge (Tesfaye and Seaquist, 2010). La sécrétion d'adrénaline est régulée par le SNC contrairement aux sécrétions d'insuline et de glucagon qui sont régulées en premier par les taux de glucose ambiants puis secondairement par le SNC.

Toutes ces réponses ont pour conséquence de ré-augmenter progressivement la glycémie jusqu'à atteindre une glycémie « normale » (voir pour revue (Cryer, 2008)) (**Figure 3**).

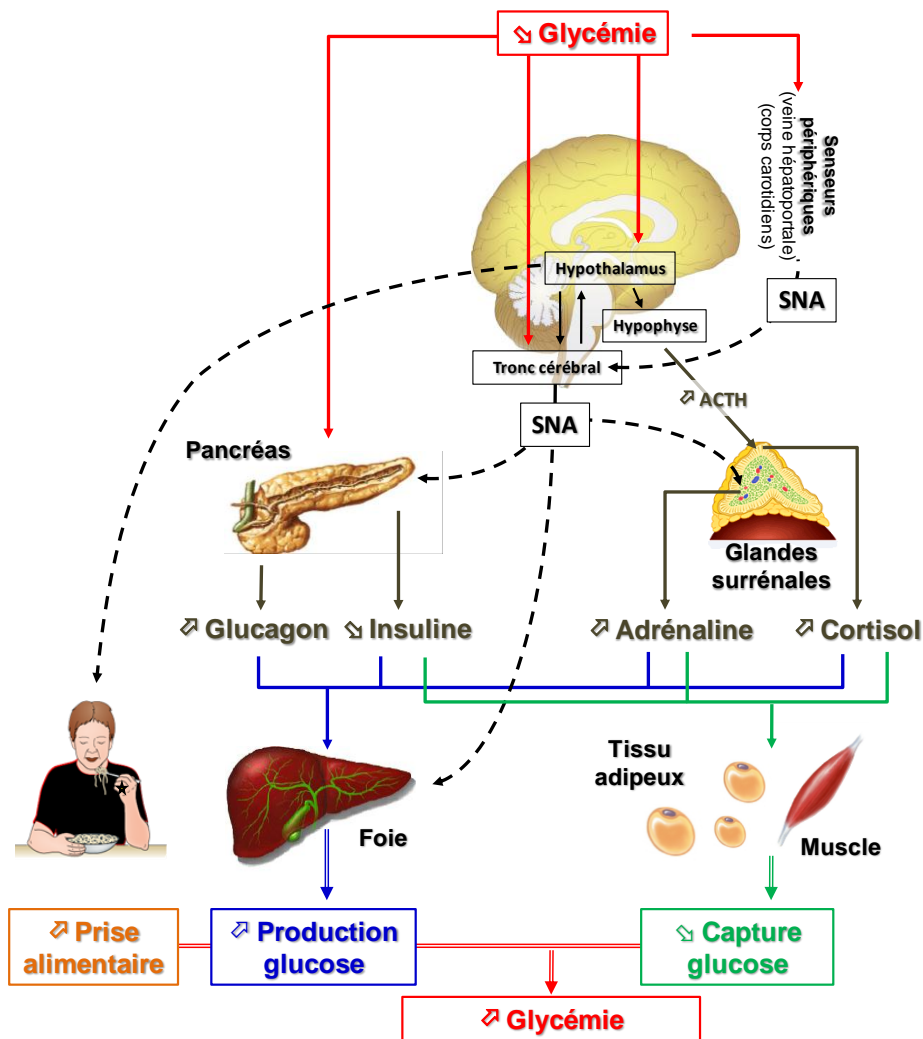


Figure 3 : Conséquences de la détection centrale de l'hypoglycémie

La diminution de la concentration de glucose dans le sang est détectée par des senseurs de glucose périphériques et centraux. La première réponse à l'hypoglycémie implique l'inhibition de la sécrétion d'insuline. L'activation du SNA augmente les sécrétions de glucagon et d'adrénaline par le pancréas et les glandes médullosurrénales, respectivement. L'ACTH stimule la libération de cortisol par les glandes corticosurrénales. L'augmentation de glucagon, d'adrénaline et de cortisol et la diminution de la sécrétion d'insuline stimulent la production hépatique de glucose et diminuent la capture du glucose par le foie et le tissu adipeux. En parallèle, le cerveau induit des réponses comportementales pour déclencher la prise alimentaire. Toutes ces réponses permettent d'augmenter la concentration de glucose dans le sang et de restaurer l'euglycémie. Modifié d'après (Fioramonti et al., 2011).

I.3. Conséquences physiologiques d'une hyperglycémie

En situation d'hyperglycémie par apports massifs d'énergie dans l'organisme lors d'un repas, par exemple, l'augmentation de la concentration de glucose est détectée en périphérie par les cellules β pancréatiques qui produisent de l'insuline. Cette hormone augmente la capture et l'utilisation du glucose dans les muscles et le tissu adipeux. Elle diminue la production et augmente le stockage du glucose dans le foie. En parallèle, le SNC détecte aussi

l'hyperglycémie et module l'activité du SNA (augmentation du tonus parasympathique et diminution du tonus sympathique). Les effets physiologiques de la détection centrale de l'hyperglycémie ont été beaucoup moins étudiés. Il a été montré qu'une hyperglycémie cérébrale induite par une injection icv de glucose entraîne une inhibition de la prise alimentaire (Cha et al., 2008; Lanfray et al., 2013). De plus, l'injection intracarotidienne de glucose en direction du cerveau induit, en périphérie, une sécrétion rapide et transitoire d'insuline chez le rat par l'intermédiaire d'une activation du nerf vague (Atef et al., 1995; Carneiro et al., 2012). D'autres études ont montré que la modulation du SNA en réponse à une hyperglycémie cérébrale inhibe la production de glucose hépatique (Lam et al., 2005) et favorise les dépenses énergétiques en stimulant la thermogénèse (Sakaguchi and Bray, 1987).

L'ensemble de ces réponses a pour conséquence de diminuer progressivement la glycémie jusqu'à atteindre sa valeur « normale ».

I.4. Le tronc cérébral et l'hypothalamus

Parmi les structures cérébrales impliquées dans le contrôle de l'homéostasie glucidique, le **tronc cérébral** et l'**hypothalamus** jouent un rôle fondamental (**Figure 4A**). Ils sont tous les deux capables d'intégrer des signaux provenant de la périphérie. Par le passé, le tronc cérébral était seulement considéré comme une région de relai entre le SNC et le SNA. De nombreuses efférences hypothalamiques se projettent vers le tronc cérébral qui les intègre avant de moduler l'activité des organes périphériques via le SNA (voir pour revue (Schneeberger et al., 2014)). Il reçoit également des afférences viscérales en provenance du foie et du tractus gastro-intestinal et transmet l'information à l'hypothalamus. On sait maintenant que le tronc cérébral est aussi capable de détecter directement les signaux métaboliques et hormonaux. En effet, il abrite des neurones spécifiques modifiant leur activité électrique en réponse aux modifications de la concentration de glucose sanguin, qui moduleraient la prise alimentaire et l'activité du SNA (Andrew et al., 2007; Dallaporta et al., 1999; Mimeo and Ferguson, 2015).

Durant ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés uniquement à la détection hypothalamique du glucose.

1.5. Le rôle de l'hypothalamus dans le contrôle de l'homéostasie glucidique

Nous allons énumérer ici les différents noyaux qui composent l'hypothalamus, leurs rôles respectifs dans le contrôle de l'homéostasie énergétique ainsi que les principaux neuropeptides qui y sont synthétisés et libérés.

1.5.1. Les noyaux impliqués

L'hypothalamus est une structure cérébrale issue du diencephale, localisé autour du 3^{ème} ventricule. Il est délimité antérieurement par le chiasma optique, la commissure antérieure qui relie les deux hémisphères cérébraux et la lame terminale (mur antérieur du 3^{ème} ventricule), postérieurement par les corps mamillaires, et enfin dorsalement par le thalamus. Il est constitué d'une quarantaine de noyaux, qui sont des regroupements spécifiques de populations de neurones. Parmi les noyaux qui composent l'hypothalamus, l'aire latérale (LH), le noyau ventro-médian (VMN), le noyau dorso-médian (DMN), le noyau paraventriculaire (PVN) et le noyau arqué (NA) sont les principales structures impliquées dans le contrôle nerveux du métabolisme et de la prise alimentaire (**Figure 4A**). **Notons que l'hypothalamus médio-basal (MBH) comprend l'association du VMN et du NA.**

L'implication de l'hypothalamus dans le contrôle de l'homéostasie énergétique a été initialement mise en évidence, à partir des années 1940, par des expériences de lésion et de stimulations électriques. Une lésion bilatérale du MBH induit une hyperphagie qui conduit au développement d'une obésité. En revanche, la lésion du LH provoque l'effet inverse, à savoir une diminution de la prise alimentaire alors que la stimulation de cette aire cérébrale entraîne le développement d'une obésité. Ces travaux ont amené les scientifiques à définir le MBH comme « centre de la satiété » et le LH comme « centre de la faim » (voir pour revue (Elmqvist et al., 1999)). En plus d'un rôle dans la régulation de la prise alimentaire, des expériences plus fines de stimulation souvent associées à des expériences de traçage (antérograde ou rétrograde) ont permis de montrer que les noyaux hypothalamiques sont aussi capables de moduler l'activité du SNA en projetant vers le tronc cérébral.

Dans la partie périventriculaire, on trouve des noyaux impliqués dans la détection des signaux circulants en provenance du sang ou du liquide céphalorachidien (LCR), notamment

le NA, le VMN et le PVN. Dans la partie médiane, le DMN reçoit de nombreuses afférences sensorielles et forme de multiples connexions avec d'autres régions de l'hypothalamus, tout comme le VMN. A ceux-là, s'ajoute le LH qui est constitué d'un ensemble plus diffus de neurones qui ne forme pas un véritable noyau (**Figure 4B**). Les noyaux hypothalamiques sont interconnectés entre eux. Le PVN reçoit des afférences du NA, du VMN, du DMN et du LH. Le VMN se projette sur le NA, le PVN et le LH. Le NA projette sur le DMN, le PVN et le LH. Le DMN reçoit des afférences du NA, du VMN et du LH. Les neurones du LH se projettent vers de nombreuses aires intra- et extra-hypothalamiques, et constituent une interface entre l'hypothalamus et les régions limbiques et corticales (Berthoud, 2002).

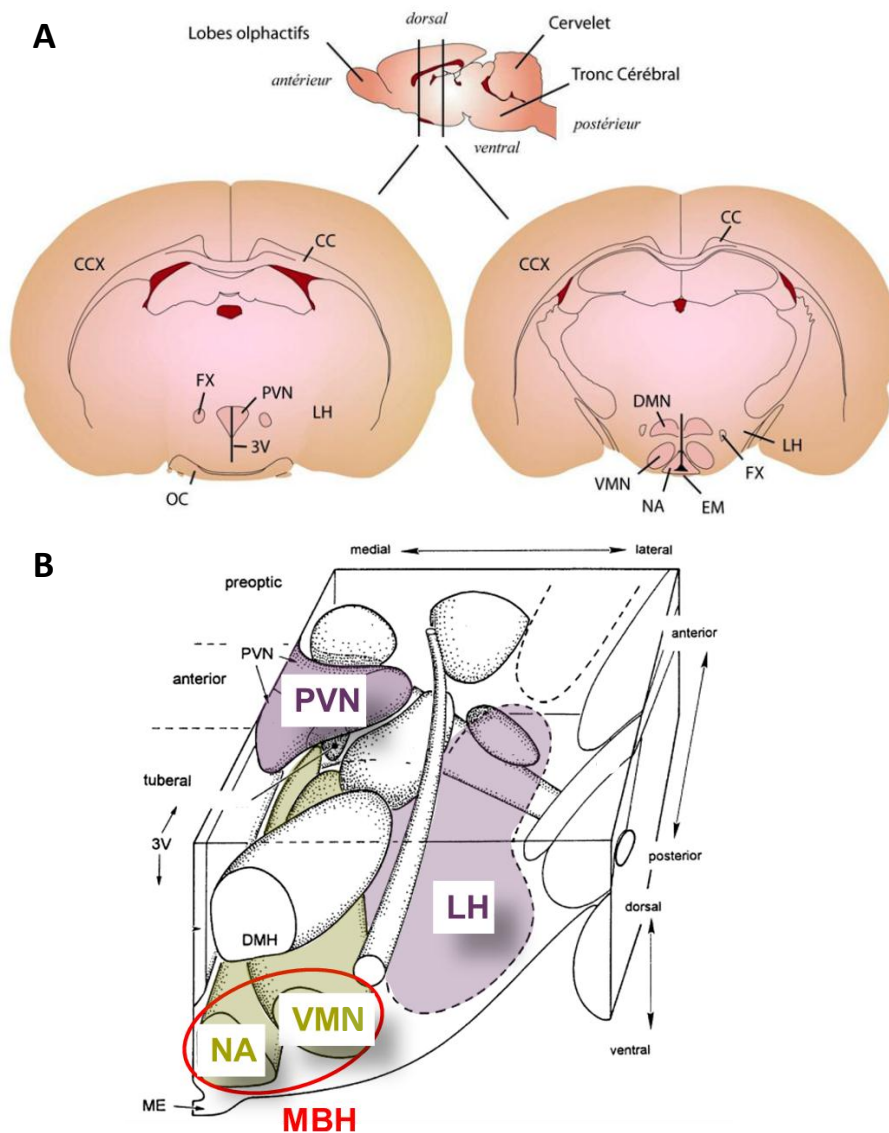


Figure 4 : Schéma d'un cerveau de rongeur montrant les principales régions hypothalamiques impliquées dans la régulation de l'homéostasie glucidique

A) L'insert du haut représente une coupe longitudinale du cerveau. Les deux traits verticaux localisent le niveau des deux coupes frontales représentées en dessous. Abréviations : CC (corps calleux), CCX (cortex cérébral), FX (fornix), PVN (noyau paraventriculaire), DMN (noyau dorsomédian), LH (hypothalamus latéral), PVN (noyau paraventriculaire) VMN (noyau ventromédian), 3V (3^{ème} ventricule), NA (noyau arqué), EM (éminence médiane), OC (chiasma optique).

B) Vue des principaux noyaux hypothalamiques de rat du côté droit. En position ventrale, on distingue le NA à proximité de l'éminence médiane et le VMN. Le NA et le VMN définissent l'hypothalamus médio-basal (MBH). En bordure du 3^{ème} ventricule (3V), se situe le noyau para-ventriculaire (PVN) dans la partie antérieure dorsale, et le noyau dorso-médian (DMN) plus postérieur. L'hypothalamus latéral (LH) est délimité par des pointillés sur le côté latéral de l'hypothalamus. Modifié d'après (Berthoud, 2002).

1.5.2. L'importance du MBH

Le MBH joue un rôle majeur dans la détection de l'hypo- et de l'hyperglycémie et dans l'initiation des réponses neuroendocrines appropriées.

Plusieurs études attribuent un rôle important au MBH dans la détection de l'**hypoglycémie** et l'initiation de la CRR. En effet, une lésion chimique du VMN diminue fortement la sécrétion d'adrénaline, de noradrénaline et de glucagon en réponse à l'hypoglycémie (Borg et al., 1994). Une glucopénie induite par l'infusion de 2-DG dans le VMN aboutit à une élévation rapide de la glycémie et la sécrétion de glucagon et d'adrénaline (Borg et al., 1995). En revanche, la perfusion de glucose dans le VMN lors d'une hypoglycémie réduit de 85% la libération d'adrénaline, de noradrénaline et de glucagon (Borg et al., 1997). Ces résultats suggèrent que le MBH joue un rôle dans 2 aspects de la CRR : l'activation adrénomédullaire et la sécrétion de glucagon.

Le MBH est aussi impliqué dans la détection de l'**hyperglycémie**. L'injection de glucose spécifiquement dans le MBH engendre une diminution de la prise alimentaire (Carneiro et al., 2012). L'injection intracarotidienne de glucose en direction du cerveau, connue pour activer certains neurones du NA, déclenche une sécrétion d'insuline via l'activation du nerf vague (Leloup et al., 2006). Enfin, l'infusion de glucose dans le MBH conduit à une augmentation de l'activité des fibres nerveuses sympathiques innervant le tissu adipeux brun et aboutirait à l'augmentation de la thermogénèse (Sakaguchi and Bray, 1987).

Il est important de souligner que le rôle respectif du NA et du VMN dans la détection du glucose est encore mal compris. *In vivo*, les études sur le MBH manquent de spécificité entre le VMN et le NA. Il est admis que le VMN joue un rôle essentiel dans l'initiation de la CRR alors que le NA serait plus particulièrement impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire (Fioramonti et al., 2011). Les fibres nerveuses du VMN se projettent sur le tronc cérébral d'où partent les efférences du SNA. Ces projections sont en accord avec un rôle du VMN dans les réponses de CRR. En revanche, le VMN ne semble pas impliqué dans la diminution de la prise alimentaire en réponse à l'hyperglycémie. Aucune relation entre la diminution de la concentration de glucose dans le VMN et le déclenchement de la prise alimentaire n'a été observée (Dunn-Meynell et al., 2009). De plus, la souris génétiquement invalidée pour le récepteur au glutamate dans les neurones SF-1 (steroidogenic factor-1) qui constituent la principale population neuronale du VMN, présente un défaut de la CRR sans modification de la prise alimentaire en réponse à l'hypoglycémie (Tong et al., 2007). Le NA

contrôlerait plutôt la prise alimentaire et la dépense énergétique. De part sa localisation, le NA est considéré comme le premier site de détection hypothalamique des nutriments et des hormones. Le NA est en bordure du 3^{ème} ventricule et de l'éminence médiane (EM) où certains capillaires sanguins sont fenestrés (Ciofi, 2011; Mullier et al., 2010), « altérant » physiologiquement la barrière hémato-encéphalique (BHE) (**Figure 5**). Ainsi, les échanges de molécules entre la périphérie et le SNC seraient favorisés au niveau du NA et les variations de concentrations des signaux circulants dans le LCR et le sang serait directement détectées par les neurones du NA proportionnellement à leur taux circulant (Schaeffer et al., 2013).

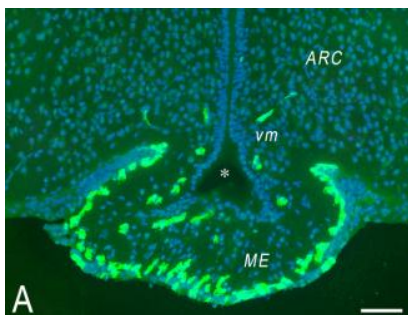


Figure 5 : Localisation privilégiée du NA dans la détection des signaux périphériques

Le NA (ARC) borde le 3^{ème} ventricule et l'éminence médiane (ME). Au niveau du NA ventromédian (vm) et de l'éminence médiane, certains capillaires sanguins sont fenestrés comme le montre le marquage MECA32 (vert) spécifique d'endothélium perméable. Marquage nucléaire Hoechst (bleu), bar d'échelle :100µm. D'après (Ciofi, 2011).

Pour résumer, le MBH, de par sa localisation et ses connexions nerveuses, est une zone privilégiée dans le contrôle de l'homéostasie glucidique. Au sein de cette structure, les travaux de recherche de ces dernières années ont permis de mettre en évidence l'existence de populations neuronales impliquées dans divers processus de contrôle de l'homéostasie énergétique (contrôle de la prise alimentaire, des dépenses énergétiques et régulation de la glycémie) qui constitue le **système à mélanocortine**.

1.5.3. Les neuromodulateurs impliqués

1.5.3.1. Le système à mélanocortine

Le paramètre « prise alimentaire » a le plus souvent été utilisé pour déterminer si un neurotransmetteur était capable ou non de réguler le métabolisme énergétique. Les neuropeptides sont ainsi généralement séparés en deux classes en fonction de leur effet sur la prise alimentaire. Ils sont dits orexigènes ou anorexigènes selon si respectivement ils stimulent ou inhibent la prise alimentaire.

Le système à mélanocortine est un senseur métabolique important dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Dans ce contexte, ses actions principales résident dans le contrôle de la prise alimentaire et des dépenses énergétiques via les récepteurs à la mélanocortine (MCR). L'avancée des nouvelles technologies, (l'optogénétique, DREADD, expression du récepteur à la toxine diphtérique) permettant désormais d'activer ou d'inhiber spécifiquement une population de neurones d'intérêt, nous donne une meilleure compréhension des rôles physiologiques du système à mélanocortine. Il comporte (**Figure 6**) :

- un ensemble de neurones du NA incluant les neurones exprimant la pro-opiomélanocortine, dont certains co-expriment le neuropeptide cocaine and amphetamine-related transcript (**POMC/CART**) ainsi que des neurones exprimant le neuropeptide Y hypothalamique et l'agouti gene-related protein (**NPY/AgRP**). Ces neurones sont sensibles aux hormones et nutriments, on les qualifie de neurones de premier ordre (voir pour revue (Morton et al., 2014)). L'expression des neuropeptides POMC et NPY est retrouvée dans d'autres aires cérébrales (comme l'amygdale ou le tronc cérébral), mais la colocalisation POMC/CART et NPY/AgRP est spécifique du NA.

- des cibles neuronales (des neurones **POMC/CART** et **NPY/AgRP**) effectrices exprimant les récepteurs à mélanocortine MC3-R ou MC4-R. Ces neurones sont qualifiés de neurones de second ordre. Dans l'hypothalamus, on retrouve une forte expression de MC3-R et MC4-R au niveau du PVN.

Les neurones POMC/CART :

Le gène codant la POMC produit deux différents peptides : la mélanocortine et la β -endorphine. La mélanocortine peut être clivée en sous-peptides incluant l'adrénocorticotropine, l' α -, la β - et la γ -melanocyte-stimulating hormone (MSH). Dans l'hypothalamus l' α -MSH active les récepteurs MC3-R et MC4-R pour diminuer la prise alimentaire. Les souris mutées pour MC4-R et/ou MC3-R sont hyperphagiques, obèses et hyperglycémiques (Atalayer et al., 2010; Huszar et al., 1997). L'antagoniste naturel de MC4-R et MC3-R est l'AgRP. Il bloque la voie de signalisation de l' α -MSH (Lu et al., 1994).

Des injections icv d' α -MSH ont montré son pouvoir anorexigène (Edwards et al., 2000). Les souris dont l'expression du gène *pomc* est spécifiquement inhibée dans l'hypothalamus via la technologie Cre-Lox (Xu et al., 2005) développent une obésité sévère. De plus, chez l'homme, des mutations du gène *pomc* ont été détectées et provoquent une obésité importante (Krude et al., 1998). Plus récemment, il a été montré que l'activation aiguë

(pendant 2h) spécifiquement des neurones POMC du NA (par optogénétique et DREADD) n'inhibe pas la prise alimentaire (Aponte et al., 2011; Zhan et al., 2013). En revanche, leur activation chronique inhibe la prise alimentaire et diminue le poids corporel des animaux (Aponte et al., 2011; Zhan et al., 2013). A l'inverse, l'ablation des neurones à POMC du NA, via l'expression du récepteur à la toxine diphtérique, aboutit à une obésité (augmentation de la masse grasse et diminution de la masse maigre), une hyperphagie, une intolérance au glucose et la diminution de la dépense énergétique et de l'activité locomotrice (Zhan et al., 2013). Une partie des neurones à POMC exprime aussi CART, toutefois le rôle de ce dernier dans la régulation de la prise alimentaire n'est pas clairement établi : une injection icv de CART inhibe la prise alimentaire (Kristensen et al., 1998) tandis qu'une injection dans le MBH chez le rat à jeun augmente la prise alimentaire (Abbott et al., 2001).

Les neurones NPY/AgRP :

L'injection icv d'AgRP provoque une hyperphagie prolongée et la prise de poids (Rossi et al., 1998). Chez la souris, l'ablation spécifique des neurones AgRP du NA à l'âge adulte, par expression du récepteur à la toxine diphtérique, induit l'anorexie alors que leur ablation progressive ou en néonatal n'induit pas d'anomalies majeures de l'homéostasie énergétique chez la souris mais juste une légère perte de poids (Luquet et al., 2005). Ceci suggère la mise en place de systèmes compensatoires pouvant corriger l'absence d'un ou plusieurs neuropeptides orexigènes. A l'inverse, l'activation aigüe des neurones à AgRP par optogénétique ou DREADD est suffisante pour déclencher la prise alimentaire, réduire la dépense énergétique et augmenter le stockage énergétique dans le tissu adipeux (Aponte et al., 2011; Krashes et al., 2011). Très récemment, l'équipe de Horvath a élégamment montré par optogénétique que l'activation aigüe des neurones AgRP déclenche des réponses comportementales stéréotypées et compulsives se traduisant par la recherche de nourriture, l'augmentation de l'activité locomotrice et la diminution de l'anxiété (Dietrich et al., 2015). Les neurones AgRP du NA co-exprime le NPY. L'injection de NPY dans le PVN ou le 3^{ème} ventricule, chez les rats, augmente la prise alimentaire tout en inhibant les dépenses énergétiques et en facilitant le stockage d'énergie dans le tissu adipeux (Stanley and Leibowitz, 1984). Lorsqu'il est infusé chroniquement dans le 3^{ème} ventricule, il déclenche un syndrome d'obésité (Billington et al., 1991). Le NPY agit via sa fixation sur des récepteurs Y (Lin et al., 2004). Une étude récente suggère que les effets de NPY sur la prise alimentaire

seraient relayés à la fois par les récepteurs Y1 et Y5 (Nguyen et al., 2012). Notons que le NPY est largement exprimé dans le cerveau.

Enfin, les neurones à NPY/AgRP produisent également le neurotransmetteur inhibiteur GABA. La libération de GABA suite à l'activation spécifique des neurones AgRP (DREAAD) est suffisante pour déclencher rapidement la prise alimentaire (Krashes et al., 2013). Lorsque la libération synaptique du GABA par les neurones à NPY/AgRP est empêchée, les dépenses énergétiques des souris sont augmentées, elles deviennent minces et résistantes à l'obésité (Tong et al., 2008). Ceci suggère que le GABA libéré par ces neurones est également très important dans le contrôle de l'homéostasie énergétique.

Interconnexions des neurones NPY/AgRP et POMC/CART :

Les neurones à POMC sont en contact avec les neurones à NPY/AgRP. Les neurones NPY/AGRP inhibent directement les neurones à POMC par l'intermédiaire du GABA (Atasoy et al., 2012; Cowley et al., 2001) (**Figure 6**). De plus, la présence de MC3-R sur les neurones à POMC suggère que les neurones à AgRP peuvent inhiber les neurones à POMC par cette voie de signalisation (Bagnol et al., 1999). Enfin, les neurones à NPY/AgRP et à POMC/CART pourraient être la cible de leur propre neuropeptide puisqu'ils expriment leurs récepteurs MC3-R, MC4-R, Y1 et Y2 (Broberger et al., 1997; Mounien et al., 2005).

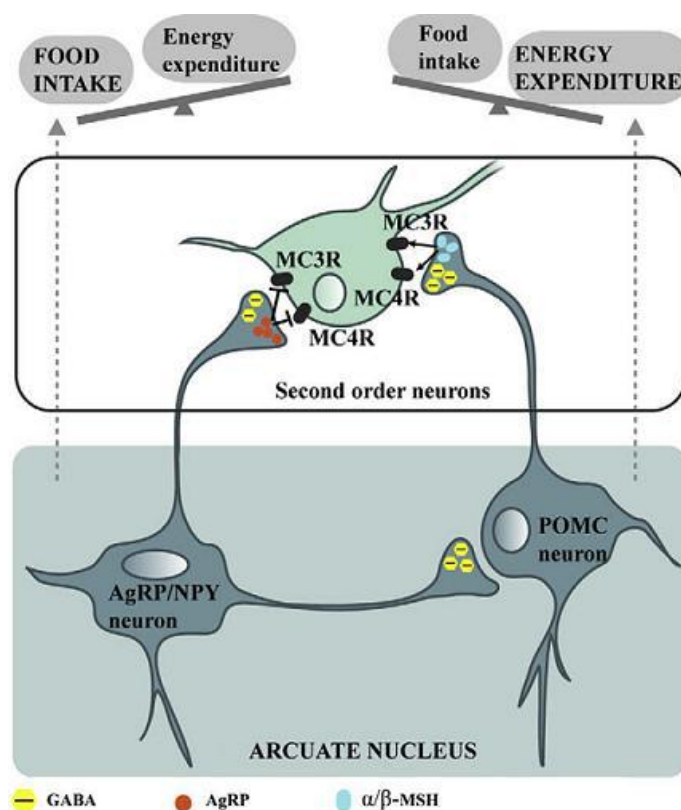


Figure 6 : Contrôle de l'homéostasie énergétique par les neurones AgRP/NPY et POMC

Les neurones NPY/AgRP et POMC du noyau arqué forment un réseau coordonné, notamment grâce aux projections inhibitrices des NPY/AgRP sur les POMC. Ces deux populations neuronales modulent la balance énergétique, en fonction des signaux périphériques circulants, via leur action sur les neurones de second ordre. L' α -MSH agit sur les récepteurs MC3R et MC4R pour diminuer la prise alimentaire et augmenter les dépenses énergétiques. L'AgRP est un antagoniste des récepteurs MC3R et MC4R et inhibe les neurones POMC via la libération de GABA, il exerce donc des effets opposés. D'après (Sánchez-Lasheras et al., 2010).

I.5.3.2. Le GABA et le glutamate

Connaissant les rôles clés joués par les neurones à NPY/AgRP et à POMC/CART il apparaît fondamental de comprendre comment leur activité est régulée. Jusqu'à maintenant, la plupart des efforts s'étaient focalisés sur la régulation directe des neurones à NPY/AgRP et à POMC/CART par les signaux périphériques au détriment du rôle des projections synaptiques sur ces neurones. Cela paraît surprenant sachant que les neurones à NPY/AgRP et à POMC/CART reçoivent un grand nombre d'afférences synaptiques excitatrices glutamatergiques ou inhibitrices GABAergiques (Pinto et al., 2004). Le **GABA** et le **glutamate** sont les principaux neurotransmetteurs inhibiteurs et excitateurs du SNC, respectivement.

Vong & Lowell ont montré l'existence d'une population neuronale GABAergiques, autres que les neurones à AgRP qui se projette sur les neurones à POMC (Vong et al., 2011).

Les neurones à POMC reçoivent également des afférences glutamatergiques provenant du VMN (Sternson et al., 2005). Après un jeûne le nombre d'afférences glutamatergiques sur les neurones à POMC du NA diminue, suggérant un rôle anorexigène des neurones glutamatergiques du VMN. A l'inverse, la fréquence des courants excitateurs présynaptiques sur les neurones à AgRP de souris mises à jeun augmente comparée à celle des souris nourries (Liu et al., 2012; Yang et al., 2011). La nature des neurones présynaptiques glutamatergiques se projetant sur les neurones à AgRP n'a pas été identifiée.

Ces travaux novateurs montrent que les neurones à POMC/CART et à AgRP/NPY, caractérisés jusqu'alors comme étant des neurones dits de premier ordre au vu de la détection directe des signaux périphériques (nutriments, hormones), ne sont pas forcément les premiers senseurs cellulaires dans le MBH. Ces expériences ont mis en évidence la présence d'interneurones glutamatergiques et GABAergiques qui se placent en amont des neurones à POMC/CART et à AgRP/NPY.

II. La détection du glucose dans le contrôle de l'homéostasie glucidique

Avant de détailler plus précisément la détection hypothalamique du glucose, ses mécanismes et son implication physiologique, les «détecteurs» périphériques de l'organisme seront décrits.

II.1. Détection périphérique du glucose

II.1.1. Le pancréas endocrine

Le pancréas contient 2 types de détecteurs du glucose : la cellule β et la cellule α .

II.1.1.1. La cellule β

La cellule β est le senseur de glucose de référence, les mécanismes moléculaires de détection du glucose sont très documentés depuis longtemps.

La cellule β détecte l'**hyperglycémie**. En réponse à l'augmentation de la glycémie, le glucose entre dans la cellule via le transporteur de glucose **GLUT2** (Thorens, 2015). Chez le rongeur, GLUT2 possède un K_m élevé (18-20mM) permettant de transporter le glucose dans la cellule de façon proportionnelle à l'augmentation de la glycémie. Dans la cellule, le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate (G6P) par une hexokinase, la **glucokinase (GK)**. Ainsi phosphorylé, le glucose suit la voie de la glycolyse puis le cycle de Krebs dans la mitochondrie. Ceci induit l'élévation du ratio d'ATP/ADP cytosolique puis la fermeture des **canaux potassiques K_{ATP}** . La membrane se dépolarise conduisant à l'ouverture de canaux calciques voltages dépendants. L'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium ($[Ca^{2+}]_i$) déclenche l'exocytose des granules d'insuline. Il s'agit du mécanisme principal de libération d'insuline. La cellule β est aussi influencée par la SNA qui l'innervent. Le SN parasympathique déclenche la sécrétion d'insuline par l'intermédiaire de l'acétylcholine qui agit sur le récepteur muscarinique de type 3. A l'inverse, le SN sympathique inhibe la sécrétion d'insuline via la noradrénaline qui se fixe sur le récepteur adrénergique β_2 (Thorens, 2011) (**Figure 7**).

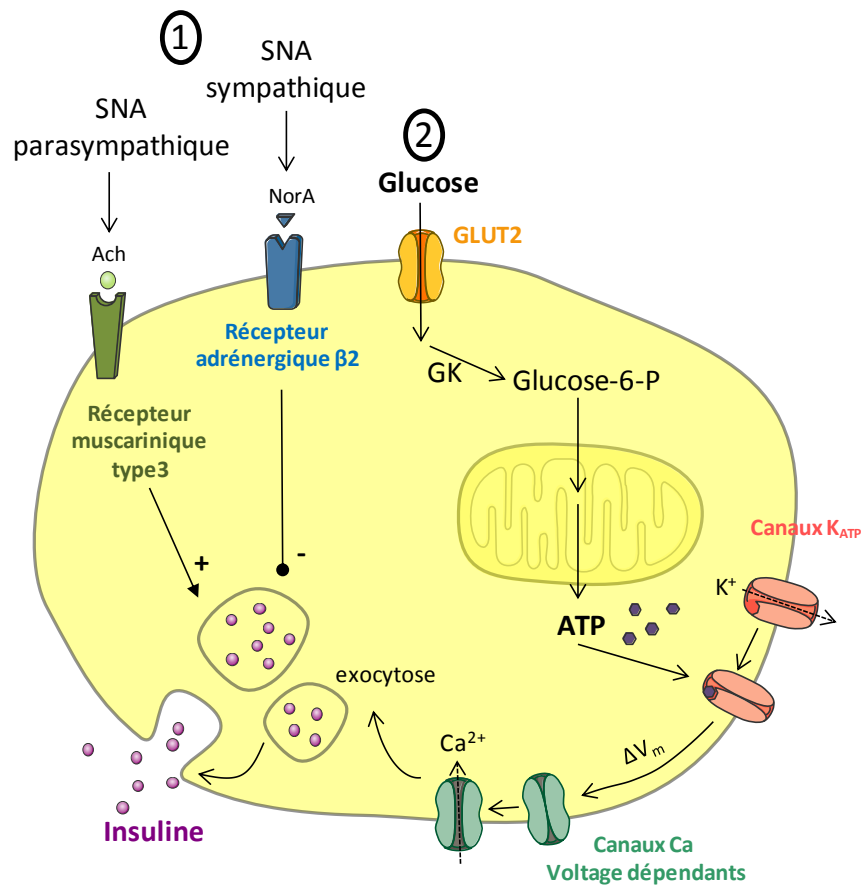


Figure 7 : Sécrétion de l'insuline par les cellules β du pancréas

La cellule β détecte indirectement (1) via le SNA ou directement (2) les variations de la concentration extracellulaire de glucose. L'activation du SNA parasympathique (hyperglycémie) active la sécrétion d'insuline, alors que l'activation du SNA sympathique (hypoglycémie) inhibe sa sécrétion. Lors de l'hyperglycémie, l'entrée de glucose dans la cellule β pancréatique entraîne une augmentation du taux d'ATP intracellulaire. Ceci provoque la fermeture des canaux K_{ATP}-dépendants. La conséquence est l'accumulation d'ions K⁺ dans la cellule, ce qui entraîne l'ouverture de canaux calciques voltage dépendants et l'entrée massive d'ions Ca²⁺ dans la cellule. Cette entrée de Ca²⁺ est à l'origine de l'exocytose des vésicules contenant l'insuline.

Des travaux récents évoquent un rôle crucial de la mitochondrie dans la détection du glucose de la cellule β. En présence de glucose, cet organite produit des dérivés oxygénés que l'on nomme **mEAOs** (Espèces actives de l'Oxygène d'origine mitochondriale) qui sont capables de réagir avec les molécules environnantes. Le traitement d'îlots pancréatiques isolés par des antioxydants supprime la production d'EAOs en réponse à une stimulation au glucose, et inhibe l'exocytose de vésicules d'insuline (Pi et al., 2009, 2010). Ces dérivés sont un signal obligatoire pour la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Leloup et al., 2009).

II.1.1.2. La cellule α

La cellule α libère du glucagon en réponse à la diminution de la concentration de glucose dans le sang, elle détecte donc l'**hypoglycémie**. La détection directe de la diminution de la concentration de glucose par la cellule α semble avoir une faible importance, seule, dans la sécrétion de glucagon. En effet, une lésion du VMN diminue d'environ 80% la sécrétion de glucagon en réponse à l'hypoglycémie sévère (Borg et al., 1994). Deux principaux mécanismes ont été proposés pour expliquer comment la cellule α répond à l'hypoglycémie. Le premier implique une régulation paracrine/endocrine par les cellules avoisinant les cellules α . Par exemple, l'insuline est un inhibiteur puissant de l'activité de la cellule α , probablement par une voie de signalisation impliquant l'activation des canaux K_{ATP} . Le second mécanisme permettant la sécrétion de glucagon en réponse à l'hypoglycémie implique l'innervation de la cellule α par le SNA. L'activation du SN sympathique (ou parasympathique) stimule la sécrétion de glucagon par l'intermédiaire de la noradrénaline et l'acétylcholine, respectivement (Gromada et al., 2007). L'activité du SNA est elle-même modulée par le MBH.

II.1.2. La veine hépatoportale

Après un repas, les nutriments sont absorbés par l'intestin, collectés et transportés par les capillaires mésentériques jusqu'à la veine hépato-portale avant d'atteindre le foie et la circulation sanguine. La veine hépato-portale est un site de détection de l'**hypoglycémie** et de l'**hyperglycémie**. Elle est en relation directe avec les fibres afférentes du nerf vague, modulant l'activité électrique des neurones du tronc cérébral qui modulent ensuite celle du LH (Delaere et al., 2010). Burcelin et collaborateurs ont montré que l'activité électrique de ces fibres nerveuses est inversement proportionnelle à la concentration en glucose dans la lumière de la veine porte (Burcelin, 2003). La détection d'une hyperglycémie hépato-portale contrôle de multiples fonctions physiologiques. Elle intervient dans la modulation du métabolisme glucidique en stimulant l'utilisation du glucose par les muscles, le tissu adipeux brun et le cœur et en favorisant le stockage du glucose au niveau hépatique (Adkins et al., 1987; Burcelin et al., 2000a, 2003), en stimulant la 1^{ère} phase de sécrétion d'insuline (Fukaya et al., 2007) et en améliorant la tolérance orale du glucose (Ionut et al., 2014). Elle induit

également une diminution de la prise alimentaire (Mithieux et al., 2005). L'ensemble de ces réponses permet le retour de la glycémie à son niveau basal.

La veine hépato-portale détecte aussi l'**hypoglycémie**. En effet, Donovan et collaborateurs ont montré, dans une série de travaux, que les détecteurs de glucose de la veine hépato-portale sont importants dans l'initiation de la CRR (Fujita and Donovan, 2005; Fujita et al., 2007; Hevener et al., 2000; Saberi et al., 2008).

Bien que les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la détection du glucose ne soient pas clairement identifiés, **GLUT2** semble jouer un rôle essentiel (Burcelin et al., 2000b). Plus récemment, des études suggèrent que le co-transporteur de glucose couplé au sodium **SGLT3** serait également impliqué (Delaere et al., 2013; Freeman et al., 2006).

II.1.3. Les corps carotidiens

En aval de la séparation des carotides interne et externe, il existe une structure appelée corps carotidiens capables de détecter l'**hypoglycémie**. Les cellules «Glomus» qui les constituent, sont en relation avec les fibres nerveuses afférentes du nerf vague. Les corps carotidiens joueraient un rôle important dans l'activation de la CRR. En effet, leur ablation chez le chien altère la libération de glucagon et de cortisol en réponse à l'hypoglycémie induite par l'insuline (Koyama et al., 2000). La diminution de la concentration de glucose induit la libération de neurotransmetteurs par les glomus (comme l'ATP et les catécholamines) qui font synapse avec les fibres nerveuses afférentes en connexion avec le tronc cérébral (Zhang et al., 2007).

Les mécanismes de détection du glucose par les corps carotidiens ne sont que partiellement connus. Néanmoins, la fermeture des **canaux K⁺** et l'ouverture de **canaux à conductance cationique** de nature inconnue jouent un rôle important (García-Fernández et al., 2007; Pardal and López-Barneo, 2002). GLUT2 et la GK ne sont pas exprimées dans les cellules de glomus. Néanmoins, le métabolisme du glucose semble nécessaire à sa détection puisque l'application de glucose non métabolisable n'induit pas la sécrétion de catécholamines par ces cellules (García-Fernández et al., 2007).

Le tableau ci-dessous récapitule les différents détecteurs périphériques du glucose, les acteurs moléculaires mis en jeu et les rôles physiologiques connus (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Les détecteurs de glucose périphériques

Résumé des variations de concentration en glucose (Δ [glc]) détectées, des effets physiologiques et des acteurs moléculaires mis en jeu dans les différents « glucose-sensors » périphériques de l'organisme.

Glucose-sensors	Δ [glc] détectée	Effets physiologiques	Acteurs moléculaires mis en jeu
Cellule β	\nearrow (hyperglycémie)	\nearrow sécrétion d'insuline	GLUT2, GK, canaux K_{ATP} , EAOs, SNA
Cellule α	\searrow (hypoglycémie)	\nearrow sécrétion de glucagon	canaux K_{ATP} et SNA (détection indirecte)
Veine hépatoportale	\searrow (hypoglycémie)	activation de la CRR	GLUT2, SGLT3
	\nearrow (hyperglycémie)	Inhibition prise alimentaire, \searrow production hépatique glucose, \nearrow utilisation glucose périphérique	
Corps carotidiens	\searrow (hypoglycémie)	activation de la CRR	canaux K^+ et canal à conductance cationique

Il existe donc en périphérie de nombreux détecteurs de glucose capables de déclencher des réponses neuroendocrines pour maintenir l'homéostasie glucidique. Les cellules gluco-sensibles sont aussi présentes dans le SNC, en particulier dans l'hypothalamus. Avant de les décrire en détails, nous allons voir comment le glucose pénètre dans le cerveau et comment varie sa concentration dans le parenchyme nerveux.

II.2. La détection hypothalamique du glucose

Il est important de préciser que le SNC est hétérogène sur le plan structural et fonctionnel. Il est composé par 2 grands types cellulaires, les cellules neuronales et les cellules gliales. Les neurones constituent les cellules spécialisées dans la génération et la transmission de l'information sous forme de signaux électriques. Les cellules gliales

représentent l'ensemble des cellules interstitielles assurant diverses fonctions de soutien et métaboliques pour les neurones. La glie est communément divisée en deux classes, la microglie (cellules immunitaires de type phagocytes) et la macroglie. La macroglie est composée de deux types cellulaires majeurs, les astrocytes/tanocytes qui sont les cellules les plus représentées dans le tissu nerveux et les oligodendrocytes. Les premières sont impliquées dans l'apport de certains éléments nutritifs pour les neurones, l'équilibre du milieu extracellulaire, la modulation de la neurotransmission et la régénération tissulaire suite à des lésions. Les oligodendrocytes, eux, assurent la myélinisation des axones.

II.2.1. Concentration de glucose dans le cerveau

La concentration extracellulaire de glucose dans le parenchyme nerveux reste sujette à controverse dans la littérature. Néanmoins, il est sûr qu'elle est plus faible que la glycémie. Selon les techniques utilisées, en conditions euglycémiques, la concentration extracellulaire en glucose varierait entre 0,3 et 3,3 mM. Notons que certaines études ont été réalisées dans des structures cérébrales profondes sans étudier l'effet dynamique d'une hypo/hyperglycémie sur la concentration cérébrale (McNay et al., 2001; Netchiporouk et al., 1996). Silver et Erecinska ont été les premiers à mesurer des variations de la concentration extracellulaire de glucose, en faisant varier la glycémie périphérique. Ils montrent, chez le rat anesthésié, qu'une glycémie basale de 7,6 mM correspond à une concentration cérébrale seulement de 2,4 mM. Lorsque la glycémie est abaissée vers 2-3 mM ou augmentée vers 15-17mM, la concentration cérébrale diminue vers 0,5mM ou se situe autour de 4,5 mM, respectivement (Silver and Erecinska, 1994). Ainsi, en conditions basales, la concentration de glucose dans le cerveau représenterait seulement 30% de la glycémie. En revanche, de Vries et collaborateurs montrent que la concentration de glucose dans le MBH approche 1,5 mM chez le rat nourris et non anesthésié quand la glycémie périphérique est de 7,7 mM, représentant alors 20 % de la glycémie périphérique (de Vries et al., 2003) (**Figure 8**).

Le NA, où certaines capillaires sanguins très ventraux sont fenestrés, se situe juste au-dessus de l'éminence médiane, richement vascularisée (Ciofi, 2011; Langlet et al., 2013). Dunn-Meynell et collaborateurs ne montrent pas de différence de concentration de glucose dans le NA global et le reste du MBH (Dunn-Meynell et al., 2009). Néanmoins, on peut envisager que la concentration en glucose autour des capillaires fenêtrés serait beaucoup plus proche de la glycémie. La technologie actuelle ne permet néanmoins pas de mesurer la

concentration de glucose dans des microenvironnements, cette question reste donc toujours en suspend. De façon intéressante, bien que la concentration de glucose dans le NA et le VMN soit la même chez l'animal nourri, les taux de glucose sont trois fois plus importants dans le NA par rapport au VMN chez l'animal à jeun (Langlet et al., 2013). Ces résultats suggèrent que le glucose accèderait de façon privilégiée aux cellules du NA.

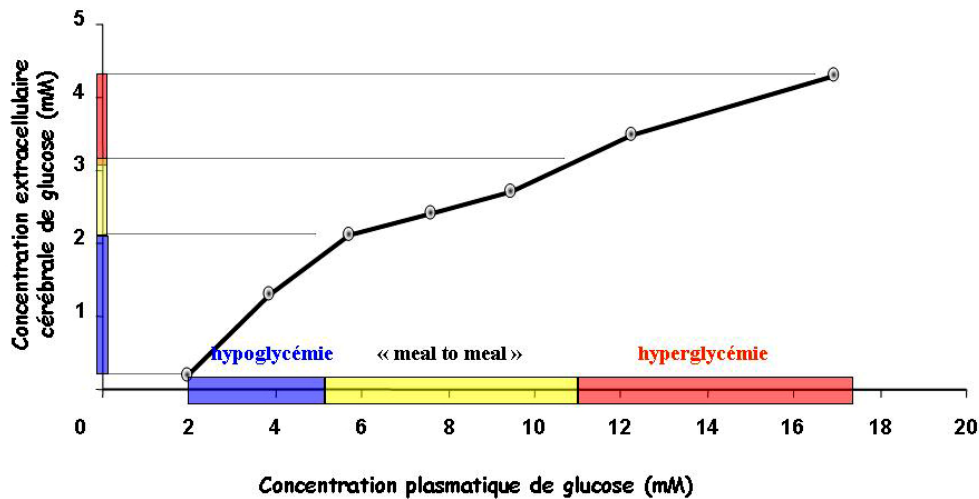


Figure 8 : Représentation schématique de la concentration extracellulaire cérébrale en glucose en fonction de la glycémie plasmatique

Adaptée à partir de la revue du Dr Routh (Routh, 2002).

Lorsqu'on veut étudier *in vitro* les neurones sensibles au glucose, la question fondamentale est de savoir quelle(s) variation(s) faut-il utiliser pour reproduire « au mieux » les concentrations physiologiques présentes dans le tissu nerveux. D'après les données ci-dessus, une condition euglycémique serait mimée par l'incubation des cellules ou des tranches de cerveau dans une solution saline contenant $\approx 2-2,5$ mM de glucose. Nous avons augmenté la concentration de 2,5 mM à 10 mM dans notre étude pour caractériser les neurones sensibles au glucose du MBH.

II.2.2. Les transporteurs de glucose dans le cerveau

Comme évoqué précédemment, le cerveau est isolé et protégé de la circulation sanguine par la BHE. Les cellules endothéliales formant les vaisseaux et capillaires cérébraux sont liées entre elles par des jonctions serrées assurant une perméabilité sélective. Le glucose étant une molécule hydrosoluble, il n'entre pas librement dans les cellules du cerveau. Son passage du compartiment sanguin au parenchyme nerveux est assuré par des protéines spécifiques, les transporteurs de glucose (**GLUTs**). Les GLUTs permettent aussi l'entrée du glucose dans les différentes populations cellulaires du SNC. Ils assurent une diffusion facilitée suivant le gradient de concentration (**Figure 9**). Chez l'homme, 14 membres ont été identifiés (GLUT1 à 14) (voir pour revue (Mueckler and Thorens, 2013))

Le transport du glucose en direction du cerveau est constamment accompli par le transporteur **GLUT1**. Il est exprimé par les cellules endothéliales de la BHE et les cellules gliales, dont les tanocytes de l'éminence médiane et les astrocytes hypothalamiques (Chari et al., 2011; Peruzzo et al., 2000). Au niveau de la BHE, GLUT1 est exprimé sur la face luminale et apicale des cellules endothéliales ce qui permet une diffusion selon le gradient de concentration (**Figure 9**). De plus, sa distribution asymétrique chez le rongeur, avec 3 à 4 fois plus de transporteurs sur la face apicale permettrait d'éviter une accumulation de glucose dans les cellules endothéliales et de favoriser un transport vers le cerveau (Farrell and Pardridge, 1991).

GLUT2 se distingue des autres isoformes par sa faible affinité pour le glucose. Il transporte le glucose proportionnellement à sa concentration circulante et n'est pas saturé lorsque la glycémie augmente. Notre groupe a pu mettre en évidence la présence de ce transporteur principalement dans les astrocytes et son implication dans la régulation nerveuse du métabolisme et de la PA (Arluison et al., 2004a; Leloup et al., 1994). On le retrouve aussi dans certains neurones et tanocytes du MBH (Kang et al., 2004; Orellana et al., 2012).

GLUT3 est le principal transporteur de glucose neuronal. Avec un Km autour de 1-3 mM, GLUT3 est saturé à la plupart des taux de glucose cérébraux permettant un approvisionnement relativement constant en glucose aux neurones en conditions physiologiques (Simpson et al., 2008).

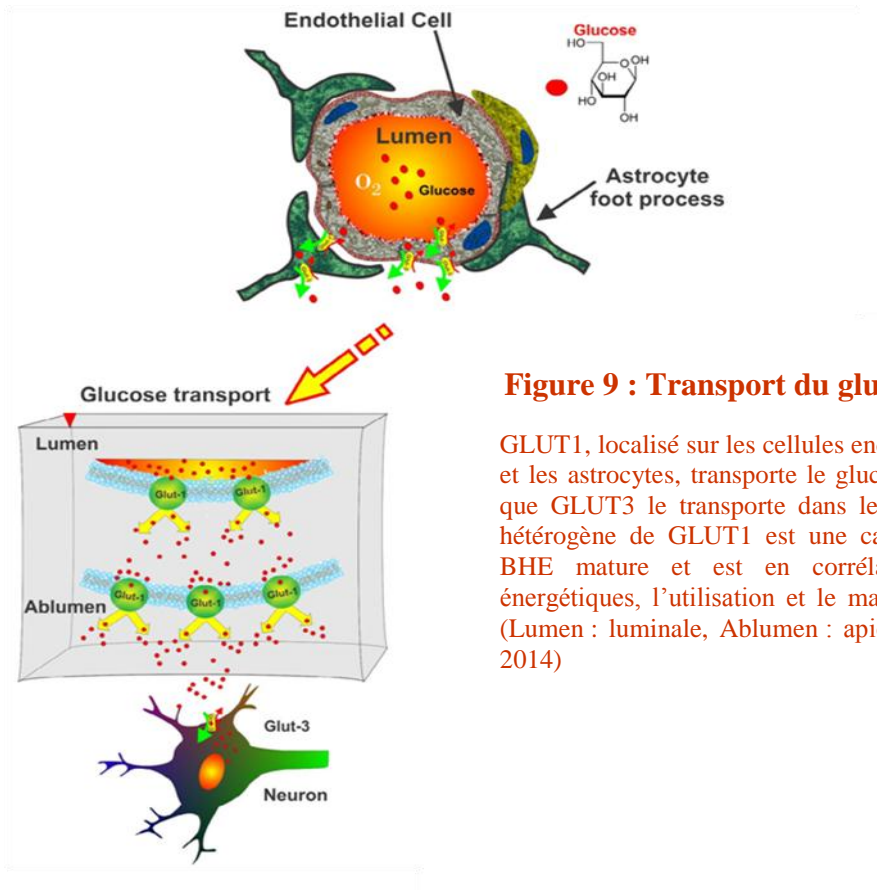


Figure 9 : Transport du glucose à travers la BHE

GLUT1, localisé sur les cellules endothéliales microvasculaires et les astrocytes, transporte le glucose à travers la BHE, alors que GLUT3 le transporte dans les neurones. La distribution hétérogène de GLUT1 est une caractéristique typique de la BHE mature et est en corrélation avec les demandes énergétiques, l'utilisation et le maintien des taux de glucose. (Lumen : luminale, Ablumen : apical). D'après (Prasad et al., 2014)

II.2.3. Les cellules hypothalamiques sensibles au glucose

II.2.3.1. Les neurones gluco-sensibles

Depuis la découverte de l'existence de neurones gluco-sensibles (GS) dans l'hypothalamus (ANAND et al., 1964; Oomura et al., 1969), de nombreuses équipes se focalisent sur leur caractérisation. Les neurones GS utilisent le glucose, non seulement comme un substrat énergétique, mais aussi comme une molécule de signalisation. **Ainsi, un neurone GS est un neurone qui possède la capacité de moduler son activité électrique en réponse à des variations de la concentration extracellulaire de glucose.**

Les neurones GS peuvent être classés en 2 groupes selon leur réponse aux variations de la concentration extracellulaire de glucose: 1) les neurones gluco-excités (GE) dont l'activité électrique est proportionnelle et 2) les neurones gluco-inhibés (GI) dont l'activité est inversement proportionnelle à l'augmentation de la concentration de glucose (**Figure 10**).

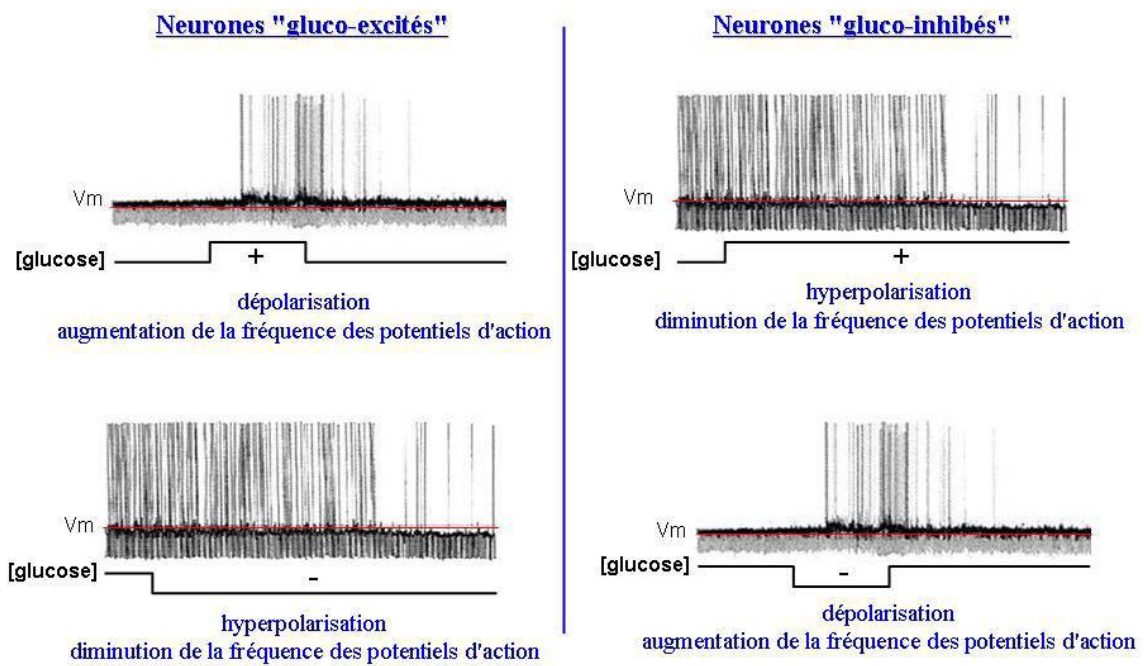


Figure 10 : Les neurones gluco-sensibles

Illustrations de neurones « gluco-excités » et « gluco-inhibés » lors d'une augmentation de la concentration en glucose (+) ou d'une diminution de la concentration en glucose (-). Une excitation se traduit par une dépolarisation (augmentation du potentiel de membrane, V_m) accompagnée d'une augmentation de la fréquence des potentiels d'action. Une inhibition se traduit par une hyperpolarisation (diminution du potentiel de membrane, V_m) accompagnée d'une diminution de la fréquence des potentiels d'action.

Les neurones GS ont été localisés dans l'**hypothalamus** (Burdakov et al., 2005a; Oomura et al., 1969; Song et al., 2001, 2014; Stanley et al., 2013), l'**amygdale** (Zhou et al., 2010), l'**appareil subfornical** (Medeiros et al., 2012), le **tronc cérébral** (Adachi et al., 1995; Dallaporta et al., 1999; Garfield et al., 2014; Murai et al., 1997; Riediger, 2012) et le **bulbe olfactif** (Tucker et al., 2013) (**Figure 11**).

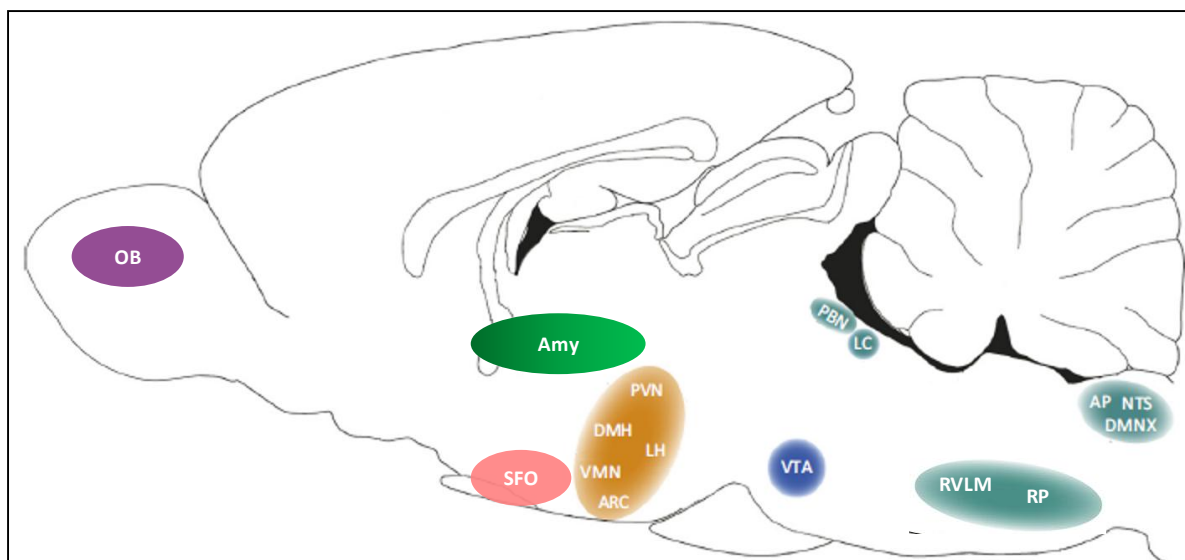


Figure 11 : Schéma de la localisation des neurones GS dans le SNC

Les neurones GS (GE/GI) ont été identifiés dans des structures du tronc cérébral (vert) : dans le complexe dorsal vagal qui comprend l'area postrema (AP), le noyau du tractus solitaire (NTS) et le noyau moteur dorsal du nerf vague (DMNX) ; la médulla basolatérale (BLM) qui inclue la médulla ventrolatérale rostrale (RVLM) et le raphé pallidus (RP) ; le locus coeruleus (LC) et le noyau parabrachial (PBN). Dans l'hypothalamus (orange), les neurones GS sont présents dans le noyau arqué (ARC), le noyau ventromédian (VMN), l'hypothalamus latéral (LH), le noyau dorsomédian (DMN) et le noyau paraventriculaire (PVN). L'aire tegmentale ventrale (données personnelles non publiées du Dr Routh), le bulbe olfactif (OB), l'amygdale (Amy) et l'organe subfornical (SFO) renferment aussi des neurones GS. Modifié d'après (Steinbusch et al., 2015).

Il est important de souligner qu'un grand nombre d'études mettant en évidence la présence des neurones GS dans le cerveau, ont utilisé, *in vitro*, des variations drastiques et non physiologiques de la concentration en glucose. Parfois, des modifications de concentration en glucose allant de 0 à 10 ou 20 mM ou inversement ont été utilisées. Ces gammes de variations de concentration ne permettant pas de déterminer si ces neurones détectent l'hypo- ou hyperglycémie. L'existence des neurones GS dans le bulbe olfactif, l'organe subfornical, le locus coeruleus et l'area postrema peut être discutée et nécessiterait d'être vérifiée dans des gammes de concentration de glucose plus physiologiques. De plus, l'expression de c-fos (marqueur d'activation neuronale) dans certains neurones du noyau dorsomoteur du nerf vague (DMNX) et du raphé pallidus en conditions hypoglycémiques ne constitue pas la preuve directe qu'ils soient GI. Ces neurones pourraient être indirectement activés via un couplage avec une cellule GS. Ces résultats suggèrent davantage qu'ils font partie intégrante des circuits neuronaux impliqués dans la détection de l'hypoglycémie. Des expériences d'électrophysiologie permettraient de valider ou non leur sensibilité au glucose. Le laboratoire du Dr Routh a été le premier à étudier les neurones GS du MBH dans des

conditions physiologiques (Song et al., 2001). Depuis, de façon générale, des variations de concentrations physiologiques de glucose ont été utilisées pour caractériser les neurones GS présents dans l'amygdale, le noyau parabrachial et l'hypothalamus.

Avant de présenter en détail les mécanismes moléculaires, les neuromédiateurs et les rôles physiologiques des neurones GS du MBH, les neurones GS des autres noyaux hypothalamiques (extra-hypothalamiques) seront décrits brièvement.

A. Les neurones gluco-sensibles extra-MBH

Les neurones GE sont présents dans l'hypothalamus antérieur, le PVN et le LH. Ils ont été identifiés parmi les neurones à GnRH (gonadotropin releasing hormone) de l'hypothalamus antérieur (Beall et al., 2012; Roland and Moenter, 2011), les neurones pré-autonomes du PVN (Melnick et al., 2011) et les neurones à MCH (melanin concentrating hormone) du LH (Burdakov et al., 2005a).

Les mécanismes moléculaires de détection du glucose des neurones GE hypothalamiques extra-MBH ont fait l'objet de peu d'investigations. Il a seulement été montré que l'AMPK est impliqué dans la détection du glucose des neurones GE à GnRH (Beall et al., 2012; Roland and Moenter, 2011). De plus, les neurones à GnRH et les neurones GE du PVN utilisent un canal à conductance cationique non sélective (CCNS), alors que les neurones MCH utilisent un canal K_{ATP} pour répondre au glucose (Burdakov et al., 2005a; Kong et al., 2010; Melnick et al., 2011; Roland and Moenter, 2011).

Les neurones GI sont largement distribués dans l'hypothalamus. On les retrouve dans l'hypothalamus périfornical, le PVN, le DMN et le LH. Ils ont été identifiés parmi les neurones à orexine du LH, du DMN et l'hypothalamus périfornical (Burdakov et al., 2005a; González et al., 2008; Williams et al., 2008) et les neurones à NPY et les neurones à GABA du LH (Karnani et al., 2013; Marston et al., 2011).

Il existerait 2 catégories de neurones GI : ceux dont l'activité est régulée par la métabolisation du glucose (par l'ATP) et ceux qui répondent à la molécule glucose elle-même. Le laboratoire du Dr Denis Burdakov a caractérisé des neurones GI dont la réponse au glucose est indépendante de sa métabolisation. Il s'agit des neurones à orexine du LH, du DMN et de l'hypothalamus périfornical (Burdakov et al., 2005a; González et al., 2008;

Williams et al., 2008). Ces neurones sont inhibés à la fois par le glucose et son analogue non métabolisable, le 2-DG (González et al., 2008; Sheng et al., 2014). En accord, la GK n'est pas exprimée et ne participe pas à la réponse au glucose des neurones à orexine (Dunn-Meynell et al., 2002; González et al., 2008). Le glucose active un canal K^+ dans ces neurones, autre que le canal K_{ATP} (Burdakov et al., 2006). Toutefois, la nature précise du canal mis en jeu dans l'inhibition des neurones GI du LH indépendant de la métabolisation du glucose est inconnue. Les neurones GI-GABA du LH sont aussi des neurones dont la réponse est indépendante de la métabolisation du glucose. Néanmoins, ils sont différents des neurones GI-orexine, leur réponse au glucose implique une CCNS (Karnani et al., 2013). Il reste à déterminer si les neurones GI-NPY du LH sont des neurones dépendants ou indépendants de la métabolisation du glucose (Marston et al., 2011). Enfin, Stanley et collaborateurs suggèrent que la réponse au glucose des neurones GI du PVN seraient indépendante de la métabolisation du glucose puisqu'ils n'expriment pas la GK (Stanley et al., 2013). Cette interprétation doit être confirmée.

Le tableau ci-dessous répertorie les différentes populations de neurones GS hypothalamiques extra-MBH selon leur phénotype, les mécanismes moléculaires de détection du glucose et leurs rôles physiologiques connus (**Tableau 2**). Notons qu'en raison de l'absence de marqueur spécifique pour les neurones GS, la nature des neuropeptides exprimés dans les neurones GS peut donner des indications sur leur rôle physiologique.

Tableau 2 : Récapitulatif des différentes populations de neurones GS dans l'hypothalamus (autre que le MBH), leurs phénotypes et leurs fonctions physiologiques

Noyau/Phénotype peptidique	Phénotype de détection de l'augmentation de la [glucose]	[glucose] utilisée pour la caractérisation	Acteurs moléculaires mis en jeu	Effets physiologiques	Références
LH orexine	GI	0.1 → 2.5mM (Sheng et al., 2014) 0.2 → 5mM (Burdakov et al., 2005b) 1 → 5mM (Williams et al., 2008, González et al.; 2008)	Indépendant du métabolisme du glucose Canal K ⁺	Eveil, Renforcement alimentaire	(Burdakov et al., 2005a; González et al., 2008; Harris et al., 2005; Sheng et al., 2014; Williams et al., 2008)
LH NPY	GI	1 → 5mM	Canal K ⁺	?	(Marston et al., 2011)
LH GABA	GI	1 → 5mM	Indépendant du métabolisme du glucose Canal à CCNS	?	(Karnani et al., 2013)
PVN pré-autonome	GI	0.2 → 10mM	?	?	(Melnick et al., 2011)
Pérfornical-DMH orexine	GI	1 → 5mM	Indépendant du métabolisme du glucose Canal K ⁺	?	(Williams et al., 2008)
LH MCH	GE	0.2 → 5mM (Burdakov et al., 2005b) 1 → 5mM (Kong et al., 2010)	Canal K _{ATP}	↗ prise alimentaire Augmentation de la masse grasse Reproduction Sommeil	(Burdakov et al., 2005a; Kong et al., 2010; Naufahu et al., 2013)
PVN pré-autonome	GE	0.2 → 10mM	Canal K _{ATP} indépendant, canal à CCNS	?	(Melnick et al., 2011)
Hypothalamus antérieur GnRH	GE	0.5 → 2.5mM (Beall et al., 2012) 0.2 → 4.5mM (Roland and Moenter, 2011)	AMPK, Canal à CCNS	Reproduction	(Beall et al., 2012; Roland and Moenter, 2011)

B. Les neurones gluco-sensibles du MBH

Le MBH renferme des neurones gluco-excités (GE) et gluco-inhibés (GI) dont la proportion diffère entre le VMN et le NA. Il existe aussi une régionalisation de ces types neuronaux, avec une majorité de GE dans le NA latéral et une majorité de GI dans le NA médian (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Répartition des neurones gluco-sensibles au niveau du MBH

D'après (Song et al., 2001; Wang et al., 2004)

	Neurones GE	Neurones GI
VMN	14 à 19%	3 à 14%
NA région latérale	13%	1%
NA région médiane	4%	14%

Les neurones GE/GI du MBH ont été bien mieux caractérisés à ce jour que les autres populations de neurones GS hypothalamiques.

a. Les neurones GI

Le neuromédiateur :

Plusieurs études montrent que tous les neurones GI du NA sont des **neurones NPY** (Fioramonti et al., 2007; Muroya et al., 1999; Murphy et al., 2009a). En revanche, seulement 40% des neurones NPY du NA sont des neurones GI (Fioramonti et al., 2007).

La nature des neurones GI du VMN est inconnue. L'inhibition du transporteur vésiculaire de glutamate spécifiquement dans les neurones exprimant SF-1 (steroidogenic factor-1) du VMN altère la réponse contre-régulatrice à l'hypoglycémie. Cela suppose que certains neurones SF-1 soient GS et par voie de conséquence les neurones GI pourraient être des **neurones glutamatergique** (Tong et al., 2007), mais cela reste à être démontré. Un des projets de notre équipe est de déterminer si les neurones SF-1 sont des neurones GS. En accord avec cette hypothèse, nos données préliminaires suggèrent que 50% des neurones SF-1 sont GS (GE et GI).

Les mécanismes moléculaires :

Récemment, de nombreux progrès ont été faits dans la compréhension des mécanismes de détection du glucose des neurones GI du MBH. La GK, l'AMPK, la nNOS (NO synthase neuronale), la sGC (guanylase cyclase soluble) et le canal CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator protein) seraient tous nécessaires (Fioramonti et al., 2011).

L'implication d'un transporteur GLUT spécifique est incertaine et reste à être démontrée. Toutefois, 22% des neurones GI du VMN expriment GLUT2, 96% expriment GLUT3 et 63% expriment GLUT4 (Kang et al., 2004).

La **GK** est exprimé dans 40% des neurones GI du VMN (Kang et al., 2004). La modulation de l'activité de la GK altère la capacité des neurones GI du MBH à détecter les variations de la concentration de glucose (Dunn-Meynell et al., 2002; Kang et al., 2006). Ces résultats montrent que, comme dans les neurones GE, la GK est impliquée dans la détection du glucose de certains neurones GI du VMN.

L'**AMPK** est un acteur clef de la détection du glucose des neurones GI (Canabal et al., 2007a, 2007b; Murphy et al., 2009b). La diminution de la concentration de glucose diminuerait le ratio AMP/ATP ce qui activerait l'AMPK. L'activation de l'AMPK mime, alors que son inhibition inhibe, la réponse à la diminution de la concentration de glucose des neurones GI du MBH (Mountjoy and Rutter, 2007; Murphy et al., 2009b).

Le groupe du Dr Routh a montré que la **nNOS** est nécessaire à la réponse au glucose des neurones GI du MBH. L'AMPK phosphoryle et active la nNOS dans les neurones GI (Canabal et al., 2007a; Murphy et al., 2009b). Du monoxyde d'azote (NO) est alors produit dans les neurones GI en réponse à la diminution de la concentration de glucose (Canabal et al., 2007a). Cette production est une étape fondamentale dans la réponse au glucose de ces neurones. En effet, chez les souris déficientes en nNOS, les neurones GI ne sont pas retrouvés (Fioramonti et al., 2010). De plus, l'inhibition de la nNOS altère la réponse au glucose des neurones GI (Murphy et al., 2009b). Une fois produit, le NO se lie à son récepteur, la guanylase cyclase soluble (**sGC**), qui est présent dans le MBH (Fioramonti et al., 2013; Murphy et al., 2009b). La sGC augmente alors la production de GMP cyclique (cGMP). De façon intéressante, la voie de signalisation NO-sGS-cGMP, permettrait aussi d'amplifier l'activité de l'AMPK dans les neurones GI du VMN (Murphy et al., 2009b).

Bien que les canaux K_{ATP} soient présents et fonctionnels dans les neurones GI du MBH, leur activation électrique en réponse à la diminution de la concentration de glucose est

corrélée à la fermeture d'un canal présentant une conductance Cl^- (Fioramonti et al., 2007; Song et al., 2001; Wang et al., 2004). Il s'agit probablement du **canal CFTR** (cystic fibrosis transmembrane regulator). Il a été montré que ce canal est phosphorylé par l'AMPK dans le MBH (Murphy et al., 2009b). De plus, les neurones GI du MBH perdent leur capacité à détecter la diminution de la concentration de glucose en présence de gemfibrozil, un inhibiteur du canal CFTR (Fioramonti et al., 2007; Murphy et al., 2009b). Plus d'études sont nécessaires pour confirmer l'implication du canal CFTR dans la réponse au glucose des neurones GI du MBH. D'autant plus qu'il est suggéré qu'un canal K^+ pourrait aussi être impliqué (comme les neurones GI à orexine du LH) (Williams and Burdakov, 2009).

Les mécanismes de détection du glucose des neurones NPY-GI du NA sont peu connus. Néanmoins, comme les neurones GI du VMN, ils utilisent un canal à conductance Cl^- pour détecter le glucose (Fioramonti et al., 2007). L'implication de l'AMPK et du NO dans la détection du glucose des neurones NPY-GI reste à être démontrée. Ceci étant, il semble peu probable que le NO fasse parti des mécanismes de détection du glucose des neurones NPY-GI car la nNOS ne serait pas exprimée (Leshan et al., 2012) dans ces neurones. La voie de signalisation AMPK/NO/sGS est donc spécifique des neurones GI du VMN.

Les mécanismes moléculaires de détection de la diminution de la concentration de glucose des neurones GI du VMN sont illustrés dans la figure ci-dessous (**Figure 12**).

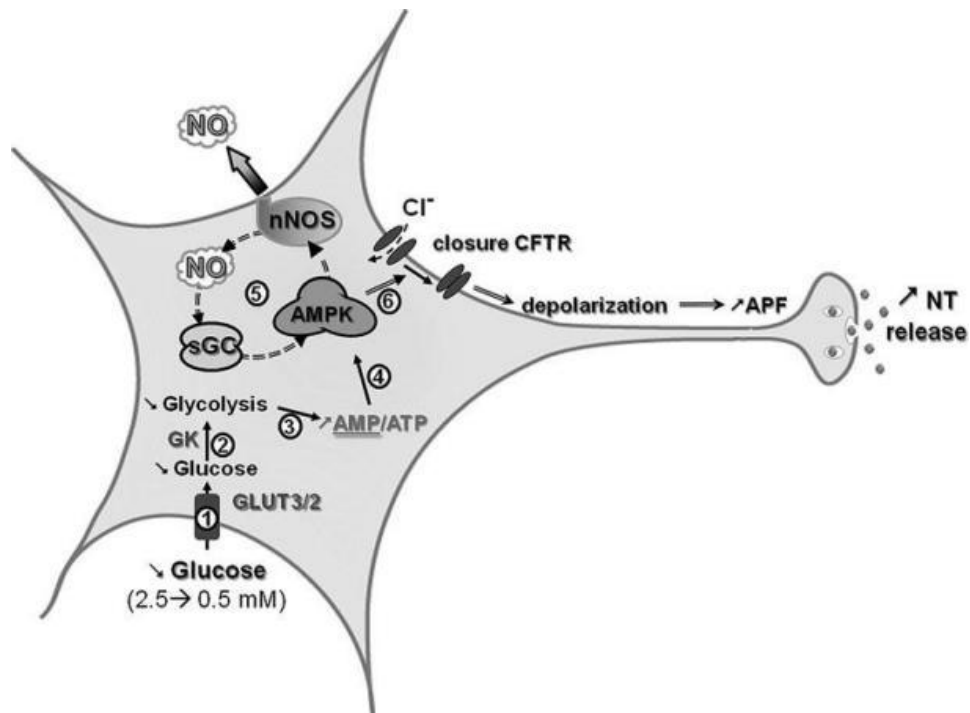


Figure 12 : Mécanismes moléculaires de détection du glucose des neurones GI du VMN

La diminution de la concentration de glucose induit une diminution de la glycolyse et une diminution du ratio ATP/AMP. L'augmentation des taux intracellulaire d'AMP active l'AMPK. L'activation de l'AMPK induit la phosphorylation et l'activation de la nNOS qui produit alors du NO. Le NO se lie sur son récepteur, la GC soluble, qui amplifie l'activation de l'AMPK. L'amplification de l'activité de l'AMPK ferme le canal CFTR. La fermeture du CFTR dépoliarise le neurone GI, conduisant à une augmentation de la fréquence des potentiels d'action et de la libération du neurotransmetteur. D'après (Fioramonti et al., 2011).

De façon intéressante, une population particulière de neurones GI a été identifiée dans le NA. Ces neurones sont inhibés par une **forte** concentration de glucose (saut de 5 à 20 mM) ce qui leur a valu le nom de **neurones HGI « High Glucose-Inhibited »** (Fioramonti et al., 2004). Environ 7% de neurones HGI sont présents dans le NA. Hormis leur existence, rien n'est connu sur ces neurones.

Les rôles physiologiques :

Actuellement, il n'a hélas pas encore été découvert de marqueurs moléculaires spécifiques des neurones GS, ce qui rend l'étude de leurs rôles physiologiques difficile. Néanmoins, les neurones GI du MBH détectent une diminution de la concentration de glucose de 2,5 à 0,1 mM, suggérant qu'ils seraient plutôt impliqués dans la détection de l'hypoglycémie (Song et al., 2001) et par voie de conséquence, dans la stimulation de la CRR et/ou dans la prise alimentaire. Seules des **corrélations** entre l'altération de l'expression ou

l'activité des acteurs moléculaires impliqués dans la réponse au glucose des neurones GI et l'altération de la CRR ont été faites.

Dans le MBH, l'activité de l'AMPK est augmentée en réponse à l'hypoglycémie induite par l'insuline (Han et al., 2005) ou à une glucopénie centrale (Alquier et al., 2007), comme pour les neurones GI. L'AICAR, un activateur de l'AMPK, active les neurones GI du MBH. De façon intéressante, son infusion dans le MBH amplifie la CRR en conditions d'hypoglycémie (McCrimmon et al., 2006). Enfin, la stimulation de l'AMPK dans le MBH amplifie la CRR (McCrimmon et al., 2004) alors que son inhibition ou l'inhibition de son expression l'atténue (McCrimmon et al., 2008).

Nous avons vu que le NO est indispensable à la détection du glucose des neurones GI du VMN, *in vitro*. Il a été démontré *in vivo* que le NO produit dans le MBH joue un rôle clef dans l'initiation de la CRR. La souris déficiente en nNOS, où les neurones GI ne sont pas trouvés dans le MBH, présente une altération de la CRR (Fioramonti et al., 2010).

Il est bien établi que les neurones NPY du NA contrôlent la prise alimentaire. Après un jeûne, la libération de NPY et la sensibilité au glucose des neurones GI-NPY en réponse à la diminution de la concentration de glucose sont augmentées (Murphy et al., 2009a). Ceci implique l'AMPK. En effet, l'expression d'un dominant négatif de l'AMPK dans l'hypothalamus inhibe la prise alimentaire alors que son activation constitutive la stimule (Minokoshi et al., 2004). En accord avec un rôle des neurones GI dans le contrôle de la prise alimentaire, la signalisation hypothalamique du NO est impliquée dans la régulation de la prise alimentaire. En effet, l'infusion icv de NPY stimule l'activité de la nNOS hypothalamique et augmente la prise alimentaire (Morley et al., 1999, 2011).

L'ensemble de ces données suggère que les neurones GI du MBH jouent un rôle important dans la détection de l'hypoglycémie et dans le contrôle de la CRR (neurones GI du VMN) et l'initiation de la prise alimentaire (neurones GI du NA).

b. Les neurones GE

Les neuromédiateurs

Les neuromédiateurs exprimés par les neurones GE du MBH sont inconnus et controversés.

En ce qui concerne le NA, Ibrahim et collaborateurs montrent que 80% des neurones POMC sont activés par l'augmentation de la concentration de glucose (Ibrahim et al., 2003). En accord, la diminution de la concentration de glucose de 2 à 0,1 mM inhibe les neurones POMC (Claret et al., 2007). De façon contradictoire, les neurones GE ne sont pas immunopositif pour POMC (Wang et al., 2004). Les neurones GE se concentrent le long de la bordure ventro-latérale du VMN (Cotero and Routh, 2009; Wang et al., 2004) alors que les neurones POMC sont plutôt localisés dans le NA ventromédian. De plus, notre équipe a montré par électrophysiologie que l'activité électrique des neurones POMC ne serait pas altérée par une augmentation ou diminution de la concentration en glucose (Fioramonti et al., 2007). Enfin, l'injection de glucose dans la carotide n'augmente pas le taux d'expression de c-fos, un marqueur d'activation neuronale, dans les neurones POMC (Fioramonti et al., 2007). Davantage d'études sont donc nécessaires pour déterminer l'identité des neurones GE du NA. Néanmoins, ils sont bien impliqués dans le circuit à mélanocortine POMC/NPY puisque le NPY inhibe alors que la α -MSH stimule les neurones GE (Wang et al., 2004).

La nature du neuromédiateur des neurones GE du VMN est quant à elle inconnue. Toutefois, Kang et collaborateurs montrent par RT-PCR post-imagerie calcique que 56% des neurones GE du VMN expriment l'acide glutamique décarboxylase, l'enzyme impliqué dans la synthèse de **GABA** (Kang et al., 2004). De plus, nous avons vu que des données préliminaires, obtenues au laboratoire montrent que certains neurones SF-1 glutamatergiques sont GE. Les neurones GE du VMN pourraient donc être des neurones GABAergiques et glutamatergiques, mais ceci reste à être démontré.

Les mécanismes moléculaires:

Les mécanismes moléculaires de détection du glucose des neurones GE du MBH sont les mieux connus. Un certain nombre d'**analogies avec la cellule β** du pancréas a pu être mis en évidence.

Les neurones GE du MBH utilisent la GK et le canal K_{ATP} (Figure). La présence des **canaux K_{ATP}** dans les neurones GE du MBH a été démontré par PCR sur cellule unique (Kang et al., 2004; Lee et al., 1999). L'équipe de Ashford a été la toute première à montrer que les neurones GE utilise le canal K_{ATP} pour détecter les variations de la concentration de glucose extracellulaire par électrophysiologie (Ashford et al., 1990). Depuis, diverses approches de biologie moléculaire, pharmacologie et souris transgéniques ont conforté ces résultats (Kang et al., 2004; Lee et al., 1999; Miki et al., 2001; Song et al., 2001; Yang et al.,

1999). Par exemple, les souris déficientes pour la sous-unité Kir6.2 du canal ne possèdent plus de neurone GE dans le VMN (Miki et al., 2001), suggérant que ce canal joue un rôle important dans la détection hypothalamique du glucose. Le transporteur **GLUT2** et la **GK** sont aussi exprimés dans les neurones GE (Dunn-Meynell et al., 2002; Kang et al., 2004). Notons que le rôle de GLUT2 dans la détection du glucose des neurones GE du MBH n'a pas été clairement démontré. En revanche, il est établi que la GK régule la capacité des neurones GE du MBH à détecter le glucose (Dunn-Meynell et al., 2002; Kang et al., 2004, 2006).

Claret et collaborateurs ont montré que l'AMPK est nécessaire à la sensibilité au glucose des neurones POMC du NA (Claret et al., 2007). En revanche, la détection du glucose des neurones GE du VMN n'implique pas l'AMPK (Cotero and Routh, 2009).

Les mécanismes moléculaires de détection du glucose des neurones GE dépendant des canaux K_{ATP} sont illustrés dans la figure ci-dessous (**Figure 13**).

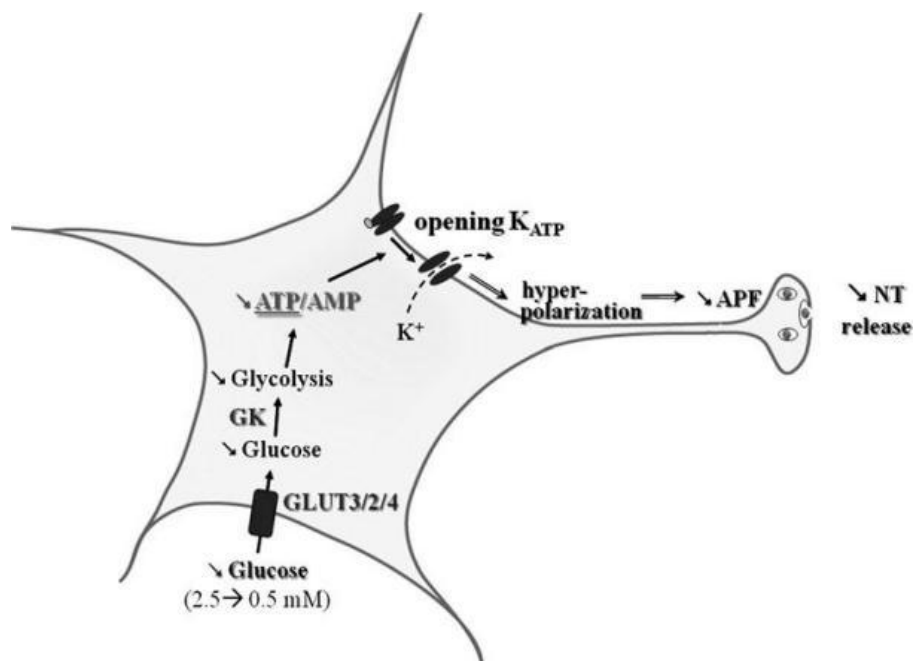


Figure 13 : Mécanismes moléculaires de détection du glucose des neurones GE du MBH dépendant de la métabolisation du glucose

La diminution de la concentration de glucose induit une diminution de la glycolyse et une diminution du ratio ATP/AMP. La diminution intracellulaire d'ATP ouvre les canaux K_{ATP} qui hyperpolarisent le neurone. Il en résulte une diminution de la fréquence des potentiels d'action (APF) et de la libération du neurotransmetteur (NT release). D'après (Fioramonti et al., 2011).

De façon intéressante, 25% des neurones GE du VMN exprime le co-transporteur du glucose et du Na^+ **SGLT1** qui couple l'entrée du glucose avec la dépolarisation membranaire

(Kang et al., 2004). Ces résultats suggèrent qu'il existerait d'autres mécanismes de détection du glucose indépendants des canaux K_{ATP} pour les neurones GE du MBH. En accord, une population distincte de neurones GE a été identifiée dans le NA. Ces neurones sont activés par une **forte** augmentation de la concentration de glucose (saut de 5 à 20 mM) ce qui leur a valu le nom de **neurones HGE « High Glucose-Inhibited »**. Environ 19% des neurones du NA seraient des neurones HGE (Fioramonti et al., 2004) (**Figure 14**).

A Neurones HGE (High glucose-excited)

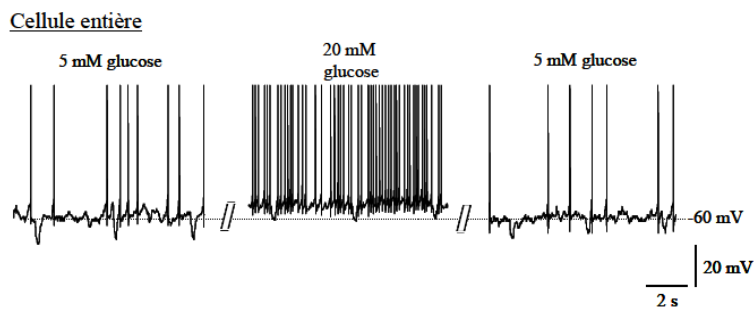


Figure 14 : Les neurones HGE du NA

Enregistrement d'un neurone excité (HGE) par une augmentation de 5 à 20 mM de la concentration extracellulaire en glucose. D'après (Fioramonti et al., 2004)

De façon intéressante, dans cette gamme de concentration de glucose élevée, les canaux K_{ATP} sont déjà fermés, suggérant que les neurones HGE détectent l'augmentation de la concentration de glucose par un **mécanisme K_{ATP} indépendant**. En effet, l'excitation des neurones HGE en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose est indépendante des canaux K_{ATP} et repose sur l'ouverture **d'un canal présentant une conductance cationique non sélective (CCNS)** (Fioramonti et al., 2004; Yang et al., 1999). La nature du canal mise en jeu et la voie de signalisation permettant son ouverture sont inconnues. **Mon travail de thèse a consisté à déterminer les mécanismes moléculaires de détection du glucose de neurones HGE.** Notre l'équipe a montré que l'augmentation de la concentration de glucose de 5 à 20mM engendre une production de mEAOs sur des coupes d'hypothalamus. De plus, l'injection de glucose par la carotide en direction du cerveau engendre, chez le rat, une augmentation de la production des mEAOs, une augmentation de l'activité électrique globale du MBH et enfin une sécrétion rapide et transitoire d'insuline en périphérie. Ces effets sont mimés par des inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale (entraînant une production de mEAOs) et sont inhibés en présence d'antioxydants ou d'un découplant (CCCP), montrant l'implication des mEAOs dans les mécanismes de détection de l'augmentation de la concentration de glucose (Leloup et al., 2006). Les EAOs pourraient être impliqués dans la réponse au glucose des neurones HGE. **Ainsi, le canal mis en jeu dans la**

réponse au glucose des neurones HGE, en plus d'avoir une CCNS, pourrait être sensible aux EAOs, ce qui a été l'hypothèse de mon sujet de thèse.

Les canaux Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) appartiennent à la famille des canaux ioniques à CCNS et certains d'entre eux sont activés par les EAOs. Leur rôle dans le contrôle de l'homéostasie énergétique est en pleine émergence. Néanmoins, rien n'est connu quant à un rôle des canaux TRPC sur la réponse au glucose des neurones hypothalamiques. **Les canaux TRPC représentent un candidat potentiel dans l'identité du canal impliqué dans la réponse à l'augmentation de la concentration de glucose des neurones HGE, mon travail de thèse a consisté à répondre à cette question.**

Les rôles physiologiques:

Comme pour les neurones GI, des **corrélations** entre l'altération de l'expression ou l'activité des acteurs moléculaires impliqués dans la réponse au glucose des neurones GE et l'altération de la CRR et de la prise alimentaire ont été faites. Nous avons vu que les canaux K_{ATP} et la GK sont des acteurs clefs dans la détection du glucose des neurones GE du MBH.

Miki et collaborateurs montrent que chez la souris génétiquement invalidées pour les canaux K_{ATP} : 1) les neurones GE du MBH ne sont pas retrouvés et 2) la CRR est altérée (diminution de la production de glucagon et absence d'effet sur la sécrétion d'adrénaline) et la prise alimentaire est fortement diminuée (Miki et al., 2001). De plus, la modulation pharmacologique de l'activité des canaux K_{ATP} , *in vivo*, altère la CRR (Evans et al., 2004; McCrimmon et al., 2005). Enfin, il a été montré, pour la première fois chez l'homme, que l'administration orale de diazoxide (qui ouvre les canaux K_{ATP}), chez le patient diabétique de type 1 améliore significativement la sécrétion de catécholamines en réponse à l'hypoglycémie (George et al., 2015).

L'activation pharmacologique de la GK, abolit de 40-62% la sécrétion d'adrénaline, de noradrénaline et de glucagon en réponse à l'hypoglycémie induite par l'insuline. A l'inverse, l'inhibition pharmacologique ou génétique de la GK augmente la sécrétion d'adrénaline (Levin et al., 2008).

L'ensemble de ces données suggère que les neurones GE du MBH jouent un rôle clef, au travers des canaux K_{ATP} et la GK, dans l'initiation de la CRR et de la prise alimentaire. Notons toutefois que les canaux K_{ATP} sont ubiquitaires et ne sont pas spécifiques des neurones GE du MBH. En revanche, la GK semble plus spécifique de neurones GS (Stanley et al.,

2013) mais elle est aussi exprimé dans les neurones GI et les cellules gliales sensibles au glucose du MBH. On ne sait rien quant aux rôles physiologiques des neurones HGE du NA. Néanmoins, puisqu'ils détectent de fortes concentrations de glucose, ils pourraient être impliqués dans les réponses physiologiques observées lors de l'hyperglycémie telles que la diminution de la prise alimentaire, la sécrétion d'insuline et/ou l'inhibition de la production hépatique de glucose.

Pour résumer, la capacité de l'hypothalamus à détecter l'hypoglycémie et l'hyperglycémie est liée à l'existence de populations hétérogènes de neurones GS ayant des mécanismes de détection du glucose différents. Nous allons voir que les cellules gliales, les astrocytes et les tanocytes, participent aussi à la détection hypothalamique du glucose.

II.2.3.2. Les astrocytes

Les astrocytes entourent quasiment tous les capillaires cérébraux avec leurs «pieds astrocytaires». Cette position stratégique a alors suggéré un rôle métabolique important. Depuis quelques années des études expérimentales ont permis de démontrer que les astrocytes assurent la **fourniture énergétique** aux neurones, l'activité de ces derniers étant hautement dépendante de ce transfert (Pellerin and Magistretti, 2012). En effet, lors d'une augmentation de la concentration en glucose extracellulaire, les astrocytes captent rapidement ce glucose (Prebil et al., 2011) et peuvent le stocker sous forme de glycogène. Les astrocytes sont principalement des cellules glycolytiques exprimant les enzymes impliquées dans la glycolyse et la glycogénolyse alors que les neurones sont plutôt des cellules oxydatives. La glycolyse et la glycogénolyse astrocytaire forment principalement du **lactate** qui est ensuite exporté jusqu'aux neurones, via les transporteurs des monocarboxylates (MCT), pour former du pyruvate, renforçant leur rôle de soutien énergétique. Il a été montré, *in vivo*, que les neurones utilisent préférentiellement le lactate plutôt que le glucose pour leur métabolisme (Wyss et al., 2011).

En plus d'un rôle d'appui énergétique, les astrocytes sont des **senseurs du glucose**. Ils expriment les canaux **K_{ATP}** et la **GK** (Millán et al., 2010; Zawar et al., 1999). Notre groupe a été le premier à montrer que **GLUT2** était majoritairement exprimé dans les astrocytes plutôt que dans les neurones hypothalamiques (Arluison et al., 2004a, 2004b; Leloup et al., 1994).

L'inhibition de GLUT2 dans l'hypothalamus altère la détection hypothalamique du glucose. En effet, l'injection d'antisens de GLUT2 dans le MBH inhibe la sécrétion d'insuline induite par une injection intracarotidienne de glucose (Leloup et al., 1998). De plus, l'augmentation de la concentration cérébrale de glucose augmente l'expression de c-Fos, un marqueur d'activation, dans les astrocytes hypothalamiques (Guillod-Maximin et al., 2004). Une étude élégante de l'équipe de Thorens montre que la réexpression de GLUT2 par transgénèse spécifiquement dans les astrocytes mais pas dans les neurones, chez la souris GLUT2-déficiente (modèle *ripglut1 ; glut2^{-/-}*), restaure la détection hypothalamique de l'hypoglycémie (Marty et al., 2005). Dans cette étude, le rôle de GLUT2 astrocytaire a été étudié dans un contexte de glucoprivation et l'altération de la sécrétion de glucagon et la détection centrale de l'hyperglycémie n'ont pas été testées. Dans une seconde étude, la souris déficiente pour GLUT2 dans les astrocytes présente un défaut dans le contrôle de la prise alimentaire en réponse à un test de réalimentation et la prise alimentaire n'est ni diminuée par le glucose ni augmentée par le 2-DG (Bady et al., 2006). L'ensemble de ces données suggère un rôle clé de GLUT2, dans les astrocytes hypothalamiques, dans la détection de centrale de l'hypoglycémie et de l'hyperglycémie.

La démonstration directe que les astrocytes du MBH sont des cellules glucosensibles n'a pas clairement été mise en évidence. Le groupe de Rutter a montré que l'augmentation de la concentration de glucose induit une augmentation des taux d'ATP et de NADPH dans les astrocytes hypothalamiques (Ainscow et al., 2002). Toutefois, ces résultats ne sont en rien une preuve de la détection directe du glucose mais reflètent davantage la métabolisation de ce substrat dans l'astrocyte. En revanche, il a été montré que les astrocytes du NTS sont activés par une diminution de la concentration de glucose ou une glucoprivation par le 2-DG se traduisant par une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} (McDougal et al., 2011). Davantage d'études sont donc nécessaires pour déterminer si les astrocytes du MBH sont GS et comprendre les voies de signalisation impliquées.

II.2.3.3. Les tanycytes

Les tanycytes sont des cellules gliales présentes à l'interface entre le sang, le LCR et les noyaux hypothalamiques régulant la prise alimentaire. Ceci a incité de nombreux auteurs à suggérer que ces cellules joueraient un rôle dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Il existe quatre sous-types de tanycytes, en fonction de leur localisation et de leurs propriétés.

Les tanocytes $\alpha 2$ bordent le ventricule situé face au VMN et DMH et se projettent dans ces mêmes noyaux alors que les tanocytes $\alpha 1$ bordent le ventricule situé face au NA. Les tanocytes $\beta 1$ et $\beta 2$ présentent des prolongements dans le MBH et l'EM (**Figure 15**). Les tanocytes sont polarisés : - un pôle apical au contact du LCR et - un pôle basal qui atteint les différents noyaux hypothalamiques et des micro-vaisseaux parfois dépourvue de BHE dans l'EM. De façon intéressante, les tanocytes à la périphérie du NA n'expriment pas certaines protéines de jonction et celles exprimées présentent un pattern d'expression désorganisé suggérant que ces cellules sont plus « perméables » au passage de molécules en provenance du LCR, que les autres tanocytes bordant le 3^{ème}V (Mullier et al., 2010).

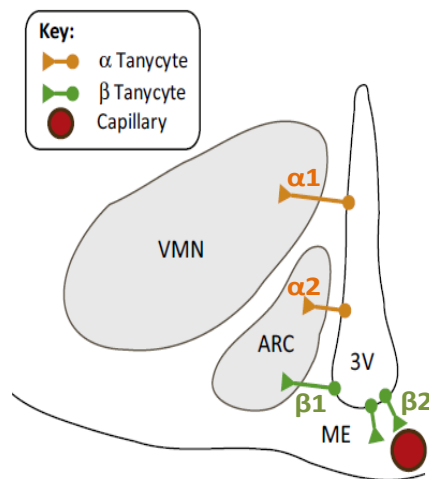


Figure 15 : Localisation des tanocytes

Les tanocytes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont localisés dans la partie ventrale du 3^{ème} V (vert). Les tanocytes $\beta 1$ et $\beta 2$ émettent des prolongements dans le NA (ARC) et vers les capillaires présents dans l'EM, respectivement (orange). Modifié d'après (Steinbusch et al., 2015).

Les tanocytes expriment **GLUT2**, la **GK** et certaines sous-unités de canaux K_{ATP} (Orellana et al., 2012). Nous avons vu précédemment que ces acteurs moléculaires sont fortement impliqués dans les mécanismes de détection du glucose de la cellule β , suggérant que les tanocytes pourraient avoir un rôle de détection du glucose au niveau hypothalamique. La première preuve, bien que indirecte, a montré que la destruction des tanocytes bordant le 3^{ème} V est suffisante pour modifier la glycémie et la PA chez des rats (Sanders et al., 2004). De plus, les jonctions serrées entre les tanocytes se réorganisent, augmentant les échanges entre le LCR et le NA en réponse à une diminution de glucose, ceci dans le but d'assurer un apport constant de glucose au cerveau (Langlet et al., 2013).

Ce n'est que récemment que la détection directe du glucose par les tanocytes a été démontrée, *in vitro*. Les mécanismes moléculaires mis en jeu restent controversés. Toutefois les études s'accordent toutes sur la mise en jeu d'une **signalisation purinergique** et une

augmentation du Ca^{2+} intracellulaire (vagues calciques) en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose (Frayling et al., 2011; Orellana et al., 2012). Plusieurs modèles de détection du glucose sont proposés :

- Orellana et collaborateurs (**Figure 16A**) propose l'implication de la voie de signalisation GLUT/GK/canaux K_{ATP} . Par un mécanisme inconnu, ceci permettrait l'ouverture des hémicanaux Connexine43, la libération d'ATP puis l'activation des récepteurs purinergiques P2Y1, et enfin l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire. La propagation du signal vers les tanocytes voisins se réalise via des jonctions GAP (Orellana et al., 2012).

- De façon intéressante, Frayling et collaborateurs montrent que les analogues non métabolisables du glucose induisent aussi le signal Ca^{2+} nécessaire à la réponse au glucose des tanocytes. Ceci suggère que le modèle de détection du glucose de la cellule β ne peut être appliqué aux tanocytes. De plus, l'augmentation de Ca^{2+} dans la cellule β est due à l'ouverture des canaux calciques voltages-dépendants, absents dans les tanocytes. Frayling propose alors deux autres modèles (**Figure 16B**) :

a) Le premier suggère que le glucose soit transporté dans la cellule par un co-transporteur de glucose dépendant du Na^+ . L'accumulation de Na^+ inverserait l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ induisant un influx de Ca^{2+} dans le tanocytes qui déclencherait la libération d'ATP. L'ATP agirait ensuite sur les récepteurs P2Y1 pour amplifier le signal Ca^{2+} .

b) La seconde hypothèse est similaire à la première mais propose que le glucose et ses analogues agissent sur un récepteur couplé à une protéine G pour déclencher la libération d'ATP puis l'activation du récepteur P2Y1 (Frayling et al., 2011).

Notons que l'équipe de Frayling a réalisé ses études sur des tanocytes α en tranche alors que l'équipe d'Orellana a étudié des cultures enrichies en tanocytes β 1. Ainsi, de multiples mécanismes de détection de l'augmentation de la concentration de glucose existeraient dans ce type cellulaire. La détection de l'hypoglycémie par les tanocytes n'a pas encore été étudiée. A ce jour, le rôle spécifique des tanocytes *in vivo* dans la détection du glucose nécessite davantage d'investigations.

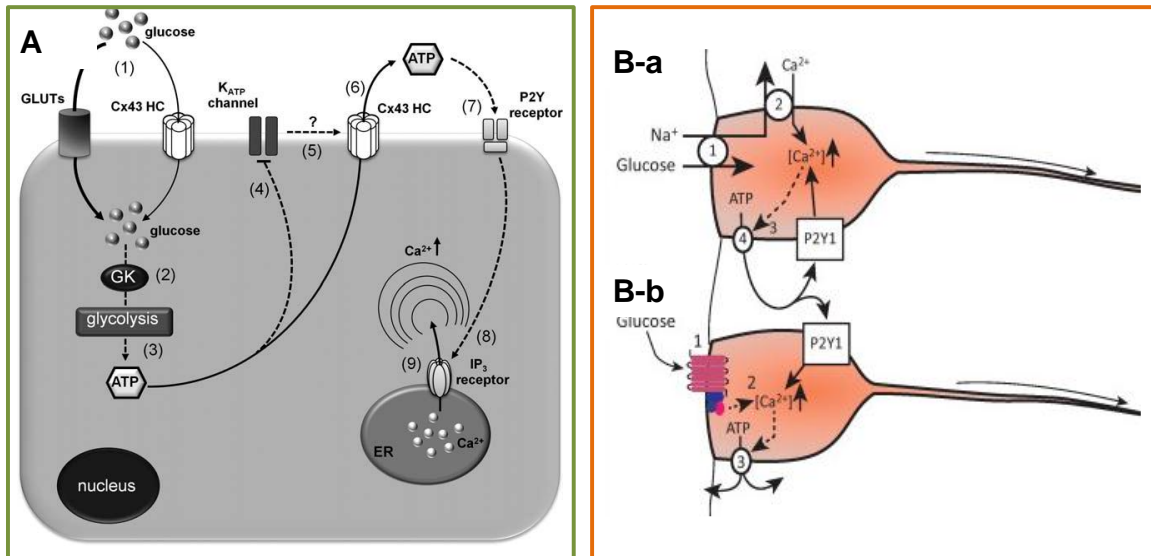


Figure 16 : Les hypothèses de la détection de l'augmentation de la concentration de glucose par les tanycytes du MBH

- A) Lors de l'augmentation de la concentration extracellulaire de glucose, le glucose entre (1) principalement par les transporteurs GLUTs et dans une moindre mesure par les héli-canaux Cx43, conduisant à la phosphorylation du glucose par la GK (2). L'ATP produit par la glycolyse (3) induit la fermeture des canaux K_{ATP} (4). Cet événement promeut l'ouverture des héli-canaux Cx43 par un mécanisme inconnu (5). La libération d'ATP via les hémicanaux (6) active les récepteur purinergique P2Y (7) et induit la formation d'inositol triphosphate (IP₃) cytosolique (8), qui favorise la libération de Ca²⁺ stocké dans le réticulum endoplasmique (9), augmentant la [Ca²⁺]_i. D'après (Orellana et al., 2012).
- B) a) Le glucose est capté par un cotransporteur de glucose lié au Na⁺ (1), l'accumulation de Na⁺ résultante inverse l'échangeur Na⁺-Ca²⁺ (2), induisant une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺. Cette augmentation conduit, par un mécanisme inconnu (3), à la libération d'ATP (4), qui active les récepteurs P2Y1 résultant en une [Ca²⁺]_i via la mobilisation des stocks internes. b) Le second modèle est similaire sauf que le glucose et ses analogues agissent sur un ou plusieurs récepteurs couplé(s) à une protéine G (1) pour mobiliser le Ca²⁺ intracellulaire directement (2), qui conduit de nouveau à la libération d'ATP(4) et l'activation des récepteurs P2Y1. D'après (Bolborea and Dale, 2013).

Une question que l'on peut se poser quant aux études sur la détection hypothalamique du glucose est la suivante : les neurones GS détectent-ils *directement* les variations de la concentration de glucose ou bien *indirectement* par l'intermédiaire d'une autre cellule? Les équipes des Dr Burdakov, Dr Routh et Dr Fioramonti sont les seuls à avoir bloqué la transmission synaptique (via la tétradotoxine ou TTX) dans les études réalisées *ex vivo* en électrophysiologie. Néanmoins, la TTX ne permet pas d'exclure une communication neurone-cellule gliale. Les études réalisées *in vitro* sur culture de neurones isolés par les équipes du Dr Levin et Dr Routh ont permis d'apporter la preuve irréfutable que les neurones GE et GI du MBH détectent directement les variations de la concentration de glucose. En ce qui concerne les régions cérébrales extra-hypothalamiques, la détection directe du glucose par les neurones GS n'a pas été vérifiée. Nous allons voir que la détection hypothalamique de glucose ne serait

pas exclusivement neuronale et une détection indirecte séquentielle par les cellules gliales serait aussi présente.

II.2.4. Couplage glie/neurones dans la détection hypothalamique du glucose

Les neurones hypothalamiques ne sont pas en contact direct avec le sang ou le CSF, contrairement aux cellules gliales (tanocytes et astrocytes) qui répondent aux variations de la concentration de glucose. Un couplage métabolique entre les neurones GS et les cellules gliales a alors été proposé dans la détection hypothalamique du glucose. En accord avec cette remarque, un lien fonctionnel entre les tanocytes et les neurones glucosensibles du NA a été montré (Coppola et al., 2007). Le(s) messenger(s) permettant aux cellules gliales de moduler l'activité des neurones GS ne sont pas totalement connus. Toutefois des études sont en faveur de différents candidats : le **lactate**, l'**ATP** et/ou les **endozépines**.

Le lactate : En réponse à l'augmentation de la concentration de glucose, les tanocytes et les astrocytes libèrent du lactate (Cortes-Campos et al., 2013; Pellerin and Magistretti, 2012). Les neurones GS et les astrocytes expriment des transporteurs des monocarboxylates (MCT) permettant le passage de lactate (Pierre and Pellerin, 2005) et son transfert à une autre cellule. De façon intéressante, certains neurones GE du MBH et du LH sont directement sensibles au lactate (Song and Routh, 2005; Venner et al., 2011; Yang et al., 1999). L'équipe de Rossetti a élégamment démontré en 2005, *in vivo*, que le lactate est particulièrement important dans la détection hypothalamique du glucose. Ainsi, une injection de lactate au niveau hypothalamique a les mêmes effets qu'une injection de glucose sur l'inhibition de la production hépatique de glucose. De plus, l'inhibition hypothalamique de la LDH (lactate déshydrogénase) bloque les effets du glucose injecté dans l'hypothalamus sur le métabolisme hépatique, alors que la stimulation de la PDH (pyruvate déshydrogénase) reproduit les effets du glucose et du lactate (Lam et al., 2005). Il a également été montré, *in vivo*, que le lactate circulant régule la synthèse de neuropeptides orexigènes et anorexigènes ainsi que la PA, la sécrétion nerveuse d'insuline et la production hépatique de glucose (Allard et al., 2013; Cha and Lane, 2009; Kokorovic et al., 2009; Lam et al., 2008). Ces résultats suggèrent que les cellules gliales pourraient informer les neurones hypothalamiques des variations de la concentration de glucose par l'intermédiaire du lactate.

L'ATP : Nous avons vu que les cellules gliales du MBH libèrent de l'ATP en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose (Frayling et al., 2011; Orellana et al., 2012). De plus, dans l'hypothalamus, l'ATP produit par les cellules gliales contribue directement à la régulation de l'activité neuronale via la stimulation des récepteurs purinergiques P2X (Gordon et al., 2005). De façon intéressante, les récepteurs P2X forment un canal à conductance cationique non sélective comme observé dans la réponse au glucose de neurones HGE. De plus, ils sont présents dans le NA où ont été identifiés les neurones GS (Wakamori and Sorimachi, 2004). Ainsi, l'ATP produit en réponse à l'hyperglycémie pourrait informer les neurones GS hypothalamique des taux de glucose ambiant.

Les endozépinines : Le rôle des endozépinines, incluant Diazepam Binding Inhibitor (DBI) et ses dérivés comme l'octadecaneuropeptide (ODN), dans le contrôle de l'homéostasie glucidique est en pleine émergence. Ces peptides sont spécifiquement produits par les cellules gliales dont les astrocytes et tancytes hypothalamiques (Compère et al., 2010; Tonon et al., 1990). L'infusion de glucose dans le 3^{ème} ventricule induit une augmentation de l'expression du DBI et de la production d'ODN dans le NA (Lanfray et al., 2013). L'injection ODN spécifiquement dans le NA ou le 3^{ème} V diminue fortement la prise alimentaire (Lanfray et al., 2013; do Rego et al., 2007). Ceci est corrélé à l'augmentation de l'expression des ARNm POMC et la diminution des taux d'ARNm NPY dans le NA (Compère et al., 2003). De plus, l'effet anorexigène du glucose est aboli par l'injection icv d'antagoniste de l'ODN. A l'inverse, l'hyperphagie induite par la glucoprivation est supprimée par un agoniste de l'ODN (Lanfray et al., 2013). L'effet anorexigène des endozépinines serait relayé par l'activation des récepteurs MC3/4R (Lanfray et al., 2013). Enfin, l'élévation de la glycémie induite par une injection intrapéritonéale de glucose est fortement réduite chez l'animal ayant reçu de l'ODN dans le 3^{ème} ventricule (Lanfray et al., 2013). Malgré ces données démontrant un rôle clé des endozépinines dans le contrôle de la prise alimentaire et l'homéostasie glucidique les types cellulaires répondant à l'ODN et ses mécanismes d'action sont inconnus. L'activité des neurones du MBH pourrait alors être modulée par les endozépinines en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose. Les endozépinines sont connus comme des antagonistes des récepteurs GABA_A. Néanmoins, leur effet anorexigène semble indépendant des récepteurs GABA_A mais impliquerait plutôt un récepteur métabotrope orphelin (do Rego et al., 2007). **Une partie de ma thèse, en collaboration avec le Dr T. Alquier (Université de Montréal), a consisté à déterminer si l'ODN peut moduler l'activité des neurones du MBH via un mécanisme GABA_A-indépendant.**

La figure ci-dessous résume les mécanismes hypothétiques de détection de l'hyperglycémie aigüe dans le MBH (**Figure 17**).

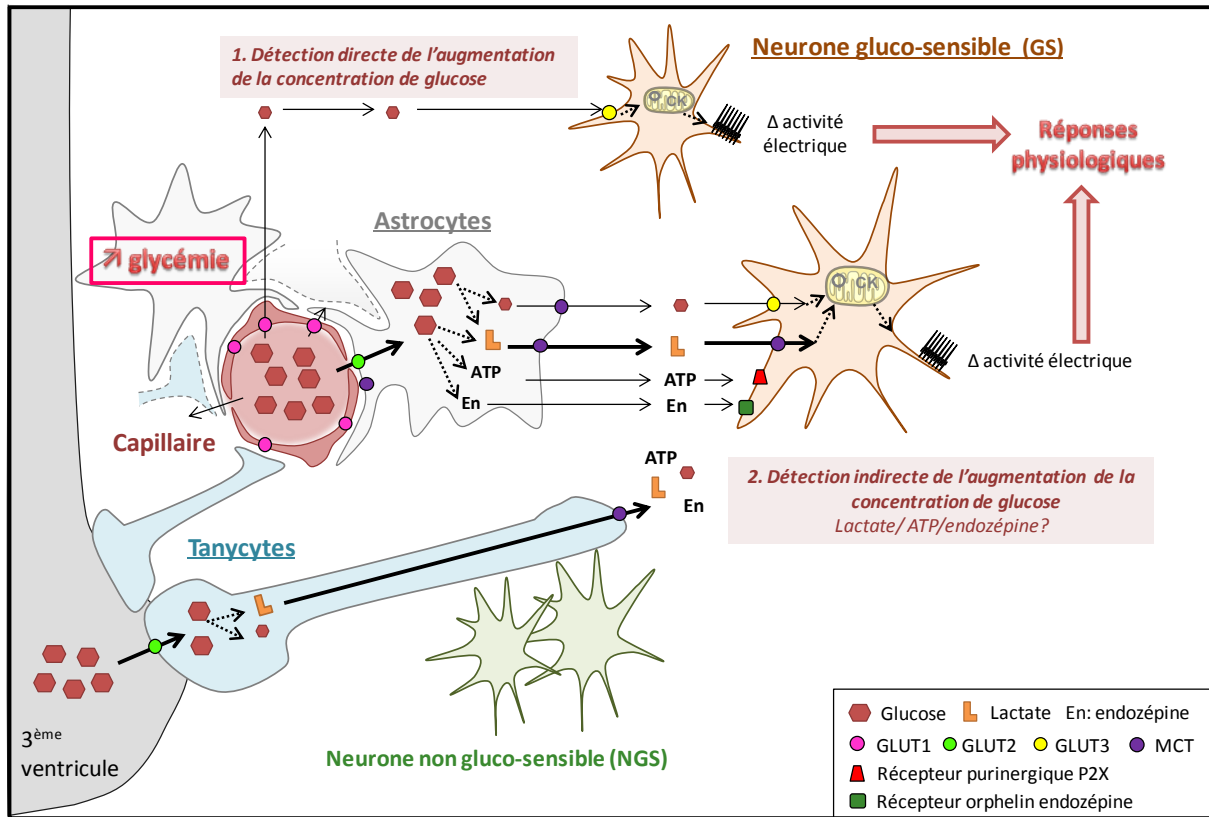


Figure 17 : Mécanismes hypothétiques de détection de l'hyperglycémie aigüe dans le MBH

L'augmentation de la concentration de glucose est détectée dans le MBH par des neurones GS. Le transfert de glucose dans le parenchyme nerveux peut se faire selon 2 processus : 1) le glucose est capté par les cellules gliales astrocytes via les transporteurs GLUT. Les astrocytes sont métaboliquement couplés aux neurones. Le lactate, issu de la métabolisation du glucose par l'astrocytes et les tancytes, est transporté via les transporteurs de monocarboxylate (MCT). Le glucose et le lactate, capturé par les neurones GS via GLUT et MCT respectivement, sont métabolisés et induisent une modification de l'activité des neurones GS conduisant à des réponses physiologiques adaptées pour rétablir la glycémie à sa valeur « basale ». 2) le glucose peut pénétrer passivement dans le parenchyme nerveux à cause de l'absence de jonction serrée entre les cellules endothéliales de certains capillaires sanguins dans le MBH. Le glucose circule dans le compartiment extracellulaire pour atteindre les neurones GS qui détectent l'augmentation de la concentration de glucose. Les astrocytes et tancytes pourraient également produire de l'ATP et/ou des endozépines qui en agissant sur leurs récepteurs, moduleraient l'activité électrique des neurones GS.

II.2.5. Les neurones gluco-sensibles et le diabète

Le **diabète de type 2 (DT2)** est associé à un défaut d'activité des neurones GS. En effet, alors que la réponse inhibitrice à une diminution de la concentration de glucose des neurones GE du MBH issus des souris *db/db* est identique à celle des souris sauvages à 0,1 mM, la réponse inhibitrice à 0,5 mM est bien plus forte chez la souris diabétique (Cotero et

al., 2010). La sensibilité au glucose des neurones GE serait donc plus importante lors d'un DT2. Il est actuellement impossible de savoir avec exactitude si l'altération de la détection du glucose des neurones GE du MBH est une cause ou une conséquence du DT2.

Le rôle des neurones GI dans le DT2 est difficile à prédire. Il a seulement été montré que la CRR et la réponse au glucose des neurones GI en réponse à la diminution de la concentration de glucose est atténuée chez la souris déficiente pour le récepteur à l'insuline (Diggs-Andrews et al., 2010). Il reste à déterminer si les effets de l'insulino-résistance jouent un rôle important dans la détection du glucose des neurones GI du MBH lors du DT2.

Le rat obèse et insulino-résistant Zucker présente une hypersensibilité hypothalamique au glucose (activation électrique des neurones du NA et sécrétion d'insuline pour des doses de glucose sans effet chez le rat non obèse) (Colombani et al., 2009). De façon contradictoire, la détection du glucose par les neurones POMC est abolie chez les souris mises sous régime obésogène et diabétogène (HFD) (Parton et al., 2007).

III. Les canaux Transient Recepteur Potential Canonical (TRPC)

Nous avons vu que le MBH abrite des neurones HGE activés par une forte augmentation de la concentration de glucose, suggéré comme impliqué dans la détection de l'hyperglycémie. Hormis l'implication d'un canal à CCNS dans la réponse au glucose, rien n'est connu sur ces neurones. La découverte du canal exprimé dans les neurones HGE est nécessaire pour comprendre le rôle physiologique de ces neurones dans le contrôle de l'homéostasie glucidique et souligner leur implication dans l'apparition de pathologies comme le diabète. Les **canaux Transient Recepteur Potential Canonical** représentent un candidat potentiel dans l'identité du canal impliqué dans la réponse à l'augmentation de la concentration de glucose des neurones HGE.

III.1. La super famille des canaux TRP

Le génome humain code pour plusieurs centaines de canaux permettant le passage des ions à travers la membrane plasmique. Parmi eux, on trouve les canaux Transient Receptor Potential (TRP). Ils ont été décrits pour la première fois chez *Drosophila Melanogaster* où une mutation sur le gène *trp*, codant pour un photorécepteur, empêchait le maintien d'un potentiel membranaire soutenu en réponse à une stimulation lumineuse (Cosens and Manning, 1969) (**Figure 18**). Vingt ans plus tard, Montell et Rubin clonèrent la séquence du gène *trp* responsable du phénotype chez la Drosophile (Montell and Rubin, 1989).

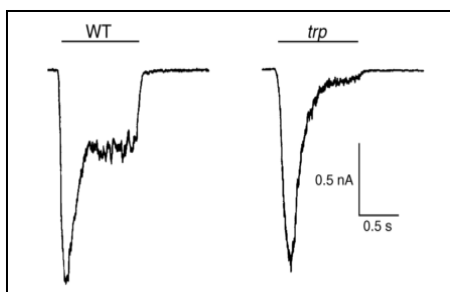


Figure 18 : Les canaux TRP

Enregistrement représentant le courant induit par une stimulation lumineuse intense chez les photorecepteurs en voltage clamps chez les drosophiles contrôles (WT) et *trp* mutante. La réponse des photorecepteurs contrôles est représentée par un pic de réponse et un plateau. La réponse des photorecepteurs *trp* retourne à son état basal durant la stimulation due à un épuisement de l'excitation. D'après (Minke and Selinger, 1996).

Depuis la découverte des canaux TRP, le nombre de publications visant à identifier leurs structures moléculaires, leurs propriétés biophysiques, leurs rôles fonctionnels et leurs implications dans les pathologies est en pleine explosion. Plus de 13000 publications et 2000

revues ont été publiées. Cet engouement pour les canaux TRP est exponentiel depuis les 20 dernières années.

Désormais, la superfamille des TRP regroupe **28 canaux exprimés** et fonctionnels dans divers organismes allant de la levure à l'homme. Les TRP sont classés en sept familles regroupées en deux groupes selon leur structure moléculaire. Le premier groupe présente des homologies de séquence relativement fortes et est constitué des TRP Canonical (TRPC 1 à 7), TRP Mélastatine (TRPM 1 à 8), TRP Vanilloïde (TRPV 1 à 6), TRP Ankyrine (TRPA), TRP N pour « no mechanoreceptor potential C » (NOMPC). Le groupe 2 comprend les TRP Mucopolipine (TRPML), et TRP Polycystine (TRPP). Les canaux TRPN ne sont pas présents chez les mammifères mais sont exprimés chez les invertébrés comme la drosophile et le ver (**Figure 19**). Ils sont tous localisés dans la membrane plasmique des cellules. Seuls les canaux TRPM8 et TRPV1 sont aussi présents dans les membranes internes d'organites tels que le réticulum endoplasmique (Clapham, 2003).

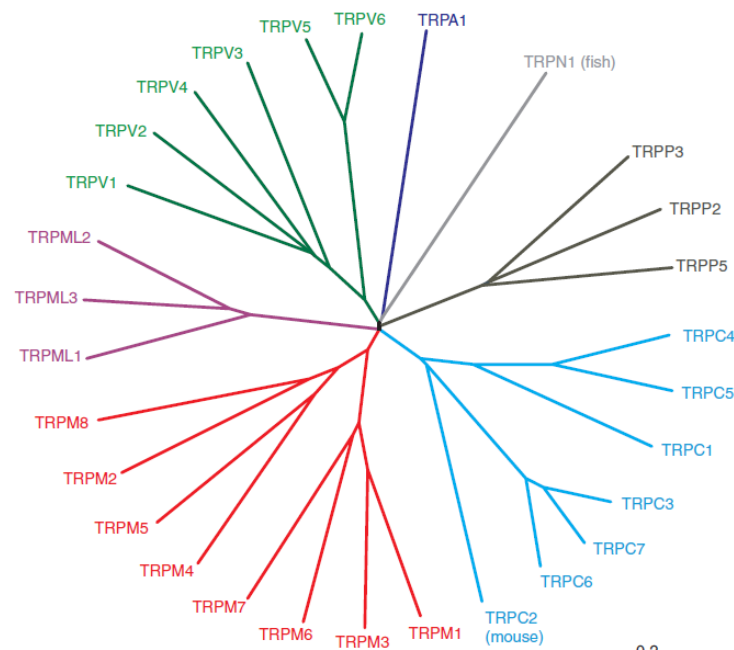


Figure 19 : Arbre phylogénétique de la super famille des TRP chez l'homme

D'après (Nilius and Owsianik, 2011).

Les canaux TRP possèdent tous une conductance cationique non sélective. A l'exception de certains TRPM qui sont perméables uniquement aux cations monovalents, tous les autres TRP sont perméables au calcium. Cependant, ils sont pour la plupart peu sélectifs

avec des ratios de perméabilité entre le calcium et le sodium (PCa^{2+}/PNa^{2+}) compris entre 0.3 et 10. Seuls les TRPV5 et 6 sont très sélectifs du calcium ($PCa^{2+}/PNa^{2+} > 100$) (Pedersen et al., 2005).

Les canaux TRP participent à de multiples fonctions à la fois dans les cellules excitables et non excitables. Dans les cellules excitables comme les neurones, ils permettent la dépolarisation de la cellule et modulent l'activité des canaux voltage-dépendants. Dans les cellules non excitables, ils modulent les forces d'entrée du Ca^{2+} (**Figure 20**). Les canaux TRP sont particulièrement étudiés pour leurs rôles dans la physiologie sensorielle (le toucher, l'olfaction, le goût, la chaleur, la vision), mais ils participent également à la perception de stimuli à l'échelle cellulaire avec un rôle dans la transduction du signal cellulaire.

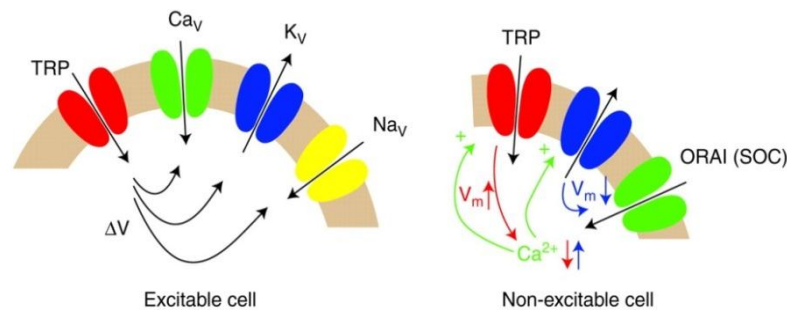


Figure 20 : Les canaux TRP dépolarisent les cellules excitables et modulent les forces d'entrée du Ca^{2+} dans les cellules non-excitables

Gauche : la dépolarisation des cellules excitables, suite à l'ouverture des canaux TRP, régule les canaux Ca^{2+} , K^+ et Na^+ voltage-dépendants. Droite : la dépolarisation membranaire par les canaux TRP diminue l'entrée de Ca^{2+} via ORAI alors que l'hyperpolarisation de la membrane par les canaux potassiques augmente l'influx calcique. Cet influx module ensuite l'activité des canaux TRP et potassiques pour affiner la $[Ca^{2+}]_i$. D'après (Gees et al., 2010).

Comme évoqué précédemment, nous avons émis l'hypothèse que le canal mis en jeu dans la réponse au glucose des neurones HGE, en plus d'avoir une conductance cationique non sélective, pourrait être sensible aux EAOs. De façon intéressante, les canaux TRPC présente une CCNS et certains d'entre-eux ont la particularité d'être activés par les EAOs. Seuls les canaux TRPC seront développés dans la suite de ce manuscrit.

III.2. Les canaux TRPC

Les canaux TRPC ont été les premiers membres de la famille des TRP à avoir été identifiés chez l'homme et présentent le plus d'homologies avec ceux de la drosophile. La

famille des canaux TRPC regroupe sept membres (TRPC 1 à 7), tous exprimés chez l'homme à l'exception de TRPC2 qui est un pseudogène. Chaque protéine TRPC est codée par un gène *trpc* différent. Il existe en revanche différents variants d'épissage pour les protéines TRPC1 et TRPC4 (Kim et al., 2014)

III.2.1. Structure des TRPC

Les sous-types de TRPC peuvent être classés en 4 familles sur la base des homologies de séquence: TRPC1, TRPC2, TRPC4/5 et TRPC3/6/7. Comme tous les membres de la famille des TRP, les TRPC sont caractérisés par six hélices transmembranaires, avec une boucle formant un pore entre les segments cinq et six. Les régions C- et N- terminales sont intracytosoliques et comportent différents domaines et motifs impliqués dans l'assemblage des protéines TRP, leur activation et leur régulation par les protéines ou leurs ligands. Le domaine signature des canaux TRPC, appelé domaine TRP, est localisé après le dernier segment transmembranaire côté C-terminal et est conservé dans tous les TRPC. La région N-terminale porte 4 séquences ankyrine de 30 acides aminés chacune. Ces séquences jouent un rôle dans les interactions protéines/protéines. Elles peuvent interagir avec des domaines particuliers nommés « coiled-coil » domaines situés sur les fragments N- et C-terminaux des TRPC. Ces interactions sont nécessaires à la multimérisation des protéines TRPC (Schindl et al., 2008). Les TRPC contiennent également un site de liaison commun et compétitif à la calmoduline et au récepteur à l'IP3 (IP3-R). Ce site a été nommé CIRB (Calmoduline/ IP3-R binding). Il joue un rôle important dans la régulation de l'activation des TRPC, avec une sensibilité variable selon les TRPC (Tang et al., 2001) (**Figure 21A**).

Pour être fonctionnelles, les protéines TRP s'assemblent en homo ou hétéro-tétramères (**Figure 21B**). Un canal peut être composé de 2 monomères différents. Des complexes multimériques composés de 3 monomères TRPC différents ont aussi été rapportés (Zagranichnaya et al., 2005). L'hétéromérisation des protéines TRPC constitue un moyen efficace pour générer une grande diversité de canaux aux propriétés biophysiques différentes avec des modes de régulation distincts (**Figure 21B**). Par exemple, dans les cellules endothéliales aortiques, les canaux TRPC3 et TRPC4 s'assemblent pour former un canal redox-sensible (Poteser et al., 2006). Ce canal présente une conductance différente des homomères TRPC3 ou TRPC4. De plus, l'inhibition de l'activité de TRPC3 ou TRPC4 abolit

sa propriété redox-sensible. Enfin, alors que le canal TRPC4 n'est pas activé par les analogues du diacylglycérol (DAG), le complexe TRPC3/4 l'est (Poteser et al., 2006).

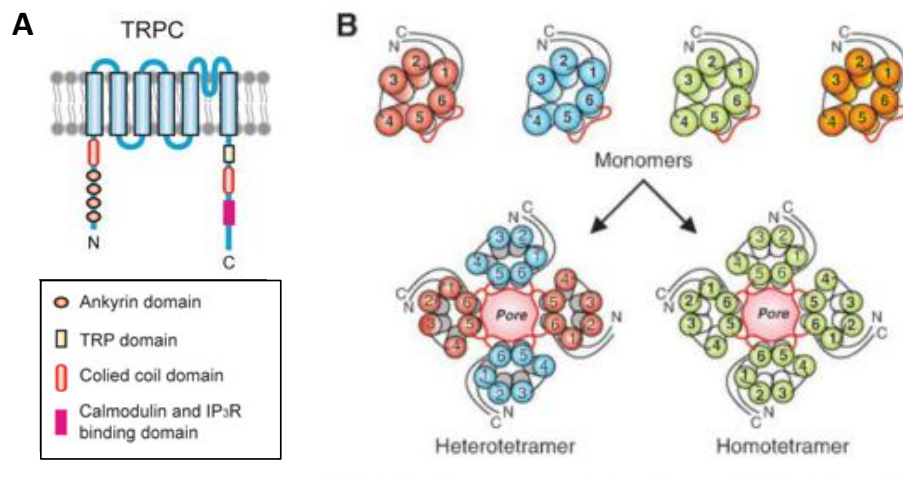


Figure 21 : Structure (A) et topologie (B) des canaux TRPC

D'après (Song et al., 2011).

III.2.2. Activation/inhibition physiologique/pharmacologique

I.1.1.1. Activation

L'activation des canaux TRPC peut se faire par l'intermédiaire de divers effecteurs décrits dans les paragraphes suivants. Quatre mécanismes principaux d'activation des TRPC sont décrits (**Figure 22**) :

- a. activation suite à la déplétion des stocks internes de calcium
- b. activation par des ligands
- c. activation par translocation à la membrane
- d. activation mécanique

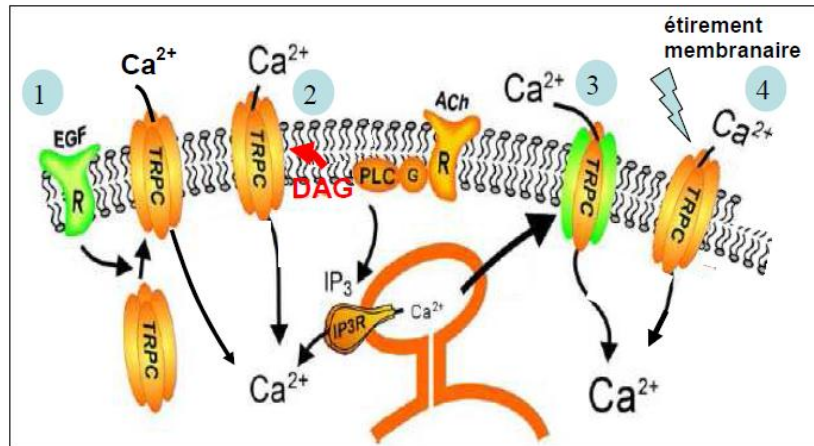


Figure 22 : Principaux mécanismes d'activation des TRPC

- 1) Les canaux TRPC peuvent être séquestrés dans des compartiments intracellulaires, et en réponse à des stimuli (EGF), transloqués à la membrane plasmique où ils vont contribuer à une entrée calcique.
- 2) Les TRPC peuvent également être activés par les DAG formés en réponse à l'activation d'une PLC couplée à un RCPG (exemple du récepteur de l'acétylcholine).
- 3) L'activation de la PLC conduit aussi à la formation d'IP₃ qui en se liant sur ses récepteurs entraîne une déplétion des stocks de calcium du RE. Les TRPC peuvent s'activer suite à cette déplétion calcique et permettre une entrée capacitative de calcium (SOCE) afin de remplir les stocks internes.
- 4) Les TRPC peuvent également être activés en réponse à un étirement membranaire. Adapté d'après (James W. Putney, 2007)

Il est admis que les TRPC requièrent la voie de signalisation de la phospholipase C (PLC) pour leur activation. Il y a cependant des variations dans les mécanismes couplant la PLC avec l'activation des canaux TRPC.

Activation suite à la déplétion des stocks internes de calcium :

Tous les TRPC peuvent être activés en réponse à la stimulation d'un récepteur à activité tyrosine kinase (TKR) ou d'un récepteur couplé à une protéine G (RCPG) comme les récepteurs muscariniques, à orexine ou purinergiques (Abramowitz and Birnbaumer, 2009). Leur stimulation recrute la PLC β à la membrane plasmique et provoque l'hydrolyse des phospholipides membranaires produisant ainsi de l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) et du diacylglycérol (DAG). Dans la plupart des types cellulaires, l'IP₃ produit une libération des ions Ca²⁺ du réticulum endoplasmique et une entrée subséquente de Ca²⁺ à partir de canaux membranaires. Cette entrée de Ca²⁺ a été nommée « store-operated calcium entry » (SOCE) ou entrée capacitative du Ca²⁺. Des approches variées de surexpression ou inhibition des canaux TRPC ont montré qu'ils sont activés par la déplétion des stocks internes de Ca²⁺ ou sont impliqués dans la SOCE. Bien que l'activation de TRPC1 par une déplétion des stocks

internes de Ca^{2+} soit admise (Kim et al., 2009), l'implication des autres canaux TRPC dans ce mécanisme est encore très largement débattu (voir pour revue (Salido et al., 2011)).

Activation par des ligands :

Un autre mécanisme par lequel la PLC active les canaux TRPC est la production de seconds messagers et ce, indépendamment de l'état des réserves de Ca^{2+} . Ce mécanisme a été nommé « receptor-operated calcium entry » (ROCE). Les canaux TRPC 2, 3, 6 et 7 sont activés par le DAG et ses analogues perméants (comme le 1-oleyl-2-acétyl-sn-glycérol ou OAG) et par des inhibiteurs de la DAG lipase (Hofmann et al., 1999). A l'inverse, le DAG à forte concentration, peut exercer un rétrocontrôle inhibiteur sur TRPC3 et TRPC6 via l'activation de PKC (protéine kinase C) (Venkatachalam et al., 2003). Les canaux TRPC1 et TRPC4 ne sont pas directement stimulés par les DAG lorsqu'ils sont exprimés seul, mais ils peuvent l'être lorsqu'ils sont coexprimés avec TRPC3 (Lintschinger et al., 2000; Poteser et al., 2006). Quant aux canaux TRPC4 et 5, ils ne sont pas activés par le DAG (Venkatachalam et al., 2003)

Outre les DAG, les canaux TRP peuvent être activés par diverses autres ligands tels que :

- Des molécules organiques exogènes de petites tailles, incluant aussi bien les composés synthétiques que naturels (OAG, hyperforine...). Malgré l'engouement pour les canaux TRPC, il existe peu d'agents pharmacologiques capables d'activer spécifiquement les canaux TRPC. L'hyperforine et son analogue pharmacologique, le 2,4-diacylphloroglucinols (Hyp9), sont spécifiques du canal TRPC6 (Leuner et al., 2010). Quant au riluzole, il active le canal TRPC5 (Richter et al., 2014). Il n'existe pas encore d'activateur spécifique pour les autres canaux TRPC.

- Les ions inorganiques comme le lanthane (La^{3+}) et le gadolinium (Gd^{3+}) activent TRPC4 et TRPC5 uniquement (Strübing et al., 2001).

- Les espèces actives de l'oxygène (EAOs). L'activation des canaux TRPC par les EAOs sera développée ultérieurement.

Activation par translocation à la membrane :

Pour fournir une entrée localisé et restreinte de Ca^{2+} et pour éviter son accumulation dans la cellule, les canaux TRPC peuvent être séquestrés dans des vésicules et insérés à la membrane lorsque cela est nécessaire. Nous avons vu que l'activité des canaux TRPC est finement régulée. Toutefois, certains canaux TRPC possèdent une activité constitutive, indiquant que l'exocytose des TRPC à la membrane est suffisante pour les activer. Cette exocytose peut être induite par la stimulation d'un récepteur. Par exemple, l'epidermal growth factor (EGF) permet la phosphorylation de TRPC5 et aboutit à son activation à la membrane (Bezzarides et al., 2004). Dans les cellules HEK, les canaux TRPC3 sont constitutivement actifs contrairement aux canaux TRPC6 (Dietrich et al., 2003). Dietrich et collaborateurs montrent que le canal TRPC3 est monoglycosylé alors que TRPC6 possède deux glycosylations. De façon intéressante, l'élimination d'un des sites de glycosylation de TRPC6, par mutagenèse *in vitro*, est suffisante pour convertir le canal TRPC6 en un canal constitutivement actif, semblable au canal TRPC3. A l'opposé, la création d'un second site de glycosylation pour le canal TRPC3 réduit son activité basale (Dietrich et al., 2003). Les canaux TRPC4 ne semblent pas avoir d'activité constitutive (Sung et al., 2009) contrairement aux canaux TRPC1 (Sinkins et al., 1998). Néanmoins, les mécanismes permettant au canal TRPC1 d'être constitutivement actif sont inconnus. Aucune étude à ce jour ne s'est intéressée à une éventuelle activation constitutive du canal TRPC2.

Les modifications post-traductionnelles comme la glycosylation sont donc un déterminant majeur dans le mode d'activation des canaux TRPC, soit constitutif soit régulé. Notons toutefois qu'il est difficile de garantir que les propriétés des canaux TRPC dans des systèmes d'expression, *in vitro*, soient les mêmes que dans les systèmes natifs *in vivo*.

Activation mécanique :

Certains canaux TRPC sont directement sensibles aux stimuli mécaniques comme le stress osmotique, l'étirement membranaire ou les forces de cisaillement. Il s'agit par exemple des canaux TRPC1 (Berrou et al., 2012) dans les cellules endothéliales de la BHE, TRPC5 dans les neurones (Gomis et al., 2008) et TRPC6 dans les cardiomyocytes (Seo et al., 2014).

Les principaux activateurs des canaux TRPC sont résumés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 4**). L'activité constitutive ou régulée des canaux TRPC est dépendante du type cellulaire et de l'environnement spatio-temporel de la cellule.

I.1.1.2. Inhibition

Bien que les connaissances sur les canaux TRPC s'accroissent rapidement, peu d'inhibiteurs spécifiques sont connus. Le 2-APB, un inhibiteur non spécifique de tous les canaux TRP, et le SKF-96365, un inhibiteur non spécifique des canaux TRPC, sont les plus classiquement employés (Harteneck et al., 2011). Les canaux TRPC3 et TRPC4 peuvent être spécifiquement inhibés par les Pyrazole 3 et 9 (Pyr3, Pyr9) et le ML204, respectivement (Kiyonaka et al., 2010; Miller et al., 2010). Très récemment, il a été montré que les dérivés du 2-aminobenzimidazole sont des inhibiteurs spécifiques des canaux TRPC4 et TRPC5 (Zhu et al., 2015). Il n'existe pas encore d'inhibiteur sélectif des canaux TRPC1, 2, 6, 7. Le lanthane, le gadolinium inhibent l'entrée de calcium via les canaux TRPC1, 2, 3, 6, 7 mais inhibent aussi d'autres conductances calciques (Clapham and Garbers, 2005).

Les principaux inhibiteurs des canaux TRPC sont résumés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Principaux activateurs et inhibiteurs naturels ou synthétiques des canaux TRPC

En gras sont représentés les modulateurs des canaux TRPC.

Canal TRP	Activation		Inhibition	
	naturelle	pharmacologique	naturelle	pharmacologique
TRPC1	RCPG, TKR, PLC, déplétion des stocks internes de Ca ²⁺ , Etirement	?	La ³⁺ , Gd ³⁺	2-APB, SKF96365
TRPC2 (souris)	RCPG, TKR, PLC, DAG , déplétion des stocks internes ?	OAG	La ³⁺ , Gd ³⁺	2-APB, SKF96365
TRPC3	RCPG,TKR, PLC, DAG , déplétion des stocks internes de Ca ²⁺ ?	OAG	La ³⁺ , Gd ³⁺	2-APB, SKF96365, Pyr3, Pyr9
TRPC4	RCPG, TKR, PLC, La ³⁺ , Gd ³⁺ , déplétion des stocks internes de Ca ²⁺ ?	?	Dérivés du 2-aminobenzimidazole	2-APB, SKF96365 ML204
TRPC5	RCPG, TKR, PLC, Etirement La ³⁺ , Gd ³⁺ , déplétion des stocks internes de Ca ²⁺ ?	Riluzole	Dérivés du 2-aminobenzimidazole	2-APB, SKF96365
TRPC6	Etirement, RCPG, TKR, DAG , hyperforine , déplétion des stocks internes de Ca ²⁺ ?	OAG, Hyp9	La ³⁺ , Gd ³⁺	2-APB, SKF96365
TRPC7	RCPG, TKR, DAG , déplétion des stocks internes de Ca ²⁺ ?	OAG	La ³⁺ , Gd ³⁺	2-APB, SKF96365

III.2.3.Expression des canaux TRPC

Les canaux TRPC sont aussi bien exprimés au niveau périphérique que central. Ils jouent des rôles très diverses dans l'organisme.

De façon intéressante pour ce travail de thèse, on retrouve les canaux TRPC dans l'hypothalamus, notamment dans des neurones hypothalamiques contrôlant la prise alimentaire et l'homéostasie énergétique (Qiu et al., 2014). Les canaux TRPC sont aussi exprimés dans les tissus métaboliques comme le muscle squelettique, le foie et le pancréas.

Le tableau ci-dessous (**Tableau 5**) récapitule l'expression et les rôles physiologiques périphériques et centraux connus des canaux TRPC.

Tableau 5 : Expressions et fonctions physiologiques périphériques et centrales des canaux TRPC

Focalisées, en périphérie, sur le muscle squelettique, le pancréas et le foie. D'après (Nilius and Owsianik, 2011; Vennekens et al., 2012).

Canal TRP	Périphérie		Central	
	Expression	Fonctions physiologiques	Expression	Fonctions physiologiques
TRPC1	- muscle squelettique -pancréas -foie	- prolifération et différenciation du muscle squelettique, fatigue musculaire, homéostasie Ca ²⁺ - homéostasie Ca ²⁺ - homéostasie Ca ²⁺ , volume hépatocytaire, SOC	- hippocampe - cortex - cervelet - tronc cérébral - ganglion de la base - hypothalamus	développement du cerveau, nociception, signalisation glutamatergique, prolifération et différenciation neuronale, croissance des neurites, guidage du cône de croissance via BDNF, génération de courants post-synaptique excitateurs
TRPC2 (souris)	-pancréas -foie		- organe voméronasal	détection des phéromones
TRPC3	- muscle squelettique -pancréas -foie	- capture du glucose induite par l'insuline , prolifération et différenciation du muscle squelettique, contraction, homéostasie Ca ²⁺ - prolifération cellules α et β - ?	- hippocampe - cortex - cervelet - substance noire - glande pituitaire - hypothalamus	contrôle de la locomotion, nociception, activité astrocytaire, signalisation glutamatergique, survie neuronale, formation des épines dendritiques, guidage du cône de croissance via BDNF, régulation de l'activité des neurones GABAergiques,
TRPC4	- muscle squelettique -pancréas	- formation des myotubes	- hippocampe - cortex - cervelet - thalamus - tronc cérébral - bulbe olfactif - hypothalamus	signalisation neuronale, libération de GABA, épilepsie, croissance des neurites
TRPC5	- muscle squelettique -pancréas (absent dans les ilôts) -foie (faible expression périphérique)		- hippocampe - cortex - cervelet - amygdale - noyau accumbens - hypothalamus	développement du cerveau, comportement de peur et de récompense, anxiété, plasticité cérébrale, morphologie du cône de croissance, croissance des neurites, signalisation glutamatergique
TRPC6	- muscle squelettique -pancréas -foie	- homéostasie Ca ²⁺ - prolifération cellules α et β - prolifération muscle lisse, cancer hépatique	- hippocampe - cortex - cervelet - substance noire - épithélium olfactif - rétine - hypothalamus	apprentissage et mémoire, toxicité neuronale, neurodégénérescence, plasticité synaptique, guidage du cône de croissance, croissance des dendrites, signalisation des endocannabinoïdes
TRPC7	- muscle squelettique -pancréas -foie		- hippocampe - cortex - cervelet - complexe PreBrötzing, - bulbe olfactif - hypothalamus	Désordre bipolaire, activité du rythme respiratoire, phototransduction, signalisation glutamatergique,

III.2.4. TRPC et EAOs

Des études récentes révèlent que certaines isoformes TRPC sont directement ou indirectement sensibles à une élévation de la production d'EAOs. Il s'agit des canaux **TRPC1, 3, 4, 5, 6**. Ces canaux TRPC détectent les EAOs soit indirectement via un second messenger soit directement par modifications post-traductionnelles des acides aminés (S-nitrosylation, phosphorylation, oxydation des groupements thiols). Ces modifications post-traductionnelles induisent une modification de la conformation du canal TRP permettant leur ouverture et l'entrée des cations dans la cellule.

Deux canaux TRPC jouent un rôle important dans le stress oxydatif, le TRPC3 et le TRPC4. En effet, Balzer et collaborateurs ont été les premiers à montrer l'activation de TRPC3 en présence d'oxydants, le *tert*-butylhydroperoxide, dans les cellules endothéliales (Balzer et al., 1999). Un mécanisme clef impliqué dans l'activation redox de TRPC3 dans les cellules endothéliales vasculaires passe par la phosphorylation d'une protéine tyrosine kinase et la stimulation de la PLC par une voie de signalisation inconnue (Groschner et al., 2004). Poteser et collaborateurs ont ensuite démontré l'hétéromérisation de TRPC3 et TRPC4 en un canal redox-sensible par des expériences d'immunoprécipitation, FRET, et de mutant dominant négatif (Poteser et al., 2006). Ce canal TRPC3/TRPC4 serait activé par les modifications de la composition lipidique de la membrane plasmique induite par la cholestérol oxydase (Poteser et al., 2006). Les canaux TRPC5 et TRPC6 sont aussi activés par les EAOs. En effet, l' H_2O_2 induit l'activation de TRPC6 par l'oxydation des groupements thiols et l'augmentation de sa sensibilité au DAG (Graham et al., 2010; Liu et al., 2013). L'activité du canal TRPC5 est aussi modulée par le H_2O_2 (Yoshida et al., 2006).

En plus de modifier l'activité des canaux TRPC, les EAOs sont aussi capables de moduler l'expression du canal à la membrane et de ce fait modifier l'activité cellulaire. Par exemple, les EAOs augmentent l'expression de TRPC6 dans les podocytes (Kim et al., 2012; Liu et al., 2013) et des monocytes (Wuensch et al., 2010). A l'inverse, ils diminuent l'expression TRPC6 dans les cellules mésangiales du rein (Graham et al., 2011).

Enfin, les canaux TRPC sont aussi des senseurs du NO. Le NO peut activer TRPC1, 4, 5, induisant alors l'entrée de calcium dans les cellules (Yoshida et al 2006). Pour le canal TRPC5, 2 résidus cystéines, Cys 553 et Cys558 sont S-nitrosylées par le NO (Kozai et al., 2013) (**Figure 23**). De façon intéressante et certainement importante, TRPC1 et TRPC4 ont également conservé ces cystéines, suggérant qu'ils pourraient aussi être S-nitrosylés.

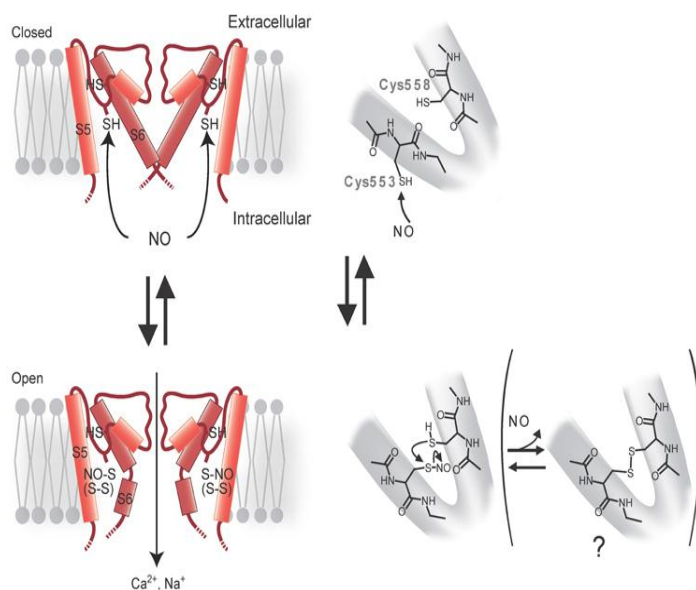


Figure 23 : Modèle d'activation des canaux TRPC par le NO

Modèle hypothétique de changement de conformation du canal TRPC5 par le NO. L'activation par le NO modifierait les groupements thiol réduits (SH) des cystéines 553 et 558 qui sont accessibles à partir du compartiment cytoplasmique. La S-nitrosylation des groupements thiol (SNO) induirait un changement de conformation du segment transmembranaire S6 qui ouvrirait le canal. D'après (Takahashi et al., 2012)

III.2.5. Canaux TRPC et contrôle de l'homéostasie énergétique

III.2.5.1. Canaux TRPC et diabète

Récemment, une corrélation entre l'altération de la fonction et/ou de l'expression à la membrane des canaux TRPC et le diabète a été établie. Les canaux TRPC seraient impliqués dans les complications de l'hyperglycémie chronique comme la néphropathie, l'athérosclérose, l'angiopathie, la neuropathie... Par exemple, l'insuline stimule la translocation de TRPC3 à la membrane plasmique dans les cardiomyocytes. En revanche, chez les cardiomyocytes de souris *ob/ob* insulino-résistantes, l'expression et le trafic de TRPC3 sont diminués (Fauconnier et al., 2007). De plus, chez les patients diabétiques, les vaisseaux sanguins sont significativement plus contractés que ceux des patients sains. Cette contraction est inhibée par le SKF96365, un inhibiteur des canaux TRPC (Chung et al., 2009). Le fait que les canaux TRPC soit perméables Ca^{2+} suggère leur participation dans les processus de mort cellulaire en conditions physiologiques ou physiopathologiques. Les autres cations pénétrant dans les cellules via les canaux TRPC pourraient aussi participer à la mort cellulaire en modifiant le potentiel membranaire. Enfin, pour les canaux TRPC ayant une activité constitutive, la modification de leur expression à la membrane peut altérer l'homéostasie Ca^{2+} et le bon fonctionnement des cellules.

L'un des mécanismes impliqué dans les dérégulations des canaux TRPC est la surproduction d'EAOs lors du diabète. En effet, la voie de signalisation EAOs-PKC contribue

à la diminution de l'expression de la protéine TRPC6 lors du diabète dans les cellules mésangiales humaines. Dans ces cellules, l'hyperglycémie chronique augmente l'activité de la NADPH oxydase conduisant à l'augmentation de la production des EAOs qui active la PKC. La PKC serait ensuite capable directement ou indirectement de diminuer l'expression de TRPC6 (Graham et al., 2011). A l'inverse, Wuensch et collaborateurs ont montré que la surproduction d'EAOs dans les monocytes, en réponse à de fortes concentrations de glucose, induit l'augmentation de l'expression des canaux TRPC (Wuensch et al., 2010). De plus, l'expression de TRPC6 dans les podocytes est stimulée en réponse à l'hyperglycémie via un mécanisme dépendant de la production des EAOs (Liu et al., 2013).

Liu et collaborateurs proposent un autre mécanisme par lequel le diabète et l'hyperglycémie altèrent l'expression des canaux TRPC. Il décrivent une voie par laquelle le glucose active la PI3K qui ensuite favorise la translocation et l'expression de TRPC6 à la membrane contribuant aux complications vasculaire du diabète (Liu et al., 2008).

Ces études suggèrent que les modifications d'expression des canaux TRPC jouent un rôle dans les effets délétères de l'hyperglycémie et du diabète. Toutefois, les mécanismes moléculaires mis en jeu et les conséquences physiologiques de ces modifications restent à être déterminés.

III.2.5.2. Canaux TRPC centraux

Depuis peu, les canaux TRPC émergent comme des cibles potentielles dans le contrôle cérébral de l'homéostasie énergétique. Nous avons vu précédemment que les neurones POMC sont essentiels pour réguler la prise alimentaire et l'homéostasie énergétique. Les canaux TRPC1, 4, 5, 6 et 7 sont exprimés dans les neurones POMC (Qiu et al., 2010). L'équipe de M. Kelly a montré que la leptine et l'insuline activent ces neurones via l'ouverture d'un canal TRPC, probablement formé de TRPC5. L'activation du canal par ces deux hormones requièrent la voie de signalisation Janus 2 tyrosine Kinase (Jak2)/ phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) et PLC (Qiu et al., 2010, 2014). La PI3K accélère également l'insertion des TRPC fonctionnels à la membrane plasmique (Bezzarides et al., 2004) (**Figure 24**). Certains neurones POMC du NA expriment les récepteurs à la sérotonine (5-HT_{2C}) qui sont impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique (Xu et al., 2010). De façon intéressante, Sohn et collaborateurs ont montré que la sérotonine active cette population distincte de neurones POMC via l'activation des canaux TRPC. Les canaux TRPC1 et TRPC5 sont les deux

isoformes les plus exprimés dans ces neurones (Sohn et al., 2011). Ces résultats suggèrent que les canaux TRPC fonctionnent en aval des signaux anorexigènes médiés par la sérotonine, l'insuline et la leptine dans les neurones POMC (**Tableau 6**).

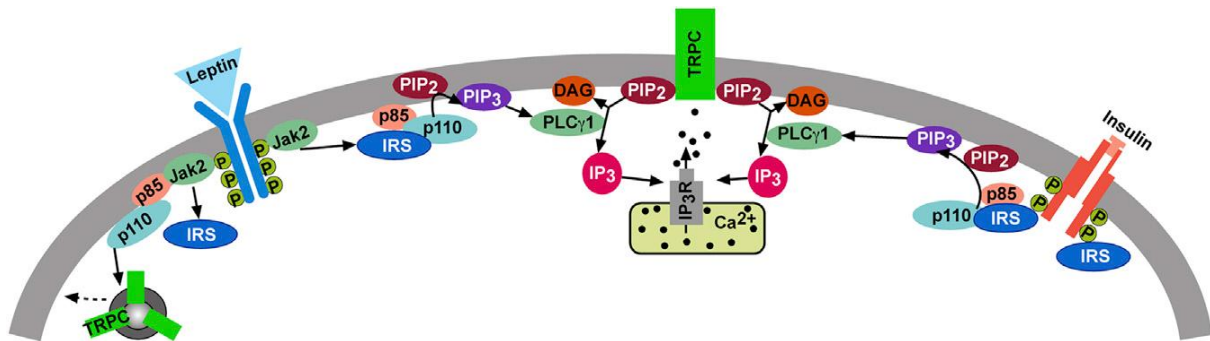


Figure 24 : Modèle proposé de l'activation des canaux TRPC par la leptine et l'insuline dans les neurones POMC du MBH

L'insuline et sa leptine se lient à leurs récepteurs pour activer la voie de signalisation des protéines IRS et des kinases PI3K (PI3K). La PI3K active ensuite la PLC qui augmente l'activité du canal TRPC1 et 5 dans les neurones POMC. L'activation des canaux TRPC génère la dépolarisation du neurone et augmente son excitabilité. La PI3K stimule aussi l'incorporation des canaux TRPC fonctionnels à la membrane plasmique (Bezzarides et al., 2004). D'après (Qiu et al., 2014).

L'ensemble de ces études, bien que peu nombreuses, montre l'importance des canaux TRPC dans les mécanismes centraux régulant la prise alimentaire et l'homéostasie énergétique. Toutefois, *in vivo* et *in vitro*, la(les) isoforme(s) de canaux TRPC permettant ces effets ne sont pas clairement définis.

Tableau 6 : Résumé des neurones hypothalamiques dont la détection des signaux métaboliques implique les canaux TRPC

Signal métabolique	Neurones activés	Références
Leptine	Neurone POMC (↗ canal TRPC)	(Qiu et al., 2010)
Sérotonine	Neurone POMC (via 5HT2CRs ; ↗ canal TRPC)	(Sohn et al., 2011)
Insuline	Neurone POMC (↗ canal TRPC)	(Qiu et al., 2014)

Problématique

Le maintien de l'homéostasie glucidique est le fruit d'une régulation fine, à la fois nerveuse et endocrinienne, assurant un équilibre entre la production et l'utilisation de glucose dans l'organisme. Toutes dérégulations de cette homéostasie glucidique entraînent le développement de maladies métaboliques.

Le développement croissant de l'**Obésité** et du **Diabète de Type 2 (DT2)** fait de ces maladies une priorité mondiale en matière de santé publique. On estime de nos jours qu'environ 21% de la population mondiale et 40% de la population française présente un surpoids ou une obésité. En ce qui concerne l'homéostasie glucidique, le syndrome métabolique laisse présager l'apparition d'un phénomène d'insulino-résistance et/ou d'un DT2. Il s'agit de la pathologie métabolique la plus répandue au monde et on dénombre à l'heure actuelle 100 millions de patients dans le monde, avec environ 30 millions en Europe dont 2,5 millions en France. Selon les prévisions de l'organisation mondiale de la santé, le nombre de personnes diabétiques dans le monde entier pourrait passer de 100 millions à plus de 300 millions en 2030.

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, l'hypothalamus joue un rôle clef dans le contrôle l'homéostasie glucidique. Le glucose est capable d'activer les neurones hypothalamiques indirectement (objectif 1) ou directement (objectif 2). Les objectifs de cette thèse ont été d'étudier :

Objectif 1 : le rôle des endozépinines dans la communication astrocytes/neurones du MBH impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire et de l'homéostasie énergétique.

- **Objectif 2 :** le canal impliqué dans la détection directe du glucose des neurones de type HGE activés par une augmentation de la concentration en glucose et son rôle dans le contrôle de l'homéostasie glucidique en conditions physiologiques ou physiopathologiques (DT2).

Résultats et Discussions

I. Objectif 1 : le transmetteur glial ODN cible les neurones POMC hypothalamiques pour contrôler l'homéostasie énergétique via un mécanisme indépendant du GABA

I.1. Contexte de l'étude

Comme évoqué dans l'introduction, des avancées importantes ont permis de caractériser les réseaux de neurones hypothalamiques ainsi que les signaux métaboliques modulant leur activité pour contrôler la balance énergétique. Outre le glucose, les acides gras à longue chaîne (AGLC) peuvent être directement détectés par l'hypothalamus et jouent un rôle clef dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Ainsi, une augmentation de la concentration en acides gras libres dans le 3^{ème} V induit une inhibition de la PA et une diminution de la production hépatique de glucose (Obici et al., 2002) et module la sécrétion et l'action de l'insuline sur le foie en réponse à une charge périphérique en glucose (Cruciani-Guglielmacci et al., 2004). L'action hypothalamique des AGLC est dépendante de leur estérification en AGLC-CoA (Picard et al., 2014). Néanmoins, les mécanismes et les types cellulaires impliqués restent largement inconnus. La protéine de liaison des AGLC-CoA (ACBP) est connue en périphérie pour sa capacité à lier les AGLC-CoA et former ainsi un pool intracellulaire nécessaire à leur métabolisme (Færgeman et al., 2007). Cependant, la fonction d'ACBP dans le métabolisme et les effets hypothalamiques des AGLC sur la balance énergétique n'a été que peu étudiée. Des données récentes montrent que les astrocytes hypothalamiques participent au contrôle de la balance énergétique et détectent les signaux métaboliques circulants dont les AGLC (Chowen et al., 2013; Le Foll et al., 2014). De plus, ACBP est fortement exprimée dans les astrocytes hypothalamiques (Tonon et al., 1990). Il aura fallu attendre 2015 pour que l'équipe du Dr Alquier à Montréal montre que l'ACBP est un régulateur intracellulaire du métabolisme des AGLC dans les astrocytes hypothalamiques (Bouyakdan et al., 2015).

Les astrocytes (principales cellules gliales) sécrètent des gliotransmetteurs dont les endozépinines, modulant l'activité neuronale (Costa and Guidotti, 1991). ACBP et ses produits de clivage comme l'octadecaneuropeptide (ODN) sont des endozépinines qui ont été initialement identifiées pour leur capacité à inhiber la liaison des benzodiazépinines sur le récepteur GABA_A et agir comme agoniste inverse (Costa and Guidotti, 1991). L'expression

des endozépines est diminuée par le jeûne chez le rat et la souris, suggérant que ce système est contrôlé par le statut métabolique de l'organisme (Compère et al., 2010; Lanfray et al., 2013). De façon intéressante, l'augmentation de la concentration centrale de glucose stimule l'expression des endozépines et la libération d'ODN (Lanfray et al., 2013). L'administration centrale d'ODN exerce de puissants effets anorexigènes et augmente la tolérance au glucose, confortant un rôle dans le contrôle de l'homéostasie énergétique (Compère et al., 2010; Lanfray et al., 2013). Ainsi, **les endozépines sont considérées comme un acteur clef dans la détection hypothalamique du glucose**. Toutefois, les cibles cellulaires et les mécanismes moléculaires d'action des endozépines sont inconnus. Quelques données suggèrent que l'action anorexigène d'ODN n'impliquerait pas le récepteur GABA_A classique des benzodiazépines, mais requière un récepteur métabotropique orphelin (do Rego et al., 2007) ainsi que la voie de signalisation des récepteurs à mélanortine MC3/4R (Lanfray et al., 2013). L'implication du système à mélanocortine dans l'effet anorexigène de l'ODN n'a pas clairement été démontrée. Rappelons que les neurones POMC libèrent de l' α -MSH qui se fixe sur ses récepteurs MC3/4-R conduisant à la diminution de la prise alimentaire, suggérant que les neurones POMC pourraient être une cible des endozépines. Dans le but de mieux comprendre comment les endozépines modulent la prise alimentaire, nous avons émis l'hypothèse avec l'équipe du Dr Alquier que **l'ODN module l'activité des neurones POMC hypothalamiques via un mécanisme GABA indépendant**.

Ce travail a fait l'objet d'un article soumis dans le « Journal of American Physiology » (cf Annexes p.154).

I.2. Résultats principaux

Les résultats principaux de cet article sont les suivants :

1) **L'ODN module l'homéostasie énergétique via le système à mélanocortine**. Les neurones POMC du MBH sont connus pour diminuer la prise alimentaire et augmenter la dépense énergétique notamment en augmentant l'activité locomotrice (cf revue (Myers and Olson, 2012)). Pour déterminer si l'ODN module l'homéostasie énergétique par l'intermédiaire des neurones POMC, l'effet anorexigène de l'ODN induit par l'infusion icv (ventricule latéral, 100ng) d'ODN a été testé chez des souris génétiquement invalidées pour le récepteur à mélanocortine MC4-R (souris MC4-R KO). Les résultats montrent que l'effet

anorexigène de l'ODN est perdu chez les souris MC4R KO (**Figure 25**). De plus, l'administration d'ODN induit une augmentation de l'activité locomotrice chez la souris sauvage qui est abolie chez la souris MC4-R KO (Bouyakdan et al, *en soumission*). Ces résultats renforcent l'hypothèse que l'ODN active les neurones POMC.

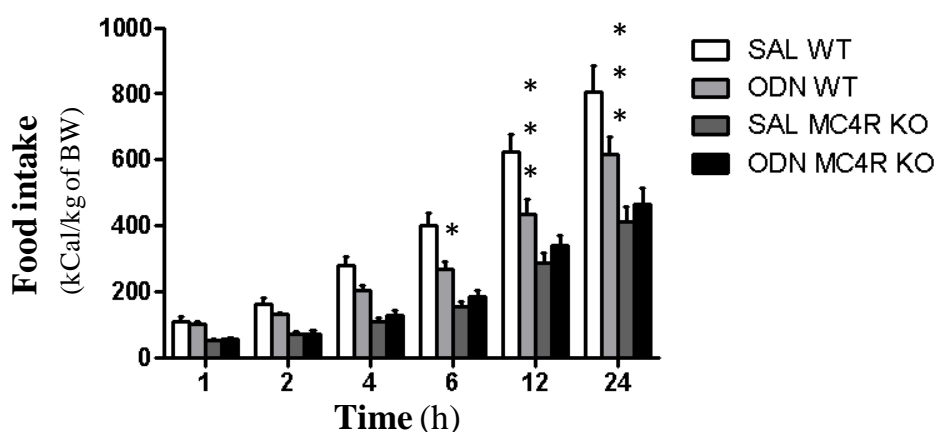


Figure 25 : Implication du système à mélanocortine dans l'effet satiétogène de l'ODN

Suivi de la prise alimentaire au cours du temps en réponse à une infusion icv d'ODN (ODN, 100ng) ou de solution saline (SAL) chez les souris MC4R WT et MC4R KO (n=6-8/groupe) après un jeûne de 16h. * p<0,05, ** p<0,01 vs. NaCl, Two-Way ANOVA + post-test Bonferroni.

2) L'ODN active spécifiquement les neurones POMC. Pour déterminer si l'ODN active les neurones POMC du MBH, l'effet de l'ODN a été testé par électrophysiologie sur des tranches de cerveau de souris POMC-eGFP. Les résultats (Dr Fabienne Liénard) montrent que l'ODN augmente la fréquence des potentiels d'action de tous les neurones POMC testés (**Figure 26** ; p<0,05). De manière intéressante, l'activité électrique des neurones non-GFP, c-à-d n'étant pas POMC, du NA n'est pas affectée par l'ODN (**Figure 26C** ; p>0,05). Ces données suggèrent que l'ODN active spécifiquement les neurones POMC du MBH.

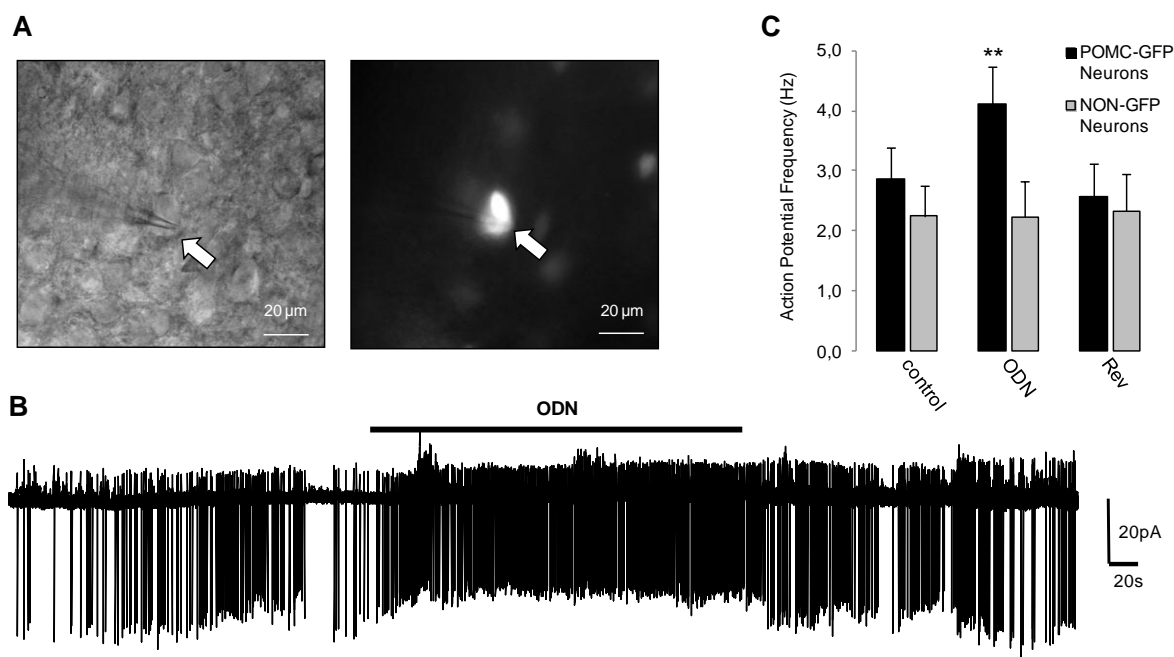


Figure 26: L'ODN dépolarise les neurones POMC du MBH

A) Neurone POMC-eGFP (flèche blanche épaisse) visualisé en lumière blanche (gauche) et en émission de fluorescence (droite) durant un enregistrement de patch clamp (la flèche fine blanche représente la pipette d'enregistrement). B) Enregistrement en configuration cellule attachée d'un neurone POMC-GFP (n=9) activé par l'ODN (1nM, barre noire épaisse au-dessus de la trace). C) Quantification de la fréquence des potentiels d'action des neurones POMC (n=9) et non-POMC (n=15) avant (contrôle, durant les 60 dernières secondes avant l'application d'ODN), durant (ODN, durant les 60 dernières secondes après l'application d'ODN) et après (réversion, durant 60 secondes, 10 min après l'application d'ODN) l'application d'ODN. ** $p < 0,01$ vs. contrôle, One-Way ANOVA + post-test Bonferroni.

3) L'ODN active les neurones POMC via un mécanisme GABA_A indépendant.

L'ODN est un agoniste inverse du site de liaison des benzodiazépines du récepteur GABA_A. Pour déterminer si l'ODN active les neurones POMC via un mécanisme GABA_A dépendant, la fréquence et l'amplitude des courants post-synaptiques inhibiteurs GABA (sIPSC) sur les neurones POMC ont été quantifiées. Les résultats montrent que l'amplitude des sIPSC n'est pas affectée par l'ODN (**Figure 27A**). Toutefois, l'ODN diminue la fréquence des sIPSC sur les neurones POMC. L'ODN diminue également la fréquence des courants GABA des neurones non-POMC du NA (**Figure 27B** ; $p < 0,05$). Etant donné que seuls les neurones POMC voient leur activité électrique augmentée par l'ODN, ces résultats suggèrent que l'activation des neurones POMC par l'ODN fait intervenir un mécanisme indépendant des récepteurs GABA_A, comme suggéré précédemment (do Rego et al., 2007).

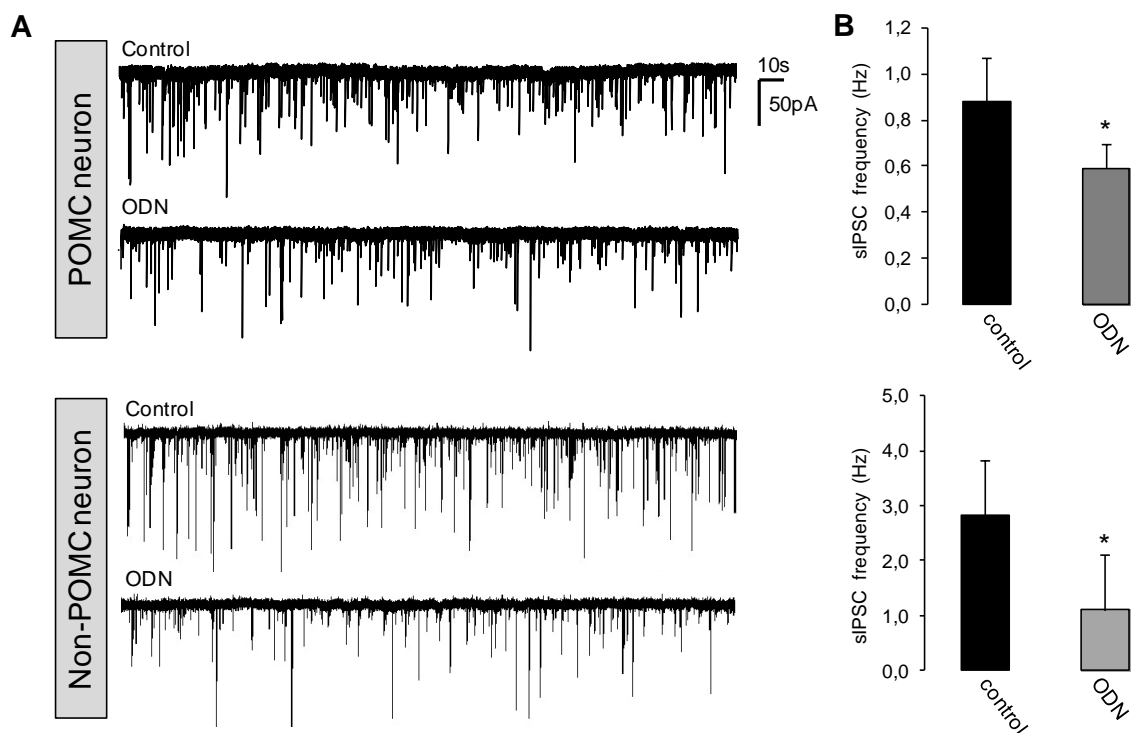


Figure 27: L'ODN diminue la fréquence des sIPSC chez les neurones POMC et non-POMC du MBH

A) Enregistrement représentatif en configuration voltage-clamp sur cellule entière d'un neurone POMC (gauche) et non-POMC (droite) avant (contrôle, durant les 4 dernières minutes avant l'application d'ODN) ou durant l'application d'ODN (durant les 4 dernières minutes des 10 min d'application de l'ODN) B- Quantification de la fréquence des sIPSC de neurones POMC (en haut) et non-POMC (en bas) avant (contrôle ; durant les 4 dernières minutes avant l'application d'ODN) et durant l'application d'ODN (ODN ; durant les 4 dernières minutes avant l'application d'ODN). * $p < 0,05$ vs. contrôle (paired t-test).

Pour confirmer ces données, **mon implication dans cette étude a consisté à tester l'effet de l'ODN sur l'activité de neurones hypothalamiques dissociés qui ne présentent pas de contact synaptique et sont donc isolés de tous courants postsynaptiques GABA.** Pour cela, les changements de $[Ca^{2+}]_i$ des neurones dissociés de MBH de rat ont été enregistrés en imagerie calcique comme décrit précédemment (cf matériel et méthodes) à 2,5 mM de glucose en réponse à l'ODN (1 nM). Les enregistrements en imagerie calcique montrent que l'ODN augmente la $[Ca^{2+}]_i$ d'environ 9% des neurones de MBH testés (**Figure 28**). Ces résultats confirment que l'activation des neurones du MBH par l'ODN fait intervenir un mécanisme indépendant du GABA.

Pour aller plus loin, nous avons aussi déterminé si l'ODN affecte l'activité des neurones de MBH via le récepteur métabotrope déjà identifié. Il a été suggéré que l'ODN module la prise alimentaire par l'intermédiaire d'un récepteur métabotrope orphelin, distinct des récepteurs GABA_A (do Rego et al., 2007) pour lequel l'antagoniste sélectif cdLOP a été synthétisé. De façon intéressante, l'application de cdLOP diminue significativement le nombre de neurones activés par l'ODN ainsi que l'intensité de la réponse à l'ODN (**Figure 28B** ; $p < 0,05$). L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'ODN module l'activité des neurones hypothalamiques de manière indépendante des récepteurs GABA_A via « son » récepteur métabotrope.

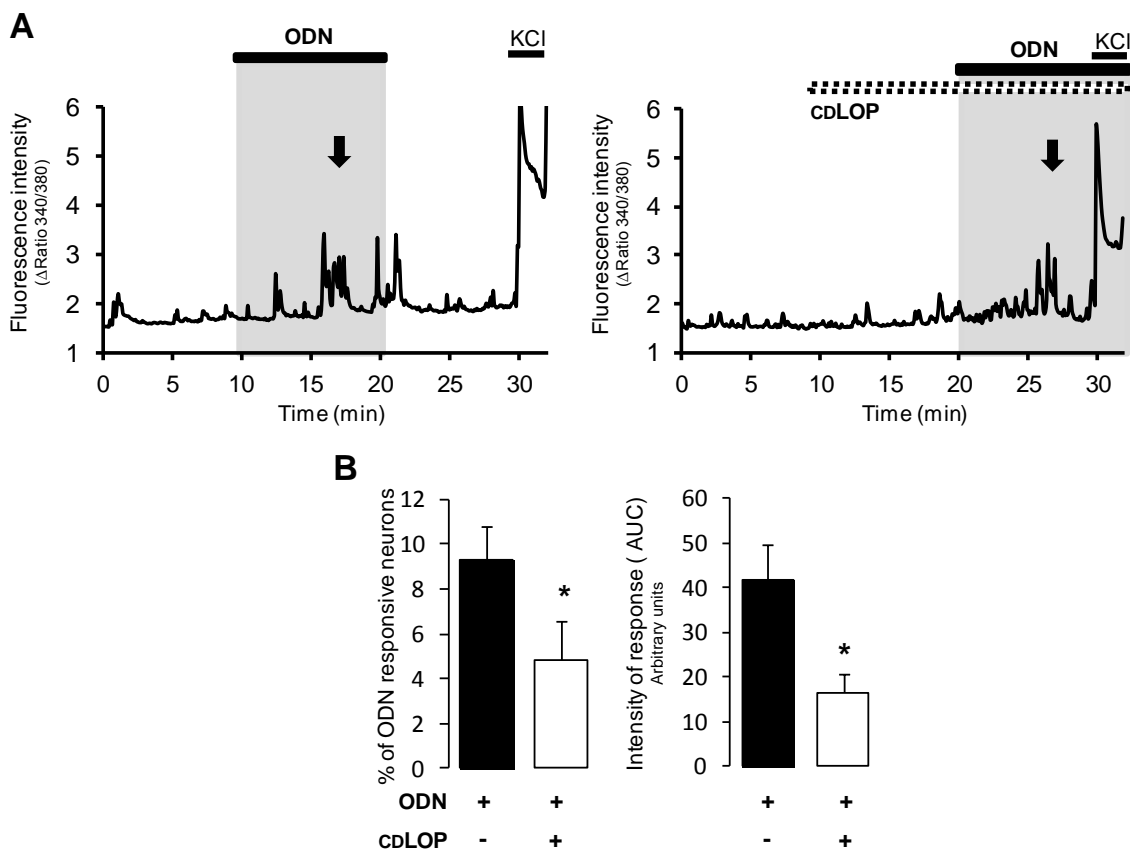


Figure 28 : CDLOP inhibe les réponses à l'ODN des neurones du MBH

Enregistrement représentatif en imagerie calcique d'un neurone de MBH activé par l'ODN (1nM) en absence (A gauche) et en présence de l'antagoniste au récepteur métabotrope de l'ODN cyclo₁₋₈[dLeu⁵]OP (cdLOP) (10nM ; A droite). Au-dessus de l'enregistrement sont représentées l'application d'ODN et de cdLOP ainsi que l'application de KCl permettant de vérifier l'état d'excitabilité des cellules. Les flèches représentent la réponse à l'ODN (A). Pourcentage de neurones activés par l'ODN dans la culture de neurones dissociés de MBH (B gauche) et quantification de l'intensité de réponse à l'ODN en absence et en présence de cdLOP (AUC, B droite). ODN: n=36 neurones ODN-répondants/425 cellules totales ; ODN + cdLOP: n = 17 neurones ODN-répondants/455 cellules totales, 3 cultures indépendantes. * $p < 0,05$, unpaired *t*-test.

I.3. Discussion

Dans cette étude, nous avons émis l'hypothèse que les endozépinines inhibent la prise alimentaire, en modulant l'activité du système à mélanocortine via un mécanisme GABA indépendant. En couplant des techniques *in vitro* et *in vivo*, nous confirmons que l'effet satiétogène de l'ODN implique l'activation des neurones POMC du NA. L'activation de ces neurones par l'ODN est indépendante des récepteurs GABA mais impliquerait un récepteur métabotrope orphelin.

Plusieurs études supportent l'hypothèse que les cellules gliales sont un acteur clef dans la détection hypothalamique du glucose, mais leur rôle exact reste flou. Ainsi, certains neurones GS du MBH détecteraient *indirectement* le glucose par l'intermédiaire d'une cellule gliale. De façon intéressante, l'augmentation de la concentration centrale de glucose stimule la libération astrocytaire d'ODN dans le NA (Lanfray et al., 2013) qui exerce de puissants effets anorexigènes et augmente la tolérance au glucose (Compère et al., 2010; Lanfray et al., 2013). L'ODN participerait donc aux mécanismes en amont de la détection hypothalamique de l'hyperglycémie. Les cibles cellulaires et moléculaires de l'ODN sont largement méconnues. De façon intéressante, l'injection icv d'ODN augmente les taux d'ARNm POMC (Compère et al., 2010). De plus, la voie de signalisation des récepteurs à mélanortine MC3/4-R est nécessaire à l'effet satiétogène de l'ODN (Lanfray et al., 2013). Ceci suggère que les endozépinines contrôlent l'homéostasie énergétique par l'intermédiaire du système à mélanocortine. En accord avec cette hypothèse, nous montrons, pour la première fois, que l'ODN active spécifiquement les neurones POMC pour diminuer la prise alimentaire. Nous pouvons ainsi proposer que les neurones POMC détectent indirectement l'hyperglycémie via la libération d'ODN par les astrocytes. Le rôle des neurones POMC comme senseur du glucose est controversé. Les études qui ont montré leur sensibilité à ce métabolite ont utilisé l'électrophysiologie, où les connections cellulaires sont préservées, ne démontrant pas de manière irrévocable que les neurones POMC détectent directement ou indirectement l'augmentation de la concentration de glucose (Claret et al., 2007a; Ibrahim et al., 2003). Nous montrons qu'aucun neurone POMC en culture, isolé de toute connexion cellulaire, n'est GS (cf Résultats chapitre 2, p). **Ceci suggère que les neurones POMC détecteraient indirectement l'augmentation de la concentration de glucose.**

L'ODN modulerait la prise alimentaire par l'intermédiaire d'un récepteur métabotrope orphelin, distinct des récepteurs GABA_A (do Rego et al., 2007). Nous

montrons pour la première fois que l'ODN module l'activité des neurones hypothalamiques de manière indépendante des récepteurs GABA_A via un récepteur métabotrope orphelin. Il reste à déterminer la nature de ce récepteur.

Pour conclure, cette étude apporte de nouvelles données sur le rôle de la communication entre astrocytes et neurones hypothalamiques mais permet aussi d'élargir ce concept à d'autres régions cérébrales impliquées dans la détection centrale du glucose et le contrôle de l'homéostasie énergétique. En accord, l'ODN est fortement présent dans l'amygdale où se trouve des neurones GS (Costa and Guidotti, 1991).

II. Objectif 2 : Rôle des canaux TRPC3 hypothalamiques dans la détection centrale du glucose et le contrôle de l'homéostasie glucidique

II.1. Contexte de l'étude

Nous étudions au laboratoire les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la détection du glucose par les neurones HGE activés en condition d'hyperglycémie. Ces mécanismes ne sont que partiellement connus. En effet, notre équipe a montré que l'augmentation de l'activité électrique de ces neurones repose sur l'ouverture d'un canal présentant une conductance cationique non-sélective sans pouvoir l'identifier précisément. Parallèlement, notre équipe a aussi montré que les EAOs sont produites dans l'hypothalamus en réponse à une hyperglycémie cérébrale et impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire et de l'homéostasie glucidique. Toutefois l'origine cellulaire et la cible des EAOs restent inconnues. Ces données suggèrent que le canal impliqué dans les neurones HGE soit sensible aux EAOs en plus de présenter une conductance cationique non-sélective. De façon intéressante, certains isoformes de la famille des canaux TRPC possèdent ces deux caractéristiques. Ces canaux représentent donc une cible potentielle.

Même si cela n'a jamais été montré directement, les neurones HGE seraient impliqués dans le contrôle de l'homéostasie glucidique. Ils pourraient participer aux réponses physiologiques induites lors d'une augmentation de la concentration cérébrale en glucose telles que la diminution de la prise alimentaire et/ou la stimulation de la sécrétion d'insuline.

Nous avons émis l'hypothèse que les canaux TRPC sensibles aux EAOs sont impliqués dans la réponse à l'augmentation de la concentration de glucose des neurones HGE et dans le contrôle de l'homéostasie glucidique.

Ainsi, cet objectif a comporté 3 parties :

⇒ **La première partie** a été de déterminer quel canal TRP redox-sensible est exprimé dans les neurones HGE et s'il est nécessaire à leur réponse au glucose. Ceci a été réalisé, *in*

in vitro, par une approche d'imagerie calcique permettant de suivre l'activité de cellules fraîchement isolées de MBH de rongeurs (rat/souris) adultes. Afin de mimer une hyperglycémie dans ce modèle *in vitro*, nous avons effectué une augmentation de la concentration extracellulaire en glucose de 2,5 à 10 mM, ce qui nous a permis d'identifier les cellules HGE. Puis, la réponse au glucose de ces cellules a été mesurée en présence d'agents pharmacologiques ciblant les canaux TRPC. L'importance du canal mis en jeu a ensuite été confirmée par une approche génétique. Pour cela, la présence et la réponse au glucose des neurones HGE chez la souris déficiente pour le canal d'intérêt a été étudié par imagerie calcique.

⇒ Après identification du canal TRPC mis en jeu dans la réponse au glucose des neurones HGE, **la deuxième partie** du projet a consisté à déterminer son rôle dans le contrôle de l'homéostasie glucidique. Pour cela, des souris déficientes pour le canal TRPC d'intérêt soit dans tout l'organisme (souris TRPC d'intérêt KO), soit uniquement dans le MBH (TRPC d'intérêt^{MBH} KO, utilisation de souris TRPC d'intérêt lox/lox injectées avec un adénovirus exprimant la recombinaise Cre) ont été utilisées. La diminution de la prise alimentaire et la stimulation de la sécrétion d'insuline (via l'axe nerveux hypothalamo-pancréatique) induite par une augmentation de la concentration cérébrale en glucose ont été étudiées. Pour cela, nous avons utilisé le modèle d'injection intracarotidienne d'un bolus de glucose n'affectant pas la glycémie mais uniquement la concentration cérébrale de glucose, afin d'étudier uniquement l'implication du cerveau dans la régulation de ces fonctions physiologiques. La prise alimentaire en réponse à l'hyperglycémie a aussi été mesurée par un test de réalimentation après une mise à jeun. Enfin, ces souris ont été également « phénotypées métaboliquement » (tolérance au glucose et à l'insuline, prise alimentaire basale, poids).

⇒ **La troisième partie** a consisté à déterminer si la réponse au glucose des neurones HGE hypothalamiques est altérée dans un modèle animal de DT2 précoce induit par une alimentation enrichie en graisse et en sucre. Pour cela, la réponse au glucose de neurones HGE a été étudiée par imagerie calcique chez le rat soumis à un régime standard ou diabétogène pendant 3 semaines.

La figure ci-dessous représente l'hypothèse de mon travail de thèse (**Figure 29**).

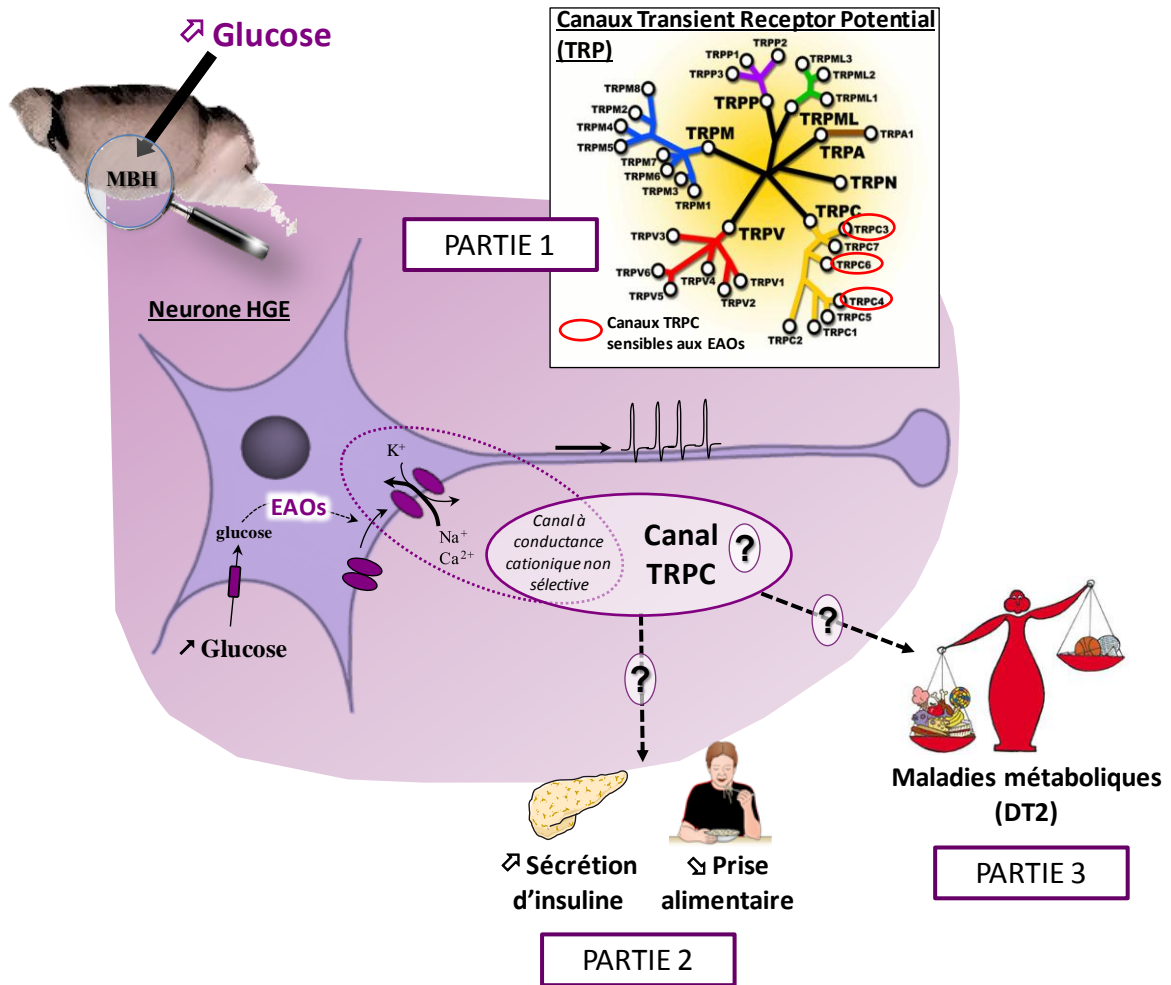


Figure 29 : Schéma représentant l'hypothèse de travail

II.2. Résultats

II.2.1. Partie 1 : identifier le canal impliqué dans la détection du glucose des neurones HGE du MBH

II.2.1.1. Caractérisation de la réponse au glucose des neurones HGE du MBH

Le premier objectif de ce travail a été d'identifier les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la réponse à l'augmentation de la concentration de glucose des neurones HGE. Pour cela, nous avons mis en place dans notre laboratoire un modèle de **culture de neurones fraîchement dissociés de MBH**. Les neurones en culture sont des cellules rondes avec une membrane très réfringente (**Figure 30**).

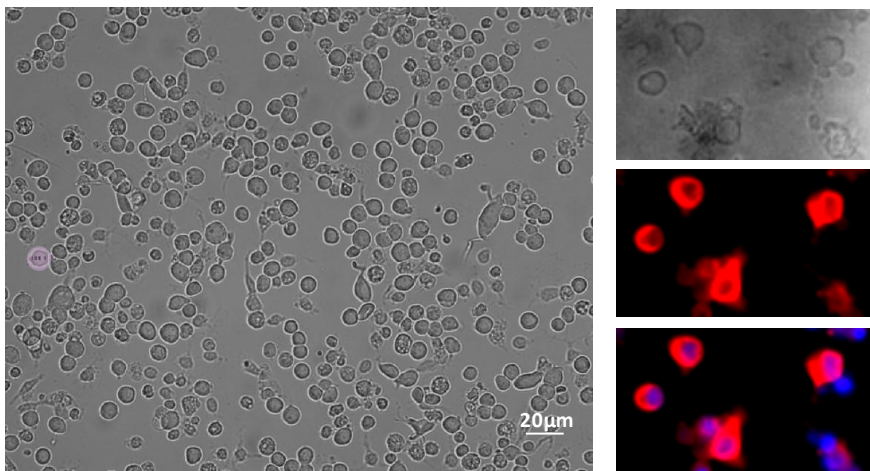


Figure 30 : Culture primaire de cellules dissociées de MBH

Photographie d'un champ représentatif de culture primaire de cellules fraîchement dissociées de MBH de rat en lumière blanche (A, grossissement x20, Olympus IX70) et en fluorescence (B ; bleu : marquage nucléaire DAPI, rouge : marquage neuronal MAP-2).

La seconde étape a consisté à valider la présence de neurones HGE dans ce modèle de culture. Pour cela, une installation d'**imagerie calcique** spécifique à ce projet et permettant de suivre l'activité de cellules fraîchement dissociées de MBH de rongeurs a été mise en place. La mesure de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) par imagerie calcique est classiquement utilisée comme indicateur de l'activité électrique neuronale et a déjà été utilisée pour caractériser les neurones GS (Le Foll et al., 2009a; Kang et al., 2004). La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ des cellules dissociées a été mesurée à l'aide de la sonde calcique Fura2 en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose. Les différentes étapes de mises au point

permettant d'étudier la détection de l'augmentation de la concentration de glucose des neurones HGE par imagerie calcique sont résumées dans l'encadré ci-dessous.

Mises au point en imagerie calcique pour étudier la réponse à l'augmentation de la concentration de glucose des neurones HGE dans le modèle de culture

La concentration hypothalamique de glucose chez l'animal en conditions «normales» étant estimée à environ 2-2,5 mM (de Vries *et al.* 2003; Dunn-Meynell *et al.* 2009), les neurones isolés de MBH ont été cultivés à cette concentration. Dans le but de mimer *in vitro* une hyperglycémie, une augmentation de la concentration en glucose de 2,5 à 10 mM a été effectuée. Les neurones présentant une augmentation transitoire (durée >30secondes, amplitude >0.1 Δ ratio 340/380) de $[Ca^{2+}]_i$ en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose ont été qualifiés de **neurones de type HGE** (Figure)

Le principal challenge a été de déterminer le protocole expérimental permettant d'obtenir 2 réponses consécutives à l'augmentation de la concentration de glucose de 2,5 à 10 mM pour les neurones HGE. Dans un premier temps le protocole suivant a été testé :

- l'activité calcique basale des cellules a été enregistrée en perfusant une solution de glucose à 2,5 mM à 3 ml/min pendant 10 min. La concentration de glucose a ensuite été augmentée à 10 mM pendant 10 min. Pour vérifier la réversion de la réponse au glucose, la chambre a été de nouveau perfusée avec du milieu à 2,5 mM de glucose pendant 10 min. Pour vérifier la reproductibilité de la réponse au glucose, la concentration de glucose a été de nouveau augmentée à 10mM pendant 10 min. Ce protocole est classiquement utilisé pour étudier les neurones GS dans ce modèle de culture (Kang *et al.*, 2004). En fin d'expérience, une solution de KCl à 50 mM a été appliquée dans la chambre d'enregistrement pendant 2 min pour vérifier la capacité d'excitabilité des cellules. 90 à 95 % des cellules répondent au KCl dans ce modèle de culture. Les cellules non répondantes au KCl sont éliminées de l'étude.

De façon surprenante 1/3 des neurones HGE ne présentaient pas d'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ en réponse à la seconde augmentation de la concentration de glucose (**Figure 31A**) et 1/3 ne présentaient pas de retour à l'activité calcique basale entre les 2 applications de glucose à 10 mM (**Figure 31B**). Seul 1/3 des neurones HGE présentaient une réponse au glucose reproductible et un retour à l'activité basale entre les 2 applications de glucose à 10 mM (**Figure 31C**).

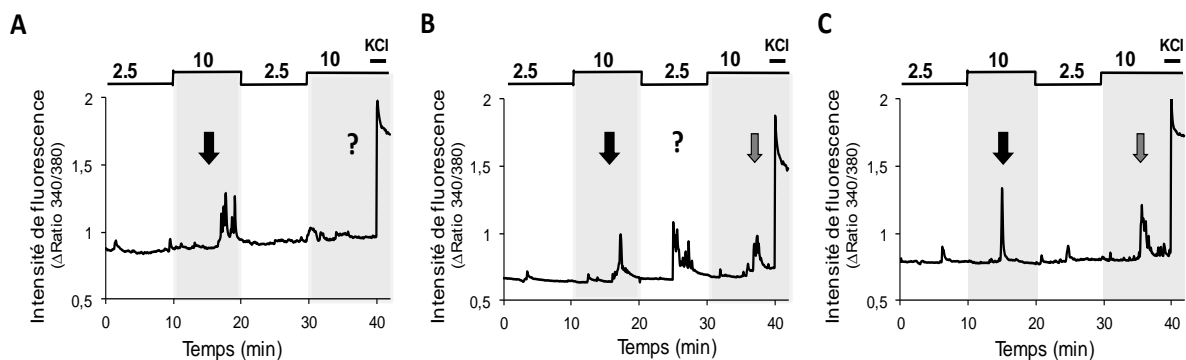


Figure 31 : Différents profils de réponse au glucose des neurones HGE de MBH

Enregistrement représentatif de l'intensité de fluorescence (ratio 340/380 nm) au cours du temps d'une cellule HGE en réponse à deux augmentations successives de la concentration extracellulaire en glucose de 2.5 à 10 mM. Au-dessus de l'enregistrement sont représentées les variations de concentrations en glucose ainsi que l'application de KCl permettant de vérifier l'état d'excitabilité des cellules. Les flèches représentent la réponse au glucose et les ? représentent l'absence de seconde réponse au glucose 10 mM (A) et l'absence de retour à l'activité calcique basale (B).

Pour déterminer si l'absence de retour à l'activité calcique basale entre les 2 applications de glucose 10 mM et l'absence de seconde réponse au glucose des neurones HGE étaient spécifique de cette population de neurone GS ou bien lié à un problème technique, nous avons tenté de reproduire les résultats obtenus par d'autres équipes sur ce même modèle de culture (Kang et al., 2004). Pour cela, deux diminutions successives de la concentration en glucose de 2,5 à 0,1 mM ont été effectuées pour identifier les neurones GI dans la culture. Comme attendu, la diminution de la concentration de glucose induit une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ dans les neurones GI (Kang et al., 2004). Contrairement aux neurones HGE, 91% des neurones GI répondent une seconde fois lors de la seconde application de glucose à 0,1 mM (n=11 neurones HGI/ 100 cellules totales, 3 cultures indépendantes). En accord avec les résultats de Kang et collaborateurs, la latence de la réponse au glucose des neurones GI est de l'ordre de 3 min (Figure 32). Ces résultats confirment que la sensibilité au glucose des neurones hypothalamiques est conservée dans ce modèle de culture. Les prochaines étapes ont consisté à identifier les conditions optimales d'enregistrement permettant d'obtenir 2 réponses consécutives à l'augmentation de la concentration de glucose de 2.5 à 10 mM pour les neurones HGE.

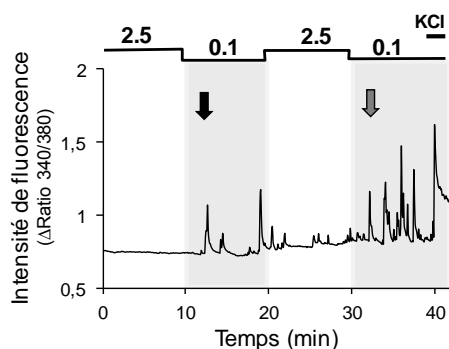


Figure 32 : Réponses au glucose caractéristiques des neurones GI de MBH

Enregistrement représentatif de l'intensité de fluorescence (ratio 340/380 nm) au cours du temps d'un neurone GI en réponse à une diminution de la concentration extracellulaire en glucose de 2,5 à 0,1 mM. Au-dessus de l'enregistrement sont schématisés les variations de concentration en glucose et l'ajout de KCl effectués. Les flèches représentent la réponse au glucose.

Nous avons ensuite testé si l'oxygénation (O_2 : 95%, CO_2 : 5%) des milieux d'enregistrement pouvait améliorer la reproductibilité des réponses au glucose des neurones HGE et favoriser le retour à l'activité basale entre les 2 applications de glucose 10 mM. L'oxygénation n'a pas permis d'améliorer ces résultats. De façon intéressante, dans ces conditions expérimentales, nous avons identifié une autre population de neurones GS présentant une diminution de $[Ca^{2+}]_i$ en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose (Figure 33). Ces neurones ont été qualifiés de HGI. Les neurones HGI sont très faiblement représentés dans notre modèle de culture (< 0.1 % ; n = 4/3200 cellules). En raison de leur faible nombre, nous ne nous sommes pas focalisés sur leur réponse au glucose.

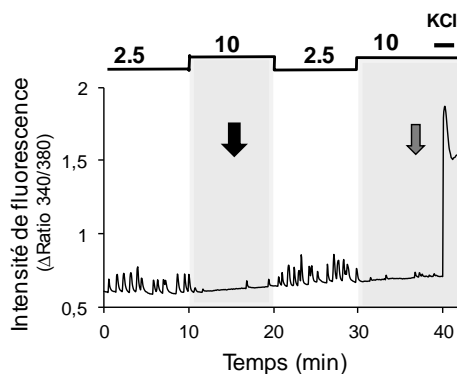


Figure 33 : Réponses au glucose caractéristiques des neurones HGI de MBH

Enregistrement représentatif de l'intensité de fluorescence (ratio 340/380 nm) au cours du temps d'une cellule HGI en réponse à une augmentation de la concentration extracellulaire en glucose de 2,5 à 10 mM. Au dessus de l'enregistrement sont schématisés les variations de concentration en glucose et l'ajout de KCl effectués. Les flèches représentent la réponse au glucose.

Enfin, pour favoriser le retour à l'activité basale des neurones HGE entre les 2 applications de glucose 10 mM, le temps de réversion de la réponse a été augmenté à 20 min. De plus, pour favoriser la détection de l'augmentation de la concentration de glucose des neurones HGE, le temps d'application du glucose à 10 mM a également été augmenté à 20 min. De façon intéressante, dans ces conditions expérimentales, 91 % de neurones HGE présentent une réponse au glucose reproductible et un retour à l'activité basale entre les 2 applications de glucose à 10 mM (n=83/953 cellules, 16 cultures indépendantes).

Ce protocole a été conservé dans la suite de cette étude pour caractériser les réponses au glucose des neurones HGE et déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans la détection de l'augmentation de la concentration de glucose des neurones HGE.

En tout, $8,9 \pm 3,8$ % des cellules de MBH testées sont des neurones HGE (n=83/953 cellules, 16 cultures indépendantes). Leurs réponses au glucose ont ensuite été quantifiées en termes d'intensité (aire sous la courbe, AUC), d'amplitude, de durée et de latence de la réponse grâce à l'utilisation de logiciel Matlab (**Figure 34**). L'augmentation de la concentration en glucose extracellulaire de 2,5 à 10 mM induit une augmentation transitoire (Figure A, D ; durée : 1^{ère} réponse: 341 ± 39 secondes vs. 2nd réponse: 373 ± 39 secondes; $p>0,05$) et reproductible de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les neurones HGE (**Figure 34A, B, C** ; AUC : 1^{ère} réponse: $35,2 \pm 4,4$ vs. 2nd réponse: $42,5 \pm 7,0$ u.a.; amplitude : 1^{ère} réponse: $0,51 \pm 0,0$ vs. 2nd réponse: $0,48 \pm 0,0$ Δ ratio 340/380; $p>0,05$). De façon intéressante, la latence de la 2nd réponse au glucose des neurones HGE diminue de $37,5 \pm 4,9\%$ (**Figure 34E** ; $p<0,001$).

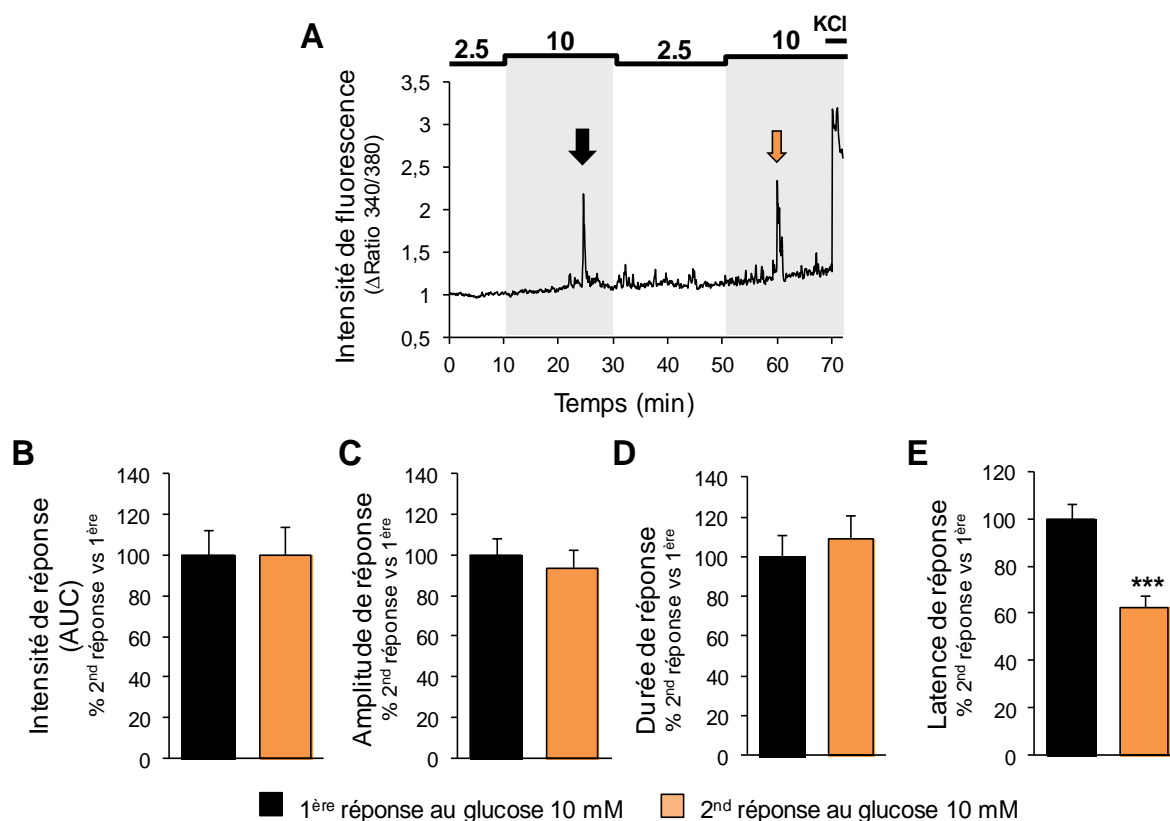


Figure 34 : Caractérisation des réponses au glucose caractéristiques des neurones HGE de MBH

Enregistrement représentatif de l'intensité de fluorescence (ratio 340/380 nm) au cours du temps d'une cellule HGE en réponse à deux augmentations successives de la concentration extracellulaire en glucose de 2,5 à 10 mM. Au-dessus de l'enregistrement sont représentés les variations de concentrations en glucose ainsi que l'application de KCl permettant de vérifier l'état d'excitabilité des cellules. Les flèches représentent la réponse au glucose (A). Quantification de l'intensité (AUC ; A), amplitude (B), durée (C) et latence (D) de la 1^{ère} (noir) et 2nd réponse (orange) au glucose 10 mM. n = 71 HGE/ 953 cellules totales, 16 cultures indépendantes ; *** $p<0,001$, paired *t*-test.

II.2.1.2. Nature des neurones HGE

Nous avons vu dans l'introduction que le neuromédiateur exprimé par les neurones HGE du MBH ne fait pas l'objet d'un consensus. Ibrahim et coll. et Claret et coll., pour qui les neurones POMC sont des neurones GE, ont testé la sensibilité au glucose des neurones POMC de souris C57Bl6 Jackson alors que Fioramonti et coll, pour qui les neurones POMC sont non gluco-sensibles, ont utilisé des souris C57Bl6 données par le Pr Friedman (Claret et al., 2007; Fioramonti et al., 2007; Ibrahim et al., 2003; Pinto et al., 2004). La différence de souche de souris pourrait expliquer ces résultats controversés. Notons également que l'ensemble de ces études a été réalisé sur tranches de cerveau, en électrophysiologie, où les connexions cellulaires sont préservées, ne permettant pas de conclure si les neurones POMC détectent directement ou indirectement l'augmentation de la concentration de glucose. Nous avons réalisé des cultures de neurones **isolés** de MBH de souris POMC-eGFP de chez Jackson, dans le but de confirmer (ou non) que les neurones POMC sont des neurones gluco-sensibles et de déterminer, pour la première fois, s'ils répondent directement (ou non) à l'augmentation de la concentration de glucose. L'activité calcique des cellules a été enregistrée en réponse à 2 augmentations successives de la concentration de glucose de 2,5 à 10 mM, comme précédemment. Les neurones POMC, fluorescents grâce à l'eGFP, sont facilement discriminables des autres cellules au sein de la culture (**Figure 35A, B**).

La modification de la concentration en glucose extracellulaire de 2,5 à 10 mM induit une augmentation transitoire et reproductible de la $[Ca^{2+}]_i$ de cellules de MBH validant la présence de neurones HGE (**Figure 35A, B, C gauche**). Toutefois pour tous les neurones POMC enregistrés aucun ne présente d'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose (**Figure 35A, B, C droite** ; n=13 neurones POMC, 3 cultures indépendantes) suggérant que **les neurones HGE ne sont pas des neurones POMC**. Contrairement aux études d'Ibrahim et coll. et Claret et coll., nos données suggèrent également que les neurones POMC détecteraient indirectement l'augmentation de la concentration de glucose, via un couplage avec une autre cellule GS (neuronale ou gliale?).

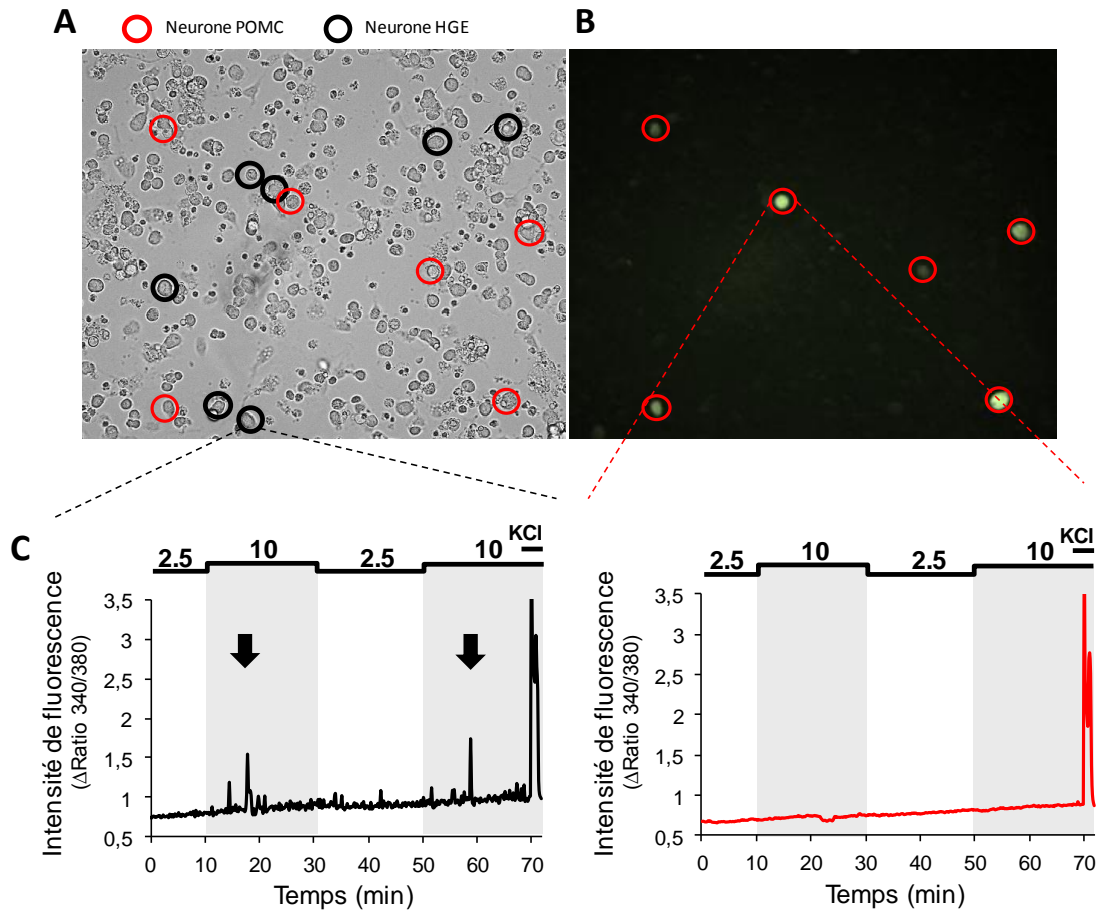


Figure 35 : Les neurones HGE ne sont pas des neurones POMC

Photographie d'un champ représentatif de culture primaire de cellules fraîchement dissociées de MBH de souris POMC-eGFP en lumière blanche (A) et en émission de fluorescence permettant de visualiser l'eGFP (B). Traces représentatives d'un neurone HGE (C gauche) et d'un neurone POMC (C droite) en réponse à deux augmentations successives de la concentration de glucose de 2,5 à 10 mM.

II.2.1.3. Implication des EAOs dans la réponse au glucose des neurones HGE

Pour déterminer si les EAOs participent à la réponse au glucose des neurones HGE, la seconde augmentation de la concentration de glucose de 2,5 à 10 mM a été réalisée en présence d'un cocktail d'antioxydants (trolox, glutathion (GSH)) ou de la catalase, une enzyme qui décompose spécifiquement le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau.

La quantification de l'AUC montre qu'environ 95% des réponses au glucose des neurones HGE sont bloquées par les antioxydants (**Figure 36A, B, C gauche** ; G+Trolox/GSH : inhibition $79,4 \pm 7,4$ % vs. 1^{ère} réponse, $p < 0,001$; G+catalase : inhibition $82,4 \pm 10,9$ % vs. 1^{ère} réponse, $p < 0,01$). Le cocktail d'antioxydants et la catalase n'ont aucun effet sur la latence de la seconde réponse au glucose chez les neurones HGE présentant une

réponse résiduelle (**Figure 36C droite** ; $p > 0,05$). Pour vérifier que les antioxydants n'altèrent pas l'état d'excitabilité des neurones HGE ce qui pourrait fausser l'interprétation de nos résultats, l'amplitude de la réponse au KCl a été quantifiée en présence des différents antioxydants. Le trolox, le GSH et la catalase ne modifient pas l'état d'excitabilité des neurones HGE (**Figure 36D** ; $p > 0,05$).

Ces données montrent que les EAOs, et plus précisément l'H₂O₂, sont impliqués dans la réponse au glucose des neurones HGE.

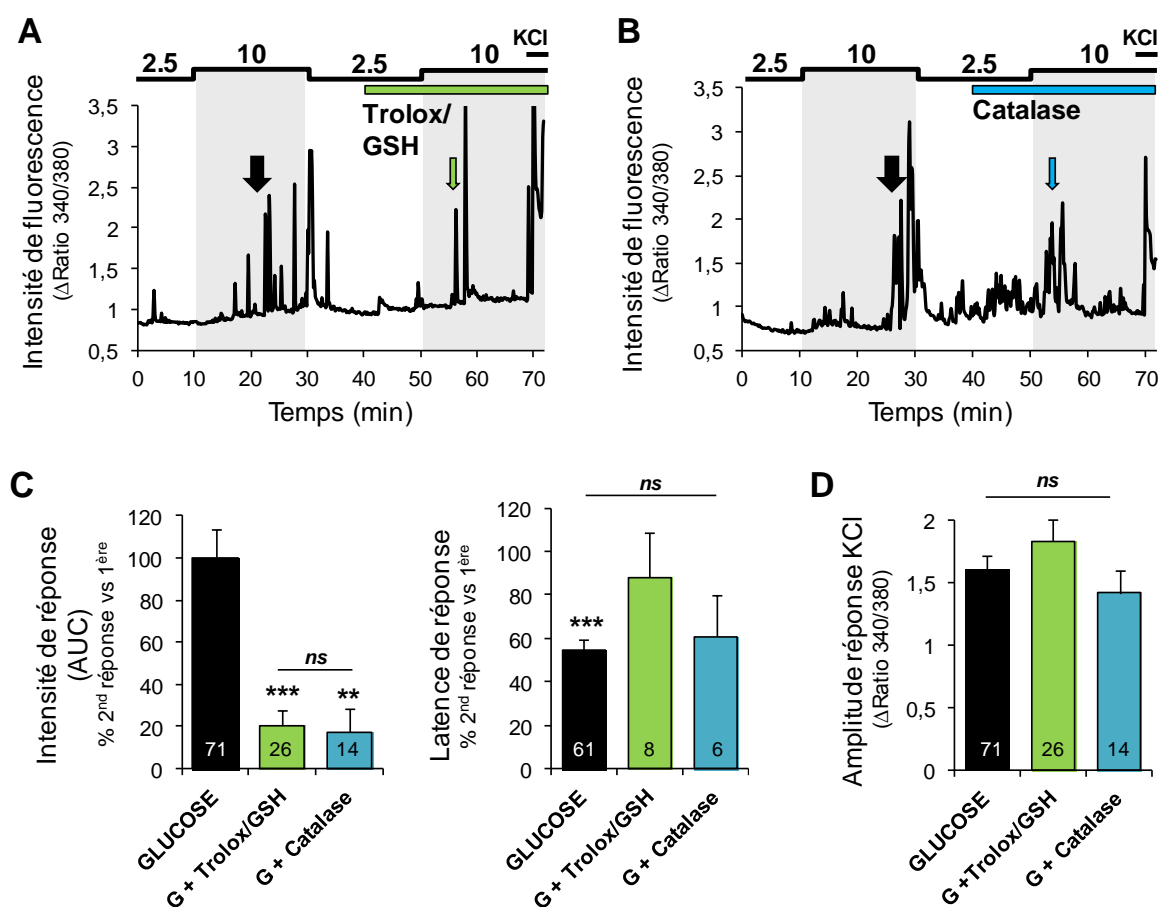


Figure 36 : Les EAOs sont impliquées dans la réponse au glucose des neurones HGE de MBH

Enregistrements représentatifs de la réponse au glucose d'un neurone HGE inhibé en présence d'un cocktail d'antioxydants (A ; Trolox 0,2 mM + Glutathion 0,1 mM) ou de la catalase (4000 U/ml ; B). Quantification de l'intensité (AUC, C gauche), de la latence (C droite) de la 2nd réponse résiduelle au glucose 10 mM en présence de glucose seul, antioxydants ou catalase. Quantification de l'amplitude de la réponse au KCl (D) en présence de glucose seul, antioxydants ou catalase. Les nombres sur les histogrammes représentent le nombre de neurones HGE analysés. Trolox/GSH : n= 149 cellules totales analysées, 3 cultures indépendantes ; Catalase : n= 326 cellules totales analysées, 5 cultures indépendantes. ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs. 1^{ère} réponse, paired t-test; ns $p > 0,05$ vs. Glucose, one-way ANOVA + post-test Bonferroni.

La seconde étape a été de déterminer si les neurones HGE du MBH produisent eux-mêmes les EAOs. Pour répondre à cette question l'activité calcique de neurones du MBH (sonde calcique) ainsi que la production de mEAOs (sondes sensibles aux EAOs) ont été enregistrées en parallèle par double imagerie cellulaire. *(Cette expérience a été réalisée en collaboration avec Natalia Shirokova et Vanessa Routh (Rutgers University, Newark, New Jersey), chez qui j'ai eu l'opportunité d'apprendre cette nouvelle technique pendant un mois en décembre 2014).* Les cellules ont été incubées avec la sonde calcique Asante Calcium Red (excitation dans le rouge, 540 nm) et la sonde sensible aux EAOs H₂DCFDA (excitation dans le vert, 488 nm). L'émission de fluorescence de ces 2 sondes a été enregistrée simultanément au cours du temps en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose de 2,5 à 10 mM. La sonde H₂DCFDA est oxydée de façon irréversible par les EAOs induisant une augmentation progressive de l'intensité de fluorescence au cours du temps comme représenté sur la **Figure 37 (droite)**. Lorsqu'une cellule produit des EAOs, une augmentation de la pente de la courbe de fluorescence est attendue (Zhou et al., 2015). Nos résultats montrent que l'augmentation de la concentration de glucose n'induit pas d'augmentation de cette pente chez les neurones HGE (**Figure 37**). Ces résultats suggèreraient que les neurones HGE ne produisent pas les EAOs.

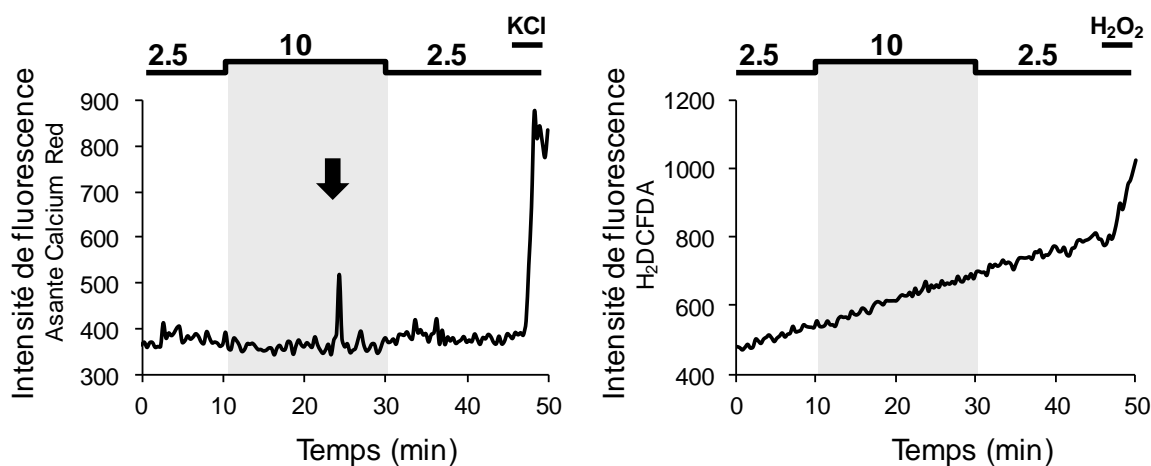


Figure 37 : Mesure de la production d'EAOs des neurones HGE en réponse au glucose

Enregistrements représentatifs d'un neurone HGE en imagerie calcique (Asante calcium red, gauche) et en imagerie H₂DCFDA (droite) en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose de 2,5 à 10 mM. L'application de H₂O₂ (200 mM) permet de vérifier la sensibilité de la sonde H₂DCFDA aux EAOs.

II.2.1.4. Implication des canaux TRPC3/4 dans la réponse au glucose des neurones HGE

Il a été démontré que la sensibilité au glucose des neurones HGE est indépendante de la fermeture des canaux K_{ATP} (contrairement aux neurones GE du MBH) et repose sur un canal à conductance cationique non-sélective (Fioramonti et al., 2004). Pour confirmer ces résultats, les réponses au glucose ont été analysées en imagerie calcique en absence puis en présence de diazoxide (250 μ M), un activateur (« *ouvreur* ») des canaux K_{ATP} . Le diazoxide n'affecte pas l'intensité de la réponse au glucose des neurones HGE (**Figure 38A, B gauche**). En revanche, la latence de la seconde réponse au glucose est significativement plus importante en présence de diazoxide (**Figure 38B droite** ; augmentation $212,7 \pm 28,0\%$ vs. Glucose ; $p < 0,001$). Ceci suggère que la rapidité de la réponse au glucose des neurones HGE est altérée. Le diazoxide hyperpolarise les neurones ce qui pourrait expliquer ce résultat. L'amplitude de la réponse au KCl n'est pas affectée par le diazoxide (**Figure 38C** ; $p > 0,05$). Ces résultats confirment que **les canaux K_{ATP} ne sont donc pas impliqués dans la réponse au glucose des neurones HGE.**

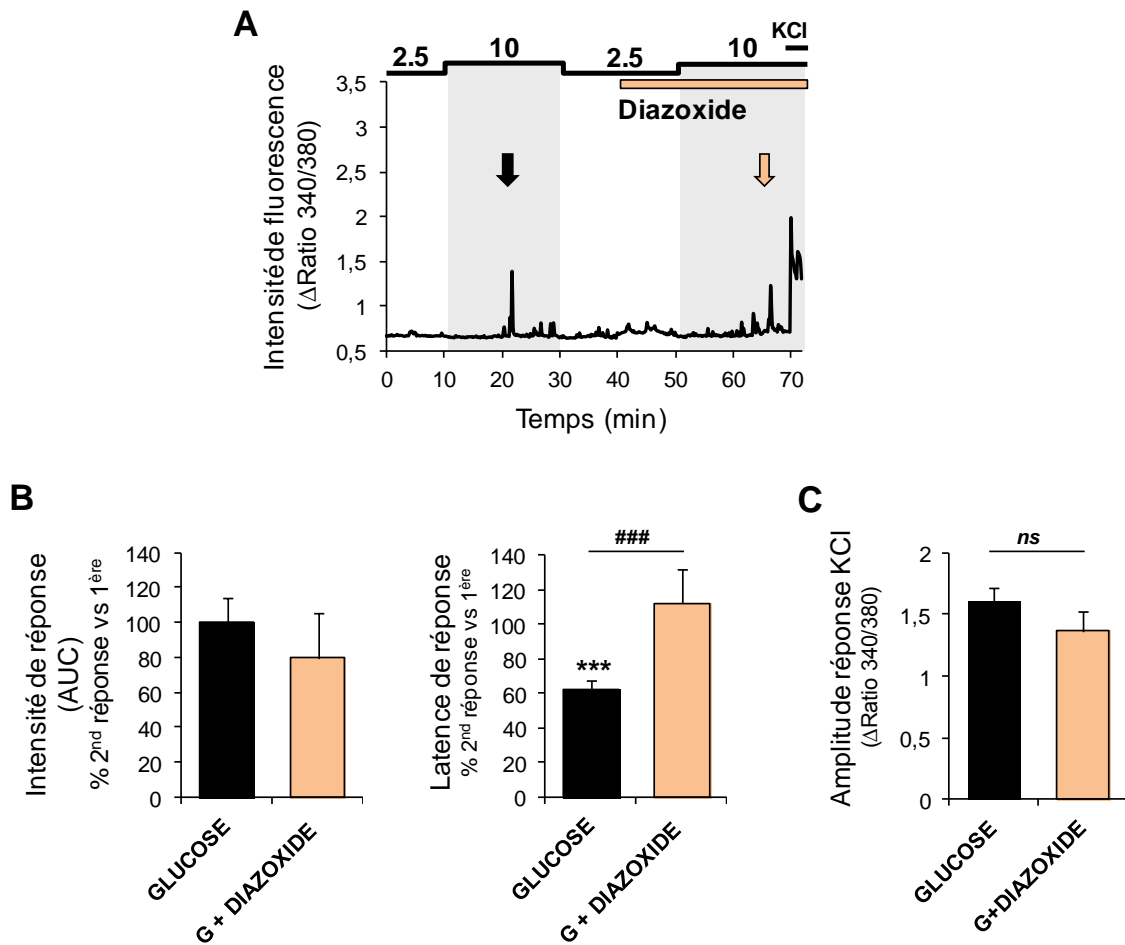


Figure 38 : La réponse au glucose des neurones HGE du MBH est indépendante des canaux K_{ATP}

Enregistrement représentatif de la réponse au glucose d'un neurone HGE en absence et en présence de diazoxide (A). Quantification de l'intensité (AUC, B gauche) et de la latence (B droite) de la 2nd réponse au glucose 10 mM en absence et en présence de diazoxide (B ; 250 μ M) et amplitude de la réponse au KCl (50mM). n=14 neurones HGE/ 192 cellules totales, 3 cultures indépendantes. *** p<0,001 vs. 1^{ère} réponse, paired t-test ; ns p>0,05, ### p<0.001vs. Glucose, one-way ANOVA + post-test Bonferroni.

En raison de leur sensibilité aux EAOs et leur conductance cationique non sélective, nous avons émis l'hypothèse que les canaux TRPC sont impliqués dans la réponse à l'augmentation de la concentration de glucose des neurones HGE. Pour répondre à cette question, la seconde augmentation de la concentration de glucose de 2,5 à 10 mM de glucose a été réalisée en présence de SKF96365 (5 μ M), un inhibiteur non-sélectif des canaux TRPC. La quantification de l'AUC montre que 100% des réponses au glucose des neurones HGE sont inhibées par le SKF96365 (**Figure 39A, F gauche** ; inhibition : $89,3 \pm 4,0$ % vs. 1^{ère} réponse ; p<0,001). De plus, la latence de la seconde réponse au glucose est significativement plus importante en présence de SKF96365 comparée à celle en condition contrôle chez les neurones HGE présentant une réponse résiduelle (**Figure 39A, F droite** ;

augmentation $255,5 \pm 27,3\%$ vs. Glucose ; $p < 0,001$). L'inhibition des canaux TRPC altère donc l'intensité et la rapidité de la réponse au glucose des neurones HGE. **Les canaux TRPC sont donc impliqués dans la sensibilité au glucose des cellules HGE.**

70% des neurones HGE testés présentent une inhibition de la réponse au glucose en présence de Pyr3, un inhibiteur spécifique des canaux TRPC3 (**Figure 39B, F gauche**; inhibition $69,0 \pm 12,5\%$ vs. 1^{ère} réponse; $p < 0,005$). L'OAG, un analogue perméable du DAG activant le canal TRPC3, mime la réponse au glucose pour 65% des neurones HGE testés (**Figure 39E, F gauche** ; Glucose : $17,7 \pm 4,1$ u.a. vs. OAG : $17,40 \pm 6,1$ u.a. ; $p > 0,05$). La latence de la seconde réponse au glucose est significativement plus importante en présence de Pyr3 comparée à celle en condition contrôle pour les neurones HGE présentant une réponse résiduelle (**Figure 39B, F droite** ; augmentation $160,7 \pm 24,9\%$ vs. Glucose ; $p < 0,05$). L'OAG n'affecte pas la latence de la seconde réponse au glucose (**Figure 39F droite**). **Le canal TRPC3 est donc impliqué dans la réponse au glucose de la majorité des neurones HGE.**

De façon intéressante, 100% des réponses au glucose des neurones HGE sont inhibées par le SKF96365 contre seulement 70% par le Pyr3. De plus, l'augmentation de la concentration de Pyr3 utilisée ($5 \mu\text{M}$) n'augmente pas le pourcentage d'inhibition des réponses au glucose, ni la diminution de l'intensité des réponses (données non montrées). **Ces résultats suggèrent qu'un autre canal TRPC, en plus du canal TRPC3, serait impliqué dans la réponse au glucose des neurones HGE.** Nous proposons que ce soit un autre canal TRPC car l'inhibiteur TRPC non-sélectif SKF96365 inhibe la réponse de tous les neurones HGE.

Nous avons vu dans l'introduction que le canal TRPC3 est capable de s'hétérodimériser avec le canal TRPC4 pour former un canal redox-sensible dans les cellules endothéliales (Poteser et al., 2006). Nous avons émis l'hypothèse que le canal TRPC4 serait également impliqué dans la réponse au glucose des neurones HGE. Pour répondre à cette question nous avons étudié la réponse au glucose des neurones HGE en absence puis en présence de ML204 ($1 \mu\text{M}$), un inhibiteur spécifique du canal TRPC4. Le ML204 inhibe la réponse au glucose pour 72% des neurones HGE testés (**Figure 39C, F gauche** ; inhibition $89,3 \pm 4,9\%$ vs. 1^{ère} réponse; $p < 0,005$). De façon intéressante, l'inhibition simultanée des canaux TRPC3/4 inhibe 82% des réponses au glucose des neurones HGE (**Figure 39D, F gauche** ; inhibition $97,2 \pm 1,7\%$ vs. 1^{ère} réponse ; $p < 0,001$). La latence de la seconde réponse

au glucose n'est pas affectée par le ML204 et le ML204+Pyr3 pour les neurones HGE présentant une réponse résiduelle (**Figure 39F droite** ; $p>0,05$).

L'amplitude de la réponse au KCl n'est pas affectée par les différents agents pharmacologiques des canaux TRPC (**Figure 39G** ; $p>0,05$).

L'ensemble des résultats obtenus en pharmacologie suggère que les canaux TRPC3/4 sont impliqués dans la sensibilité au glucose des neurones HGE.

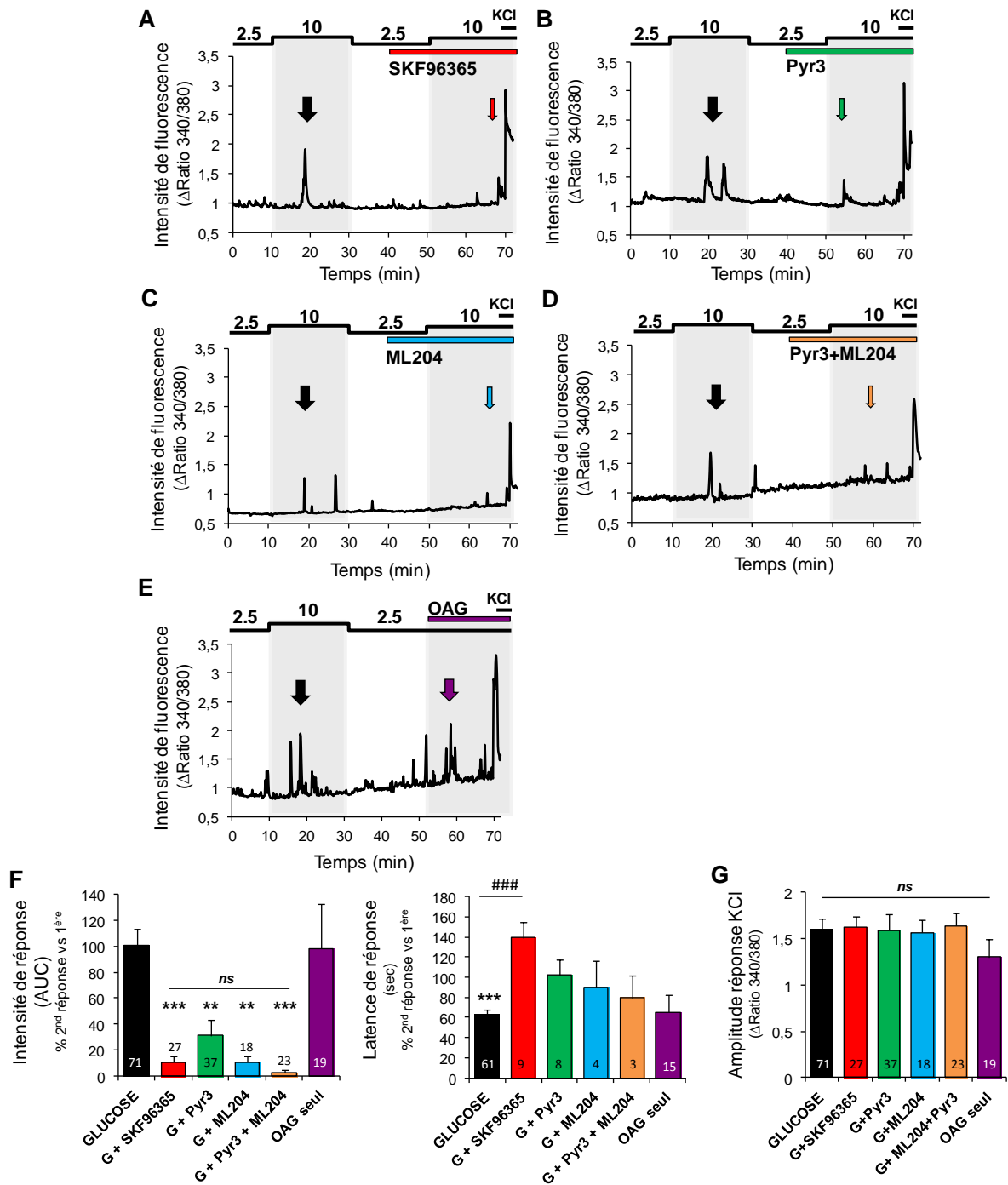


Figure 39 : Effet de la pharmacologie des canaux TRPC sur la réponse au glucose des cellules HGE de MBH.

Enregistrements représentatifs de la réponse au glucose d'un neurone HGE affecté par l'inhibiteur non spécifique des canaux TRPC (A ; SKF96365, 5 μ M), l'inhibiteur spécifique du canal TRPC3 (B ; Pyr3, 1 μ M) ou TRPC4 (C ; ML204, 1 μ M), l'inhibition simultanée du TRPC3/4 (D) ou par l'activateur du canal TRPC3 (E ; OAG 2-Acetyl-1-oleoyl-*sn*-glycerol, 10 μ M). Quantification de l'intensité (AUC ; F gauche) et de la latence (F droite) de la 2nd réponse au glucose 10 mM en absence et en présence des différents agents pharmacologiques des canaux TRPC et quantification de l'amplitude de la réponse au KCl (G). Les nombres sur les histogrammes représentent le nombre de neurones HGE analysés. SKF96365 : n=216 neurones analysés; Pyr3 : n=372 neurones analysés; ML204 : n=492 neurones analysés; Pyr3+ML204 : n=258 neurones analysés ; OAG seul : n=191 neurones analysés, n=3-5 cultures indépendantes. ** p<0,005, ***p<0,001 vs. 1^{ère} réponse, paired t-test. ### p<0,001, ns p>0,05 vs. Glucose, one-way ANOVA + post-test Bonferroni.

Dans la suite de cette étude, nous nous sommes focalisés sur le canal TRPC3. Pour confirmer son implication dans la réponse au glucose des neurones HGE, nous avons recherché la présence de neurones HGE chez la souris génétiquement invalidée pour le canal TRPC3 dans tout l'organisme (souris TRPC3^{total} KO). Le pourcentage de neurones HGE chez les souris TRPC3^{total} KO est similaire à celui des souris sauvages TRPC3^{totale} WT (**Figure 40C** ; TRPC3^{total} WT : $6,1 \pm 0,5\%$, vs. TRPC3^{total} KO : $5,9 \pm 0,4\%$; $p > 0,05$). En accord avec les données pharmacologiques, l'intensité de la réponse au glucose des neurones HGE issus des souris TRPC3^{total} KO est significativement réduite par rapport aux souris TRPC3^{total} WT (**Figure 40A, B, D gauche** ; inhibition : $32,9 \pm 8,6\%$; $p < 0,05$). La latence de la réponse au glucose des neurones HGE issus des souris TRPC3^{total} KO est significativement supérieure par rapport aux souris TRPC3^{total} WT (**Figure 40A, B, D droite** ; augmentation : $29,2 \pm 10,3\%$; $p < 0,05$). De façon surprenante, l'amplitude de la réponse au KCl des neurones HGE issus des souris TRPC3^{total} KO est significativement supérieure par rapport aux souris TRPC3^{total} WT mais cela n'affecte pas l'interprétation des résultats quant au rôle des canaux TRPC3 dans la réponse au glucose des neurones HGE (**Figure 40E** ; augmentation : $20,2 \pm 8,0\%$; $p < 0,05$). Ces résultats confirment le rôle du canal TRPC3 dans la réponse au glucose des neurones HGE. La présence des neurones HGE chez la souris TRPC3^{total} KO renforce l'idée que d'autres canaux seraient impliqués dans la réponse au glucose des neurones HGE.

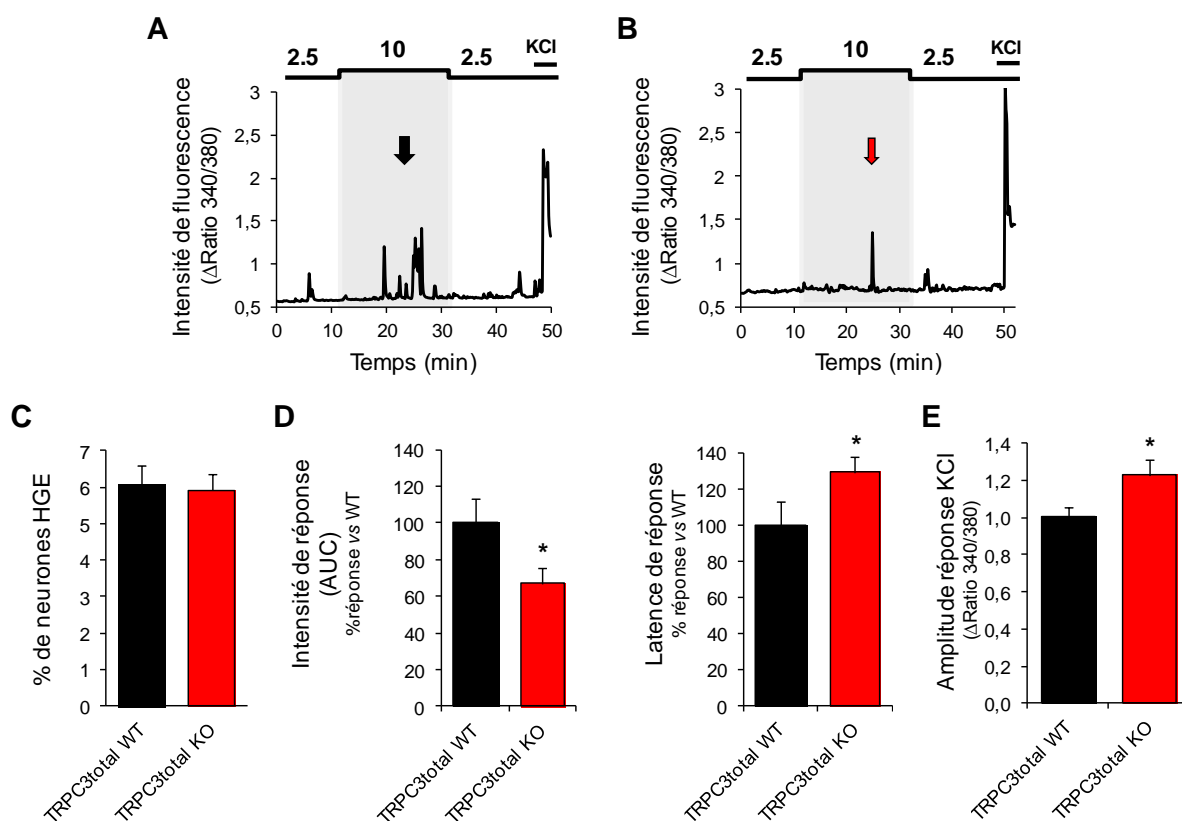


Figure 40 : Implication des canaux TRPC3 dans la réponse au glucose des neurones HGE du MBH

Traces représentatives de la réponse au glucose d'un neurone HGE chez la souris sauvage (TRPC3^{total} WT; A) ou génétiquement invalidée pour le canal TRPC3 (TRPC3^{total} KO; B). Pourcentage de neurones HGE (C), quantification de l'intensité (AUC; D gauche) et de la latence (D droite) de la 2nd réponse au glucose 10 mM (C) et amplitude de la réponse au KCl (50mM) chez souris sauvage (noir) ou génétiquement invalidée pour le canal TRPC3 (B, rouge). TRPC3^{total} WT : n=34 HGE/576 cellules totales ; TRPC3^{total} KO : n=32 HGE/651 cellules totales ; 4 cultures indépendantes. * p<0,05, unpaired t-test.

L'ensemble des résultats obtenus par des approches complémentaires, pharmacologique et génétique, montre que les canaux TRPC3/4 sont impliqués dans la réponse au glucose des neurones HGE.

Sachant que le canal TRPC4 est impliqué dans la réponse au glucose des neurones HGE et que les neurones HGE sont toujours présents chez la souris TRPC3^{total} KO, nous avons déterminé si des compensations en termes d'expression apparaissaient pour ce canal dans le MBH chez la souris TRPC3^{total} KO. Des résultats préliminaires montrent qu'il n'y a pas de différence significative d'expression du canal TRPC4 dans le MBH des souris TRPC3^{total} KO (Figure 41 ; p>0,05). Des analyses sont en cours pour augmenter les effectifs et confirmer ce résultat.

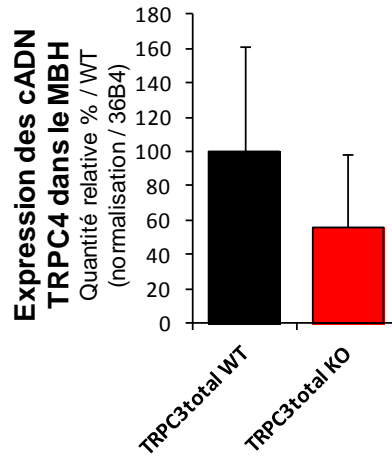


Figure 41 : Expression des canaux TRPC4 dans le MBH chez la souris TRPC3^{total} KO

Quantités relatives des ADNc TRPC4 normalisées par rapport au gène de référence 36B4 dans le MBH des souris TRPC3^{total} WT (n=6) et TRPC3^{total} KO (n=8).

II.2.2. Partie 2 : Déterminer le(s) rôle(s) physiologique(s) des canaux TRPC3 dans le contrôle de l'homéostasie glucidique

Le but de cette partie est de déterminer si les canaux TRPC3 du MBH sont impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Il est connu qu'une augmentation de la concentration cérébrale en glucose induit la stimulation de la sécrétion d'insuline ainsi qu'une diminution de la prise alimentaire (Carneiro et al., 2012) en plus d'une diminution de la production hépatique de glucose (Lam et al., 2005). Nous avons émis l'hypothèse que les canaux TRPC3, mis en jeu dans la réponse au glucose des neurones HGE du MBH, sont impliqués dans la détection centrale du glucose. Pour répondre à cette question, nous avons déterminé si la diminution de la **prise alimentaire** (effet satiétogène du glucose) et la stimulation nerveuse de la **sécrétion d'insuline** (via l'axe nerveux hypothalamo-pancréatique) induite par une augmentation de la concentration cérébrale en glucose étaient altérées chez des souris déficientes pour le canal TRPC3.

II.2.2.1. Implication des canaux TRPC3 du MBH dans la détection de l'hyperglycémie

A. Canaux TRPC3 centraux et sécrétion nerveuse d'insuline

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à l'axe hypothalamo-pancréatique. Notre équipe a mis en place un test de détection centrale de l'hyperglycémie qui consiste à injecter un bolus carotidienne de glucose vers le cerveau (25 mg/kg) induisant 1 min après l'injection un pic de sécrétion d'insuline en périphérie chez la souris. Cette injection ne provoque aucune modification de glycémie périphérique, la sécrétion observée est donc uniquement due à la détection cérébrale de l'augmentation de la concentration de glucose. Notons que ce test a originellement été mis au point dans le laboratoire chez le rat (Atef et al., 1997). **Durant ma thèse j'ai participé à sa mise en place chez la souris** (pour pouvoir utiliser des modèles transgéniques). Cette mise au point a été publiée en collaboration avec Thierry Alquier dans le journal « Molecular Metabolism » (Fergusson et al., 2014).

Pour déterminer si les canaux TRPC3 centraux sont impliqués dans la sécrétion d'insuline induite par la détection centrale de l'hyperglycémie, ce test a été réalisé, dans un premier temps, chez des souris déficientes pour le canal TRPC3 dans tout l'organisme (**souris TRPC3^{totale} KO**). Les souris TRPC3^{total} KO, sécrètent significativement moins d'insuline que les souris TRPC3^{totale} WT en réponse à l'injection intra-carotidienne d'un bolus de glucose (**Figure 42 droite** ; inhibition $77,0 \pm 14,3$ % ; $p < 0,05$). Notons qu'avant le test ($t=0$) la glycémie de souris anesthésiées TRPC3^{total} KO est significativement supérieure à celle des animaux sauvages (**Figure 42 gauche** ; augmentation $114,9 \pm 5,4$ % ; $p < 0,05$), suggérant un état diabétique des souris TRPC3^{total} KO.

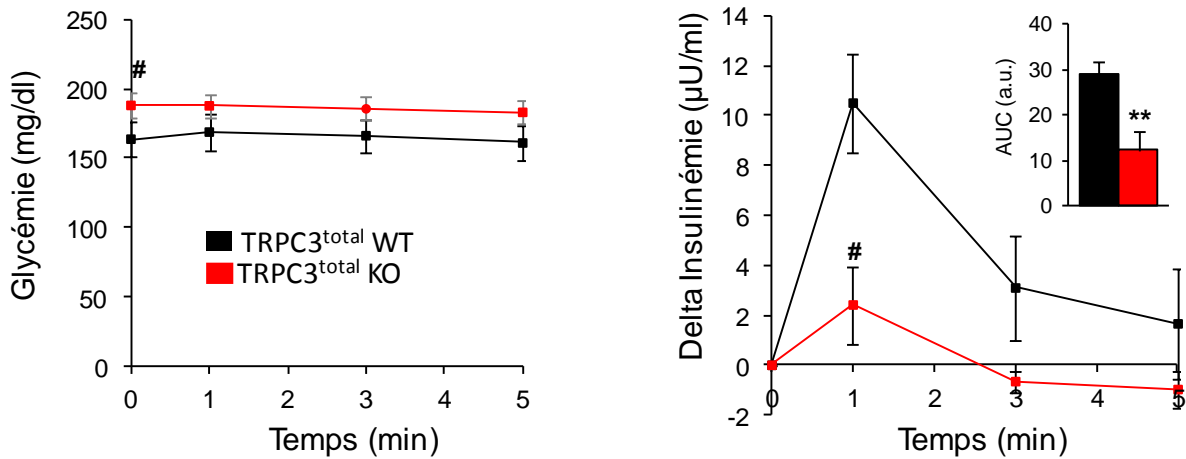


Figure 42 : Implication des canaux TRPC3 centraux dans la sécrétion nerveuse d'insuline induite par une hyperglycémie cérébrale

Suivi de la glycémie (courbes de gauche) et de la sécrétion d'insuline (courbes de droite ; delta insulinémie par rapport au temps $t=0$ min avant injection, aire sous la courbe (AUC)) chez les souris TRPC3^{totale} WT (noir, $n=8$) et TRPC3^{totale} KO (rouge, $n=13$) en réponse au bolus carotidien de glucose (25mg/kg) en direction du cerveau. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm sem. # $p < 0,05$ vs. WT, Two-Way ANOVA + post-test Bonferroni ; ** : $p < 0,01$ vs. WT, unpaired t-test.

Néanmoins, on peut se demander si la diminution de la sécrétion d'insuline chez les souris TRPC3^{totale} KO ne serait pas liée à leur hyperglycémie basale plutôt qu'à une altération de la détection centrale de l'hyperglycémie. Ainsi, nous avons effectué une approche pharmacologique, *in vivo* chez le rat pour confirmer l'implication des canaux TRPC3 centraux dans la sécrétion d'insuline induite par la détection centrale de l'hyperglycémie. Pour cela, du Pyr3 (3 μ M, 1 μ l en 10 min), l'inhibiteur spécifique du canal TRPC3, ou de l'aCSF (artificial cerebrospinal fluid) a été injecté par stéréotaxie dans le MBH de rat et la sécrétion d'insuline en réponse à l'injection intra-carotidienne d'un bolus de glucose mesurée (9 mg/kg), comme précédemment. La glycémie est similaire entre les 2 groupes d'animaux durant le test. Les résultats montrent que l'inhibition de l'activité du canal TRPC3 dans le MBH diminue significativement la sécrétion d'insuline de $42,1 \pm 11$ %, sans modification de la glycémie périphérique (Figure 43 ; $p < 0,05$).

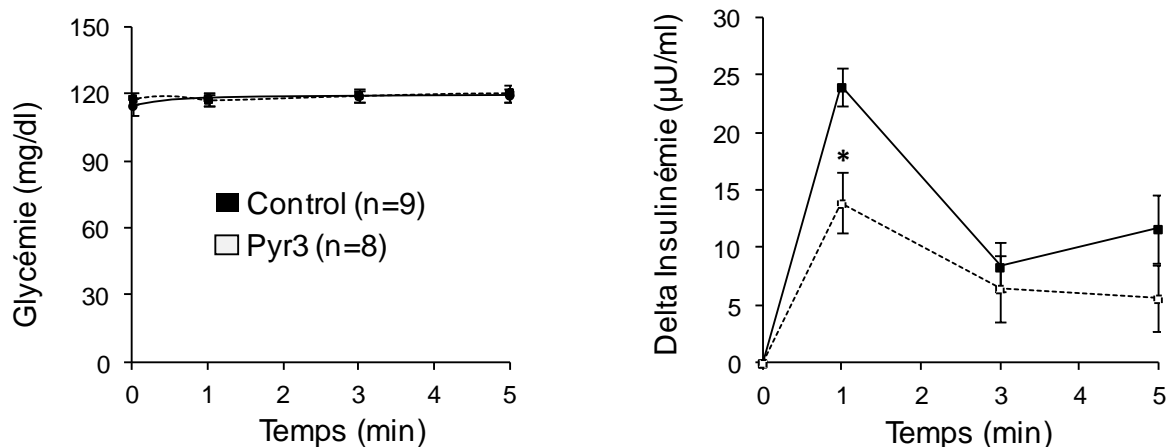


Figure 43 : Implication des canaux TRPC3 centraux dans la sécrétion nerveuse d'insuline induite par une hyperglycémie cérébrale

Suivi de la glycémie (courbes de gauche) et de la sécrétion d'insuline (courbes de droite ; delta insulinémie par rapport au temps t=0min avant injection) en réponse au bolus carotidien de glucose (25 mg/kg) en direction du cerveau chez les animaux contrôles (Ctrl, n=9 rats) ou infusés avec l'inhibiteur du TRPC3 (Pyr3, 3µM) dans le MBH (Pyr3, n=8 rats). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± sem. * p < 0,05 vs. WT, Two-Way ANOVA + post-test Bonferroni.

Le canal TRPC3, mis en jeu dans la réponse au glucose des neurones HGE, apparaît donc nécessaire à la détection centrale de l'hyperglycémie, qui conduit à la sécrétion d'insuline suite à une augmentation de la concentration cérébrale de glucose.

B. Canaux TRPC3 centraux et signal satiétogène du glucose

Dans un second temps, nous avons déterminé si les canaux TRPC3 centraux sont impliqués dans la diminution de la prise alimentaire en réponse à l'hyperglycémie cérébrale. Pour cela, l'effet anorexigène du glucose induite par une augmentation de la concentration cérébrale en glucose a été étudiée en réponse à l'injection ip ou icv de glucose chez les souris TRPC3^{total} KO mises à jeun pendant 18h. L'accès à la nourriture a été restauré 30 min après l'administration de glucose et la prise alimentaire mesurée pendant les 6 heures suivant l'injection de glucose. Soulignons que l'expérience de prise alimentaire en réponse au glucose icv chez la souris, a nécessité sa mise en place dans le laboratoire.

La prise alimentaire est significativement inférieure chez les souris TRPC3^{total} WT ayant reçu une injection ip de glucose comparée aux souris TRPC3^{total} WT ayant reçu la solution contrôle de NaCl (osmolarité identique entre les différentes solutions) (Figure 44 ; p<0,05). Ces résultats vont dans le sens du rôle satiétogène du glucose dû à sa détection cérébrale

(Carneiro et al., 2012). En revanche, l'effet anorexigène du glucose administré en ip est aboli chez les souris TRPC3^{total} KO (**Figure 44** ; $p > 0,05$).

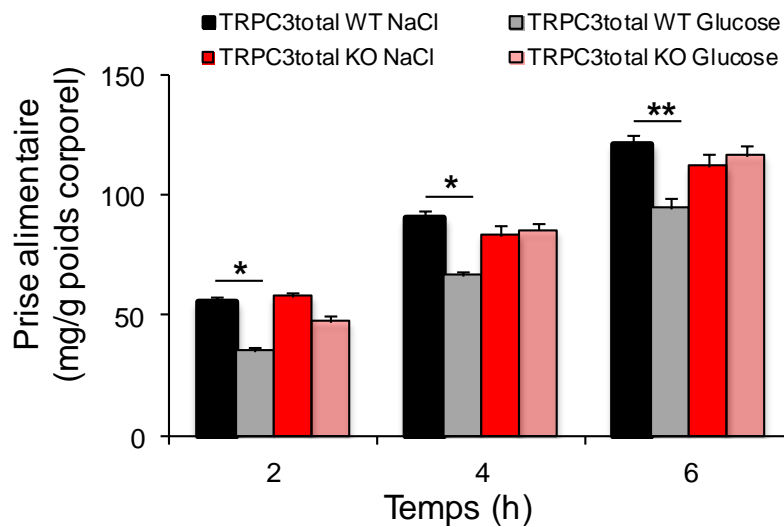


Figure 44 : Implication des canaux TRPC3 centraux dans l'effet satiétogène du glucose en réponse à une hyperglycémie systémique

Suivi de la prise alimentaire au cours du temps en réponse à une injection *ip* de glucose (2mg/kg) ou de NaCl chez les souris TRPC3^{total} WT (NaCl : n=7 ; Glucose : n=8) et TRPC3^{total} KO (NaCl : n= 6; Glucose : n=7) après un jeûne de 18h. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. NaCl, Two-Way ANOVA + post-test Bonferroni.

L'injection *ip* de glucose augmente les niveaux plasmatiques, et centraux, d'autres paramètres métaboliques, en plus du glucose tels que l'insuline ou le GLP1 qui pourraient être responsables des effets anorexigènes observés. Pour déterminer si les canaux TRPC3 régulent la prise alimentaire spécifiquement par le « signal » glucose, du glucose a été infusé *icv* (125 μ g dans 2 μ l en 5 min). La prise alimentaire est significativement inférieure chez les souris TRPC3^{total} WT ayant reçu une infusion de glucose *icv* comparée aux souris TRPC3^{total} WT ayant reçu la solution contrôle de sucrose (osmolarité identique entre les différentes solutions) (**Figure 45** ; $p < 0,05$). En revanche, l'effet anorexigène du glucose administré *icv* est aboli chez les souris TRPC3^{total} KO (**Figure 45** ; $p > 0,05$)

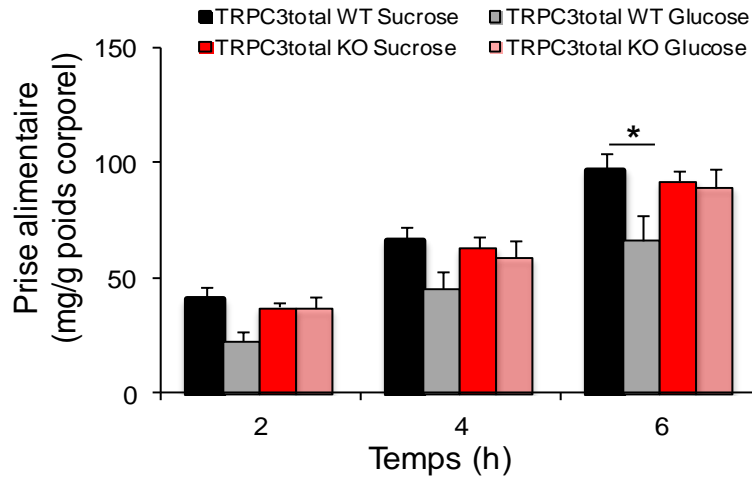


Figure 45 : Implication des canaux TRPC3 centraux dans l'effet satiétogène du glucose (icv) lors de l'hyperglycémie

Suivi de la prise alimentaire au cours du temps en réponse à une infusion *icv* de glucose ou de sucrose (ventricule latéral, 125 µg) chez les souris TRPC3^{total} WT (Sucrose : n=6 ; Glucose : n=5) et TRPC3^{total} KO (Sucrose : n= 6; Glucose : n=6) après un jeûne de 18h. * p<0,05 vs. Sucrose, Two-Way ANOVA + post-test Bonferroni.

Le canal TRPC3 central, mis en jeu dans la réponse au glucose des neurones HGE, est impliqué dans la détection centrale de l'augmentation de la concentration de glucose et l'effet satiétogène du glucose.

Le « phénotypage » des souris TRPC3^{total} KO en termes de poids, de prise alimentaire et glycémie basale et de tolérance au glucose et à l'insuline a été réalisé (Figure 48 ; cf p.121 résultats complémentaires).

II.2.2.2. Implication des canaux TRPC3 du MBH dans des perturbations métaboliques

Dans un second temps, nous avons déterminé si le canal **TRPC3 du MBH** est impliqué dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Pour cela, nous avons généré un modèle de souris déficiente pour le canal TRPC3 spécifiquement dans le MBH (**souris TRPC3^{MBH} KO**) en injectant, par stéréotaxie, un adénovirus (AAV) exprimant la Cre recombinase (AAV CBA-cre/GFP, (Cansell et al., 2014)) dans le MBH de souris TRPC3^{lox/lox} (Hartmann et al., 2008). Nous avons ensuite étudié la prise alimentaire, l'évolution du poids corporel, la glycémie basale et la tolérance au glucose de ces animaux. Précisons que les

résultats présentés ci-dessous sont à prendre avec précaution. En effet, la vérification du site d'injection de l'AAV et la quantification du taux d'extinction de l'expression du gène *trpc3* est toujours en cours d'analyse par RT-qPCR pour chaque souris.

De façon intéressante, 6 semaines après injection de l'AAV dirigé contre l'expression du gène *trpc3*, les souris TRPC3^{MBH} KO mangent significativement plus (Figure 46A ; augmentation $120,3 \pm 6,9 \%$; $p < 0,05$), prennent plus de poids (Figure 46C) et présentent une forte augmentation du tissu adipeux périgonadique par rapport aux souris TRPC3^{MBH} WT injectées avec l'AAV contrôle (Figure 46C ; augmentation $227,4 \pm 32,6 \%$; $p < 0,01$). En revanche, les souris TRPC3^{MBH} KO présentent une glycémie basale (Figure 46D) et une tolérance au glucose identique aux souris TRPC3^{MBH} WT (Figure 46E).

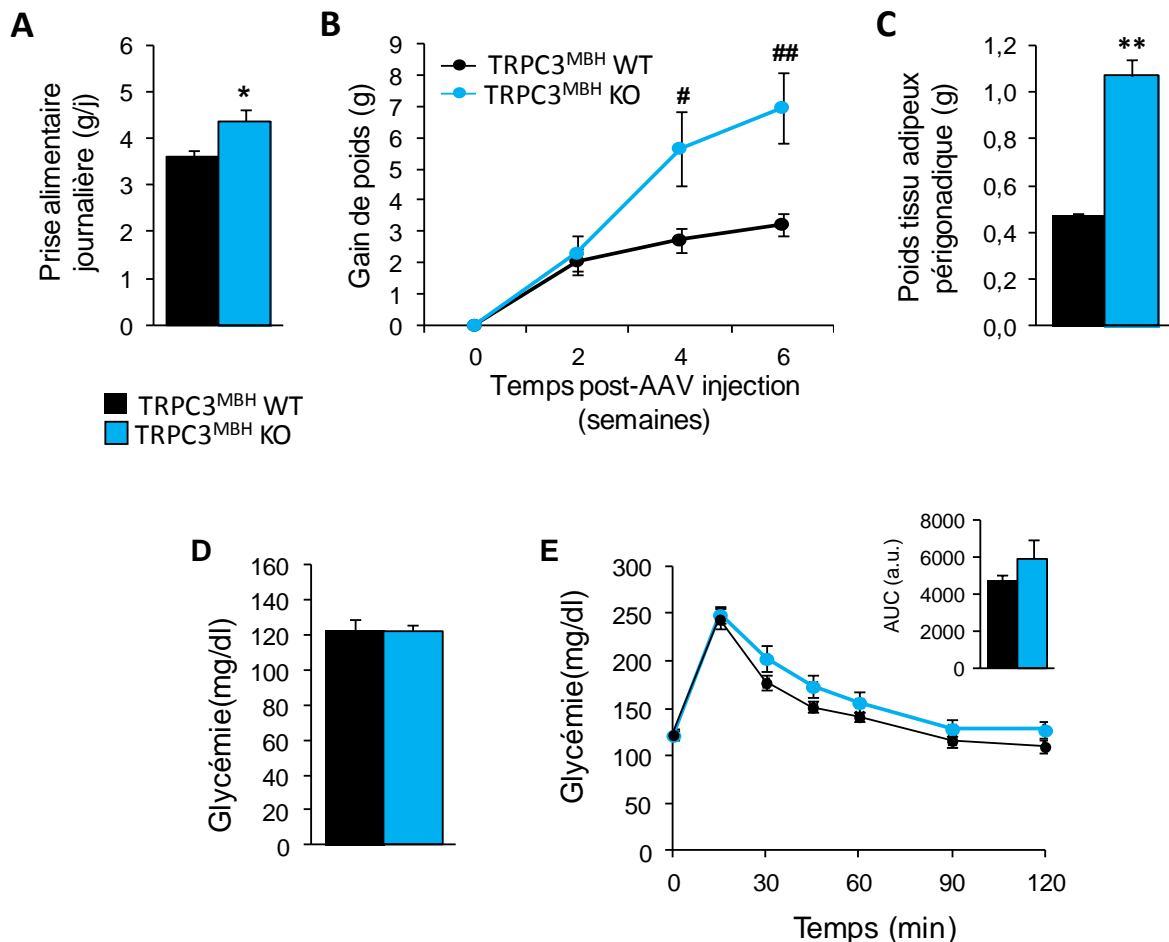


Figure 46 : Phénotypage métabolique des souris TRPC3^{MBH} KO

Prise alimentaire journalière (A), suivi de poids au cours du temps (B) et poids du tissu adipeux périgonadique (C) chez les souris TRPC3^{MBH} WT (noir, n=14) et TRPC3^{MBH} KO (bleu, n=18) 6 semaines après l'injection d'AAV. Glycémie basale (D) et suivi de la glycémie (E gauche, aire sous la courbe (AUC) durant un test de tolérance ip au glucose (ipGTT, 2g/kg) chez les souris TRPC3^{MBH} WT (noir, n=12) et TRPC3^{MBH} KO (rouge, n=15) 4 semaines après l'injection d'AAV. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *t*-test ; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, Two-Way ANOVA + post-test Bonferroni.

Les canaux TRPC3 du MBH sont donc impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique, en particulier dans la régulation de la prise alimentaire et du poids corporel.

Le rôle du canal TRPC3 du MBH dans la détection centrale du glucose est en cours d'exploration. Les résultats préliminaires sont présentés p. 121-123 (**Figures 49-50**, cf résultats complémentaires).

II.2.3. Partie 3 : Déterminer si les neurones HGE et les canaux TRPC sont associés à l'altération de la sensibilité hypothalamique au glucose et le développement de pathologies métaboliques induites par un régime alimentaire diabétogène.

Des données de la littérature montrent une modification de la sensibilité au glucose des neurones GE chez la souris diabétique et obèse *db/db* (Cotero et al., 2010). Néanmoins, très peu de choses sont connues à propos d'éventuelles perturbations de la détection cérébrale du glucose dans les modèles animaux de diabète induit par l'alimentation. **La dernière partie du projet a été de déterminer si la détection hypothalamique de l'hyperglycémie est altérée dans un modèle de diabète induit par l'alimentation.** Cette étude a été réalisée conjointement avec une doctorante de l'équipe Lucie Desmoulins dont le projet de thèse est d'étudier l'effet d'un régime diabétogène sur la détection hypothalamique du glucose. Pour cela, nous avons déterminé si la réponse au glucose des neurones HGE était altérée dans un modèle de rat rendu pré-diabétique après 3 semaines de régime diabétogène dit « High-Fat, High-Sucrose » (HFHS), riche en gras et en sucrose (**Tableau 7**).

Tableau 7 : Composition des régimes standard et HFHS

	Régime standard	Régime HFHS
Glucides (en %)	59,9	38,5
Lipides (en %)	3,1	46
Protéines (en %)	16,1	15,5
Apport calorique (Kcal/Kg)	2791	4397

Après 3 semaines de régime HFHS, les animaux présentent une hyperphagie, une hyperglycémie basale, un poids normal, une intolérance au glucose et une altération de la détection hypothalamique de l'hyperglycémie qui se traduit par une altération de la sécrétion d'insuline en réponse à l'injection d'un bolus de glucose intra-carotidien (Desmoulins et al, *en préparation*). Des cultures de cellules dissociées de MBH chez des rats STD et des HFHS ont été réalisées et les réponses à l'augmentation de la concentration de glucose de 2,5 à 10 mM des neurones HGE a été comparée chez ces 2 groupes comme précédemment. Le pourcentage de neurones HGE dans les cultures de rats STD et HFHS est identique (**Figure 46C**). Néanmoins, l'intensité de la réponse au glucose (AUC) des neurones HGE issus des rats HFHS est significativement inférieure à celle des animaux STD (**Figure 47A, B, D gauche** ; diminution $57,03 \pm 10,01$ % vs STD ; $p < 0,05$). En revanche la latence de la réponse au glucose n'est pas affectée chez les rats HFHS (**Figure 47D droite**). L'amplitude de la réponse au KCl des neurones HGE est identique chez les rats STD et HFHS (**Figure 47E**). Ces résultats montrent que **la détection de l'augmentation de la concentration de glucose des neurones HGE est altérée après 3 semaines de régime diabétogène HFHS**.

Nous avons vu précédemment que la réponse au glucose des neurones HGE repose sur les canaux TRPC3/4. Nous avons déterminé par RT-qPCR si l'altération de détection du glucose de ces neurones pouvait s'expliquer par la diminution de l'expression des canaux TRPC3/4 dans le MBH des rats HFHS. Les résultats montrent que l'expression de ces canaux est similaire chez les rats HFHS et STD (**Figure 47F**).

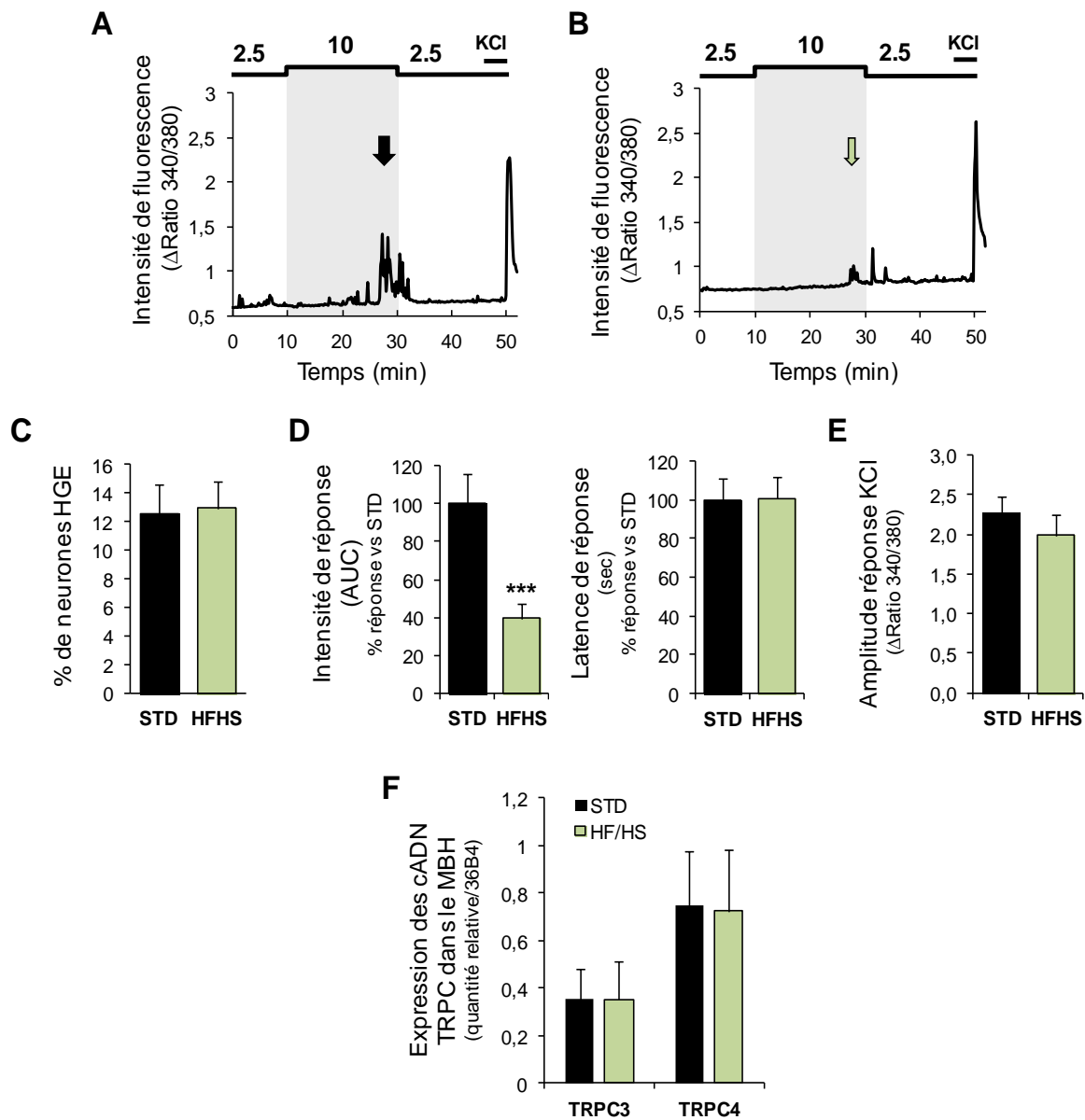


Figure 47 : Réponse du glucose des neurones HGE du MBH de rat rendu diabétique avec un régime HFHS

Traces représentatives de la réponse au glucose d'un neurone HGE chez les rats nourris avec un régime standard (STD, A) ou sous le régime diabétogène (HFHS, B) pendant 3 semaines. Pourcentage de neurones HGE (C), quantification de l'intensité (AUC ; D gauche) et de la latence (D droite) de la 2nd réponse au glucose 10 mM (C) et amplitude de la réponse au KCl (50 mM) chez les rats nourris avec un régime standard (STD) ou sous le régime diabétogène (HF/HS) pendant 3 semaines. STD : n=31 HGE/ 315 cellules totales, HFHS : n=34 HGE/ 339 cellules totales, 3 cultures indépendantes. Quantités relatives des ADNc TRPC 3, 4 exprimés par rapport au gène de référence 36B4 dans le MBH des rats STD (n = 5) et HFHS (n = 6) (F). *** p<0,05, unpaired t-test.

II.3. Résultats complémentaires

II.3.1. Phénotypage souris TRPC3^{total} KO

Le poids corporel des souris TRPC3^{total} KO et WT est identique au cours du temps (**Figure 48B**). De façon surprenante, les souris TRPC3^{total} KO présentent une diminution significative de la prise alimentaire basale par rapport aux souris TRPC3^{total} WT (**Figure 48A** ; diminution $23,4 \pm 4,3$ % ; $p < 0,05$). Les souris TRPC3^{total} KO présentent une hyperglycémie basale (**Figure 48C**; augmentation $15 \pm 2,9$ % ; $p < 0,05$) associée à une légère intolérance au glucose sans modification de la sécrétion d'insuline (**Figure 48D**). Cette intolérance au glucose est également retrouvée lors d'un test de tolérance *ip* au glucose (ipGTT, 2g/kg ; données non montrées). Ces résultats laissent supposer un état diabétique des souris TRPC3^{total} KO et suggèrent une résistance à l'insuline des souris TRPC3^{total} KO. La réalisation d'un test de tolérance à l'insuline (**Figure 48E** ; ITT, 0,75U/kg de souris) montre que : 1) la glycémie descend autant chez les souris TRPC3^{total} KO par rapport au souris TRPC3^{total} WT et 2) le retour à la glycémie basale est plus rapide chez les animaux TRPC3^{total} KO par rapport aux souris TRPC3^{total} WT après injection d'insuline (**Figure 48E**). Ces résultats suggèrent que les souris TRPC3^{total} KO ne sont pas résistantes à l'insuline mais présenteraient une CRR exacerbée. Les taux plasmatiques d'adrénaline et/ou de glucagon pourraient être plus élevés chez ces animaux ce qui augmenterait la production endogène de glucose et expliquerait l'hyperglycémie basale des souris TRPC3^{total} KO. Cette hypothèse reste à être vérifiée. Notons que l'implication du canal TRPC3 dans l'initiation de la CRR n'a jamais été étudiée à ce jour. **Les canaux TRPC3 sont donc impliqués dans le contrôle de l'homéostasie glucidique.** Néanmoins, le canal TRPC3 est exprimé en périphérie notamment dans le muscle squelettique où il participe à la sensibilité à l'insuline (Fauconnier et al., 2007; Lanner et al., 2009). Les perturbations métaboliques observées chez la souris TRPC3^{total} KO pourraient être attribuées à un effet périphérique du canal TRPC3, et non pas central, au vu de son rôle important dans le muscle.

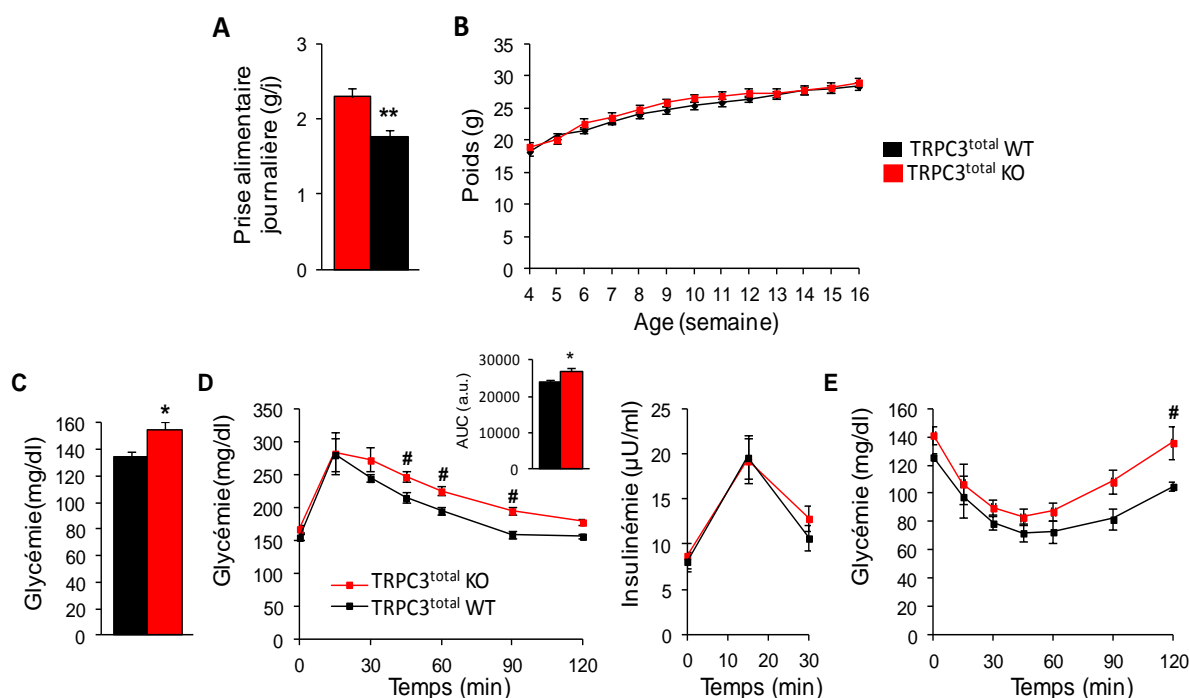


Figure 48 : Phénotypage métabolique des souris TRPC3^{total} KO

Prise alimentaire journalière (A) des souris TRPC3^{total} WT (noir, n=6) et TRPC3^{total} KO (rouge, n=7). Suivi de poids au cours du temps (B) des souris TRPC3^{total} WT (noir, n=16) et TRPC3^{total} KO (rouge, n=14). Glycémie basale (C) et suivi de la glycémie (D gauche, aire sous la courbe (AUC)) durant un test de tolérance oral au glucose (OGTT, 2g/kg) et taux d'insuline plasmatique stimulé par le glucose aux temps t15 et t30min de l'OGTT (D droite) chez les souris TRPC3^{total} WT (noir, n=10) et TRPC3^{total} KO (rouge, n=8). Suivi de la glycémie durant un test de tolérance à l'insuline (ITT ; E ; 0.75U/kg) chez les souris TRPC3^{total} WT (noir, n=6) et TRPC3^{total} KO (rouge, n=5). * p<0,05, ** p<0,01, t-test ; # p<0,05, Two-Way ANOVA + post-test Bonferroni.

II.3.2. Rôle du canal TRPC3 du MBH dans la détection centrale du glucose

Nous venons de voir que l'utilisation d'un « modèle KO total » n'est pas optimale. Le canal TRPC3 est exprimé dans des tissus périphériques impliqués dans le métabolisme et dans diverses aires cérébrales pouvant influencer la prise alimentaire et l'homéostasie glucidique. Nous nous sommes intéressés au **rôle du canal TRPC3 du MBH dans la détection centrale du glucose**. Pour cela, comme pour la souris TRPC3^{total} KO, nous avons déterminé si la diminution de la prise alimentaire (effet satiétogène du glucose) et la stimulation nerveuse de la sécrétion d'insuline (via l'axe nerveux hypothalamo-pancréatique) induite par une augmentation de la concentration cérébrale de glucose étaient altérées chez la souris TRPC3^{MBH} KO. Comme énoncé précédemment, la vérification du site d'injection de l'AAV et la quantification du taux d'extinction de l'expression du gène *trpc3* est en cours d'analyse par PCR, les résultats sont donc à prendre avec précaution.

Le test de détection hypothalamique de l'hyperglycémie a été réalisé chez la souris TRPC3^{MBH} KO, comme précédemment. Les résultats montrent que les souris contrôles TRPC3^{MBH} WT ne présentent pas de pic de sécrétion d'insuline à t=1min en réponse au bolus carotidien de glucose. Ces résultats surprenants sont contraires aux données de l'équipe et à nos résultats précédents obtenus chez la souris TRPC3^{total} WT (Fergusson et al., 2014). Ils ne permettent malheureusement pas d'interpréter nos données pour les souris TRPC3^{MBH} KO (**Figure 49**).

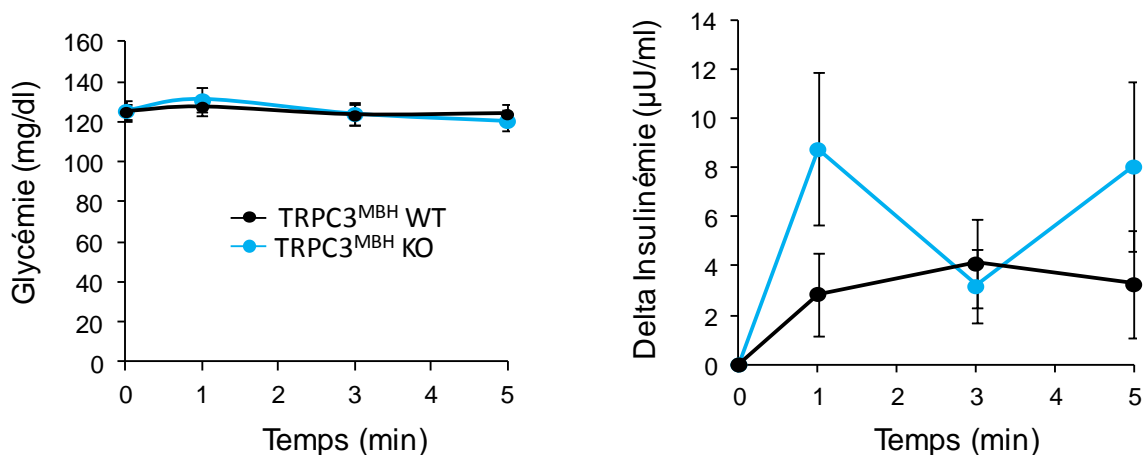


Figure 49 : Implication des canaux TRPC3 du MBH dans la sécrétion nerveuse d'insuline induite par une hyperglycémie cérébrale

Suivi de la glycémie (courbes de gauche) et de la sécrétion d'insuline (courbes de droite ; delta insulinémie par rapport au temps t=0min avant injection, aire sous la courbe (AUC)) chez les souris TRPC3^{MBH} WT (noir, n=14) et TRPC3^{MBH} KO (bleu, n=14) en réponse au bolus carotidien de glucose (25 mg/kg) en direction du cerveau. ns : p<0,05 vs. WT, Two-Way ANOVA + post-test Bonferroni.

Il est important de préciser que ce test de détection hypothalamique de l'hyperglycémie a été mis au point au laboratoire chez la souris C57/bl6. Les souris TRPC3^{lox/lox} sont issues d'un croisement entre des souris de fond génétique C57/bl6 et sv129 (Hartmann et al., 2008) suggérant que les souris sv129 ne serait pas un modèle animal approprié pour ce test de détection centrale de l'hyperglycémie. En accord, les souris sv129 ne sécrètent pas d'insuline en réponse au bolus carotidien de glucose (données non montrées).

Bien que les résultats obtenus chez la souris TRPC3^{MBH} KO soient ininterprétables, l'étude pharmacologie (Pyr3) chez le rat montre que le canal TRPC3 du MBH est impliqué dans la détection centrale de l'hyperglycémie et la sécrétion nerveuse d'insuline.

Dans un second temps, nous avons déterminé si les canaux TRPC3 du MBH sont impliqués dans la diminution de la prise alimentaire en réponse à l'hyperglycémie cérébrale. Pour cela, l'effet anorexigène du glucose induite par une augmentation de la concentration cérébrale en glucose a été étudiée en réponse à l'injection ip (2g/kg), comme précédemment. Les souris TRPC3^{MBH} WT ayant reçu la solution de glucose auraient tendance à manger moins les deux premières heures suivant l'injection comparées aux souris TRPC3^{total} WT ayant reçu la solution contrôle de NaCl (**Figure 50** ; $p > 0,05$). L'effet anorexigène du glucose serait perdu à 4 et 6 heures après injection de glucose chez les souris TRPC3^{MBH} WT. En revanche, l'effet anorexigène du glucose semblerait totalement aboli chez les souris TRPC3^{total} KO (**Figure 50** ; $p > 0,05$).

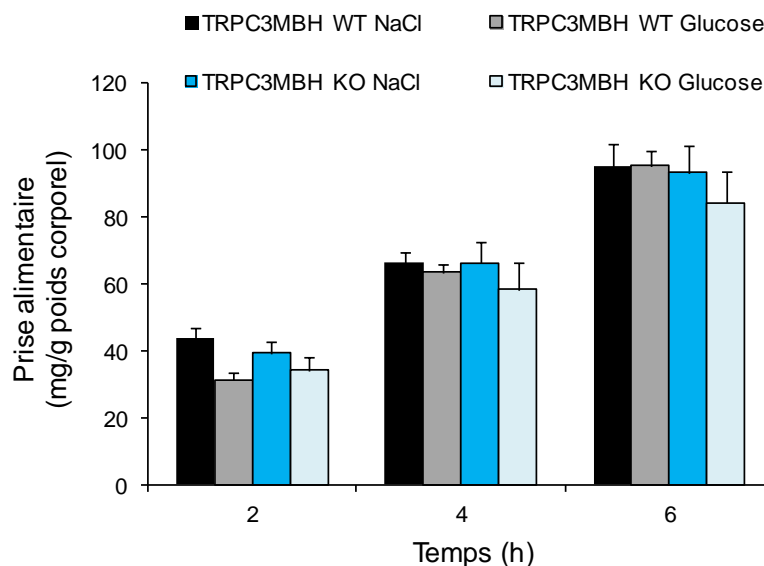


Figure 50 : Implication des canaux TRPC3 du MBH dans l'effet satiétogène du glucose (ip) lors de l'hyperglycémie

Suivi de la prise alimentaire au cours du temps en réponse à une injection *ip* de glucose (2mg/kg) ou de NaCl chez les souris TRPC3^{MBH} WT (NaCl : n=5 ; Glucose : n=7) et TRPC3^{MBH} KO (NaCl : n=6 ; Glucose : n=8) après un jeûne de 18h et cela 5 semaines après l'injection d'AAV. ns : vs. NaCl, Two-Way ANOVA + post-test Bonferroni.

Bien que préliminaires, ces résultats suggèreraient que le canal TRPC3 du MBH serait impliqué dans la détection centrale de l'hyperglycémie et l'effet anorexigène du glucose. Ces résultats seront complétés entre le dépôt du manuscrit et ma soutenance de thèse.

II.4. Discussion

Nous avons émis l'hypothèse que les canaux TRPC sensibles aux EAOs étaient impliqués dans la détection centrale de l'hyperglycémie et le contrôle de l'homéostasie glucidique via la modulation de l'activité de neurones dits HGE du MBH. En couplant des approches *in vitro* et *in vivo*, nous montrons que **1)** les EAOS et les canaux TRPC3/4 sont impliqués dans la détection de l'augmentation de la concentration de glucose des neurones HGE, **2)** le canal TRPC3 central participe à la détection cérébrale de l'hyperglycémie conduisant à la diminution de la prise alimentaire et l'augmentation de la sécrétion nerveuse d'insuline, **3)** le canal TRPC3 du MBH joue un rôle clef dans le contrôle de l'homéostasie énergétique, en particulier dans le contrôle de la prise alimentaire et du poids corporel, **4)** la réponse au glucose des neurones HGE est altérée lors du DT2 induit par l'alimentation.

II.4.1. Choix du modèle permettant d'étudier les HGE dans le MBH

II.4.1.1. Choix de l'imagerie calcique

L'imagerie calcique et l'électrophysiologie sont les deux principales techniques utilisées pour étudier, *in vitro*, les neurones sensibles au glucose (Fioramonti et al., 2004; Kang et al., 2004; Muroya et al., 2004; Song et al., 2001). Contrairement aux techniques d'électrophysiologie qui ne permettent que l'enregistrement de l'activité d'une seule cellule à la fois, l'imagerie calcique offre l'avantage de visualiser des changements d'activité sur un grand nombre de cellules simultanément. Ceci est particulièrement intéressant dans le cadre de l'étude des neurones HGE car ils ne représentent qu' ≈ 10 % des neurones du MBH et aucun marqueur ne leur est connu. Par ailleurs, l'imagerie calcique permet ensuite de prélever plus facilement les neurones HGE isolés pour déterminer les neuropeptides ou les acteurs moléculaires de détection de glucose exprimé dans ces neurones par RT-PCR sur cellule unique post imagerie (Kang et al., 2004). Elle présente cependant quelques limites. Elle ne donne aucune information sur la nature du canal impliqué dans la réponse au glucose des neurones HGE sans approche pharmacologique, contrairement à l'électrophysiologie. La mesure de la $[Ca^{2+}]_i$ est une mesure indirecte de l'activité électrique neuronale. Un neurone peut augmenter sa $[Ca^{2+}]_i$ via l'activation d'une voie de signalisation indépendamment de l'augmentation de la concentration extracellulaire en glucose, laissant penser qu'il est GS. L'imagerie calcique peut donc induire des faux positifs. Néanmoins, il semble peu probable

que nous ayons beaucoup de faux positifs selon nos critères de discrimination des neurones HGE car nous avons identifié un pourcentage de neurones HGE similaire aux données d'électrophysiologie (Fioramonti *et al.* 2004). Nous avons alors choisi l'imagerie calcique comme stratégie expérimentale pour caractériser la nature du canal mis en jeu dans la réponse au glucose des neurones HGE. Ceci a nécessité la mise en place d'une installation d'imagerie calcique et d'une culture de cellules dissociées de MBH dans le laboratoire pendant les premiers mois de ma thèse. Ces deux techniques sont maintenant pleinement opérationnelles et utilisées en routine par d'autres membres de l'équipe ainsi que par d'autres équipes du laboratoire.

II.4.1.2. Concentration de glucose utilisée

La concentration basale de glucose dans le cerveau est approximativement de 2-2,5 mM (Silver and Erecińska, 1994). Désormais les études s'accordent à utiliser une concentration basale de glucose de 2,5 mM pour étudier les neurones GS (Kang et al., 2004; Song et al., 2001). Pour identifier les neurones HGE du MBH dans notre modèle de culture, nous avons réalisé une augmentation de la concentration extracellulaire en glucose de 2,5 à 10 mM pour mimer, *in vitro*, une hyperglycémie cérébrale. Nous sommes conscients que la concentration de glucose lors d'une hyperglycémie sévère n'excède pas 4,5 mM dans le tissu nerveux (Silver and Erecińska, 1994). Toutefois, de par la localisation du NA à côté de l'éminence médiane où la BHE est plus lâche (Ciofi, 2011; Schaeffer et al., 2013), il est possible que les neurones HGE du MBH soit exposés à des concentrations de glucose plus proche de la glycémie. Ainsi, les neurones HGE pourraient émettre leurs dendrites autour ou à proximité des capillaires sanguins fenestrés, leurs permettant de détecter des variations de la concentration de glucose supérieures à 4,5 mM. En accord, nos données préliminaires de courbe dose-réponse suggèrent que les neurones HGE détecteraient l'augmentation de la concentration de 2,5 à 7,5 mais pas de 2,5 à 5 mM.

II.4.2. Caractérisation des neurones HGE dans le MBH

8% des neurones du MBH enregistrés en imagerie calcique sont des neurones HGE présentant une augmentation de leur activité calcique en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose de 2,5 à 10 mM. L'existence et le pourcentage que nous observons

de neurones HGE dans le MBH sont en accord avec les résultats obtenus par notre équipe en électrophysiologie (Fioramonti et al., 2004).

II.4.2.1. Détection directe du glucose

Les neurones GS peuvent détecter directement ou indirectement l'augmentation de la concentration de glucose (Song et al., 2001). Qu'en est-il pour les neurones HGE ? La TTX (bloqueur la transmission synaptique) inhibe la réponse au glucose des neurones HGE et GE du NA suggérant qu'ils détectent directement l'augmentation de la concentration de glucose (Fioramonti et al., 2004). Néanmoins, la TTX ne bloque pas la transmission d'informations entre les cellules gliales et les neurones. Notre équipe et d'autres ont montré que des astrocytes et les tanocytes du NA sont activés lors d'une augmentation de la concentration cérébrale en glucose (Frayling et al., 2011; Guillod-Maximin et al., 2004; Orellana et al., 2012). De plus, GLUT2, qui serait le transporteur de glucose clef de la détection d'une forte augmentation de la concentration en glucose, est principalement exprimé au niveau glial et neuronal dans l'hypothalamus (Arluison et al., 2004a, 2004b; Orellana et al., 2012). Ainsi, un couplage fonctionnel cellule gliale / neurone pourrait rendre compte de l'excitation des neurones HGE en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose. Nous montrons pour la première fois, sur culture de neurones isolés où les connexions entre cellules sont absentes, que les neurones HGE détectent directement les variations de la concentration en glucose. Des résultats similaires ont déjà été obtenus pour les neurones GE/GI du VMN (Le Foll et al., 2009b; Kang et al., 2004). Ces données sont en accord avec la littérature qui présente le MBH comme capable de détecter directement les paramètres métaboliques circulants (voir pour revue (Morton et al., 2014)).

II.4.2.2. Nature et rôles physiologiques des neurones HGE

Dans notre étude, l'altération métabolique, pharmacologique ou génétique de la réponse au glucose des neurones HGE est corrélée à l'altération de la sécrétion d'insuline et de la prise alimentaire en réponse à l'hyperglycémie cérébrale (Carneiro et al., 2012). Ces résultats permettent d'attribuer, pour la première fois, un rôle physiologique aux neurones HGE dans ces deux réponses.

L'identification de la nature des neurones HGE permettrait de confirmer ces rôles physiologiques et de déterminer s'ils contrôleraient d'autres fonctions comme par exemple la

production hépatique de glucose (Lam et al., 2005). Comme évoqué précédemment, la sensibilité au glucose de neurones POMC reste controversée. En utilisant les mêmes souris que celles utilisées dans les études d'Ibrahim et coll. et Claret et coll. (Claret et al., 2007; Ibrahim et al., 2003), pour qui les neurones POMC sont GS, nous démontrons, par imagerie calcique qu'aucun neurone isolé POMC n'est GS. Ce résultat conforte les données précédentes obtenues *ex vivo* et *in vivo* par notre équipe montrant que les neurones POMC ne répondent pas au glucose (Fioramonti et al., 2007). De plus, les neurones POMC n'expriment pas le canal TRPC3 (Qiu et al., 2010) alors que nous montrons qu'il est impliqué dans la réponse au glucose des neurones HGE. Par ailleurs, l'implication des neurones POMC dans la sécrétion nerveuse d'insuline n'avait jamais été explorée. En collaboration avec Z. Andrews (Université Monash, Australie), des données non publiées montrent que l'inactivation génétique de la carnitine acyltransférase (CRAT) dans les neurones POMC (souris CRAT^{POMC} KO) qui bloque leur sensibilité au glucose, n'a aucun effet sur la sécrétion nerveuse d'insuline mais abolit l'effet anorexigène du glucose en réponse à l'hyperglycémie cérébrale. Ainsi, l'ensemble de ces données nous permettent de montrer de manière non équivoque que les neurones POMC ne participeraient pas à la sécrétion nerveuse d'insuline, ce qui ne coïncide pas avec le rôle physiologique des neurones HGE. L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que les neurones HGE ne sont pas des neurones POMC.

Les neurones HGE du MBH pourraient rendre compte des effets anorexigènes de l'hyperglycémie via la libération d'autres neuropeptides que l' α -MSH. La neuromédine U, la nesfastine-1 et la kisspeptine sont d'autres neuropeptides anorexigènes synthétisés par des neurones du NA (Pałasz et al., 2012; Stengel et al., 2011; Wren et al., 2002). De plus, aucune donnée n'a suggéré un lien entre leur expression et des variations de la concentration en glucose ou qu'ils soient GS dans le NA. Toutefois, les neurones à nesfastin-1 du PVN sont des neurones gluco-sensibles de type GE (Gantulga et al., 2012). Par ailleurs, l'expression des canaux TRPC impliqués dans la réponse au glucose de neurones HGE n'a pas encore été recherchée dans ces 3 populations neuronales à l'exception des neurones à kisspeptine qui expriment le canal TRPC4 (Qiu et al., 2011). Ainsi, nous pouvons imaginer que les neurones HGE du NA soient une de ces trois populations neuronales.

Par ailleurs, nous ne pouvons pas exclure que les neurones HGE expriment un neurotransmetteur non peptidergique tel que le GABA ou le glutamate. Dans ce cas, les neurones sensibles au glucose pourraient jouer le rôle « d'interneurone » modulant l'activité et la libération de neuropeptides capables de réguler la prise alimentaire et/ou l'activité du SNA, comme le NPY ou l' α -MSH. L'existence d'interneurones glutamatergiques et

GABAergiques dans le NA qui se placent en amont des neurones NPY et POMC conforte cette hypothèse (Liu et al., 2012; Vong et al., 2011; Yang et al., 2011). Ainsi, nous proposons que les neurones HGE soient des neurones GABA qui inhibent les neurones NPY ou bien des neurones glutaminergiques qui activent les neurones POMC, aboutissant à la diminution de la prise alimentaire. Pour démontrer cette hypothèse, il serait intéressant de déterminer, par électrophysiologie, si la fréquence de courants pré-synaptiques excitateurs ou inhibiteurs est modifiée sur les neurones POMC ou NPY en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose.

Nous sommes actuellement en train de mettre au point la PCR sur cellule unique post imagerie calcique pour déterminer le/les neuromédiateurs exprimés dans les neurones HGE (nesfastine-1, neuromedine-U, kisspeptine, GABA, glutamate...). Les neurones HGE et non gluco-sensibles ont déjà été prélevés à l'aide d'une micropipette et l'expression des neuromédiateurs dans les neurones HGE et non-gluco-sensibles sera comparée pour déterminer si ce neuromodulateur peut-être un marqueur des neurones HGE.

II.4.3. Mécanismes de détection du glucose des neurones HGE

II.4.3.1. Les EAOs :

Les EAOs ne sont pas uniquement des produits de l'oxydation des substrats métaboliques mais jouent aussi un rôle dans le contrôle de l'homéostasie glucidique. En effet, les EAOs d'origine mitochondriale sont spécifiquement produites dans le MBH lors d'hyperglycémie et leur production est nécessaire à la diminution de la prise et l'augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose cérébrale (Carneiro et al., 2012; Leloup et al., 2006). Toutefois l'origine cellulaire des EAOs et leurs cibles moléculaires demeurent inconnues. Nous montrons que les EAOs, et plus précisément l' H_2O_2 , sont impliqués dans la réponse au glucose des neurones HGE. Ces données, en accord avec d'autres travaux, soutiennent l'importance des EAOS dans la régulation de l'activité neuronale dans le MBH. Par exemple, lorsque les neurones NPY/AgRP sont activés, lors d'une balance énergétique négative, les taux d'EAOS ne sont pas augmentés. En revanche, si la production de EAOs est incontrôlée dans les neurones NPY, leur activité électrique s'en trouve altérée (Andrews et al., 2008; Horvath et al., 2009). A l'inverse, en cas de balance énergétique positive, lorsque la concentration de glucose est élevée, les neurones POMC sont fortement activés et les EAOS s'accumulent dans ces

neurones. Cependant, lorsque la balance énergétique est négative, les taux d'EAOS sont réduits dans les neurones POMC et ces neurones sont silencieux (Andrews et al., 2008). Ainsi, l'augmentation des EAOs dans les neurones POMC serait un important régulateur d'activation neuronale. Nous n'avons pas réussi à montrer que les neurones HGE produisent les EAOs en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose. Néanmoins, les neurones de MBH étant dissociés, la probabilité qu'une cellule puisse produire des EAOs capables de modifier l'activité des neurones HGE avoisinant semble peu probable. Ce résultat surprenant peut facilement être remis en cause du fait de problème d'ordre technique. En effet, la sonde H₂DCFDA n'étant pas spécifique d'une EAOs en particulier, sa sensibilité à l'H₂O₂ pourrait être trop faible pour observer une augmentation de fluorescence dans les neurones HGE en réponse au glucose. De plus, la production d'EAOs pourrait être très transitoire et localisée dans le cytosol des cellules, ne permettant pas de la discriminer du bruit de fond. Il serait intéressant de reproduire cette expérience en utilisant une sonde spécifique de l'H₂O₂ comme la sonde NP1 (Wen et al., 2014) pour déterminer définitivement si les neurones HGE produisent les EAOs en réponse à l'hyperglycémie .

II.4.3.2. Les canaux TRPC :

Les neurones HGE détectent l'augmentation de la concentration de glucose par un mécanisme indépendant des canaux K_{ATP} (Fioramonti et al., 2004; Yang et al., 1999). Hormis l'implication d'un canal à CCNS, la nature du canal mis en jeu était inconnu (Fioramonti et al., 2004). Nous démontrons que les canaux TRPC redox sensibles sont impliqués dans la détection de l'augmentation de la concentration de glucose des neurones HGE du MBH. L'implication de canaux TRPC dans la détection de signaux périphériques hormonaux (insuline, leptine) par les neurones du MBH a déjà été démontrée, notamment pour les neurones POMC (Qiu et al., 2010, 2014). En revanche, le rôle des canaux TRPC dans la détection du signal « glucose » par les neurones GS du MBH est novateur.

Les canaux TRPC3, 4, 5 et 6 sont activés par les EAOs (voir pour revue (Shimizu et al., 2014)). Pour déterminer quelles sous-unités TRPC redox sensibles étaient impliquées dans la réponse au glucose des neurones HGE, nous avons utilisé des approches complémentaires pharmacologique et génétique en imagerie calcique. Nous montrons que le canal TRPC3 participe à la réponse au glucose des neurones HGE du MBH. Le canal TRPC3 est exprimé, très faiblement, dans le NA très ventral (données non montrées, obtenues en immunohistochimie), où ont été identifiés les neurones HGE (Fioramonti et al., 2004). Le canal TRPC3 ne semblait pas être la seule sous-unité TRPC impliquée dans la réponse au

glucose des neurones HGE. Le canal TRPC3 s'hétérodimérise avec presque tous les membres de sa famille pour être fonctionnel (Hofmann et al., 2002). De façon intéressante, les canaux TRPC3 et TRPC4 s'assemblent dans les cellules endothéliales pour former un complexe redox sensible (Poteser et al., 2006). Les résultats que nous avons obtenus montrent que le canal TRPC4, en plus du canal TRPC3, est impliqué dans la détection de l'augmentation de la concentration de glucose des neurones HGE. Pour confirmer nos résultats, l'utilisation de la PCR sur cellule unique permettrait de déterminer si les neurones HGE expriment ces 2 canaux, ceci est en cours de réalisation. Nous sommes actuellement capables de détecter la présence de TRPC4, par PCR sur cellule unique, dans un seul neurone de MBH. En revanche, nous ne détectons pas le canal TRPC3, sans doute lié à un très faible niveau d'expression. D'avantages de mises au point sont donc nécessaires. En complément de la PCR, la co-immunoprécipitation permettrait de déterminer si la sous-unité TRPC3 s'assemble avec TRPC4 dans le MBH (Hofmann et al., 2002). Enfin, une approche fonctionnelle pourrait confirmer l'implication des canaux TRPC3/4: serait-il possible de voir des neurones HGE chez la souris génétiquement invalidée pour ces 2 canaux?

Certains neurones HGE présentent des réponses résiduelles au glucose malgré l'inhibition simultanée des canaux TRPC3/4, suggérant qu'un troisième partenaire TRPC existerait. De façon intéressante, les canaux TRPC3/4 s'hétéromérisent dans les cellules endothéliales aortiques porcines à condition que le canal TRPC1 soit présent (Strübing et al., 2003). Ainsi, le canal TRPC1 pourrait également participer à la réponse au glucose des neurones HGE soit en s'hétéromérisant avec TRPC3/4, soit indépendamment du canal TRPC3/4. Pour déterminer si le canal TRPC1 est impliqué dans la réponse au glucose de neurones HGE, une approche pharmacologique est actuellement impossible car il n'existe pas d'inhibiteur sélectif du canal TRPC1. En revanche, la co-immunoprécipitation de TRPC1/3/4 dans le MBH, la PCR sur les neurones HGE et la recherche des neurones HGE chez la souris KO TRPC1 ou triple KO TRPC1/3/4 permettraient de répondre à cette hypothèse.

II.4.3.3. Cascade de transduction entre l'H₂O₂ et les canaux TRPC

Nous avons montré que l' H₂O₂ et les canaux TRPC sont impliqués dans la réponse au glucose de neurones HGE. Quelle cascade de transduction permet à l'H₂O₂ d'activer les canaux TRPC3/4, aboutissant à l'excitation des neurones HGE ? Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées :

1) Nous proposons que l'H₂O₂ active directement le canal TRPC3/4 dans les neurones HGE. L'activation du canal TRPC6 par oxydation des résidus thiol a été rapporté (Graham et

al., 2010; Liu et al., 2013). Il demeure inconnu si l'H₂O₂ oxyde des résidus sérines ou thréonines du canal TRPC3/4. Néanmoins, Balzer et coll. montrent que le canal TRPC3 serait insensible à l'H₂O₂ (Balzer et al., 1999), la sensibilité du canal TRPC4 à l'H₂O₂ n'a pas été recherchée. Dans le cas où le canal TRPC4 serait aussi insensible à l'H₂O₂, il semble peu probable que le canal TRPC3/4 impliqué dans la réponse au glucose des neurones HGE soit activé par oxydation directe.

2) Récemment de nombreuses études rapportent la modulation de l'expression des canaux TRPC par les EAOs (Graham et al., 2011; Kim et al., 2012; Liu et al., 2013, 2008). Par exemple, Liu et coll montrent que la production d'H₂O₂ induite par l'hyperglycémie augmente l'expression de TRPC6 dans les plaquettes, monocytes, et podocytes (Liu et al., 2013, 2008; Wuensch et al., 2010). Néanmoins, la sécrétion d'insuline induite par la détection centrale de l'hyperglycémie étant de l'ordre de la minute, *in vivo*, il semble improbable que les EAOs puissent modifier, en si peu de temps, les niveaux d'expression des protéines TRPC3 et TRPC4 dans les neurones HGE. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que l'H₂O₂ jouerait plutôt sur le recrutement de TRPC3/4 à la membrane. Les canaux TRPC3 et TRPC4 peuvent être séquestrés dans des endosomes précoces puis transloqués rapidement à la membrane plasmique (voir pour revue (Souza and Ambudkar, 2014)). Le canal TRPC3 présente une activité constitutive (mais pas TRPC4) indiquant que l'exocytose du canal TRPC3/4 à la membrane dans les neurones HGE serait suffisante pour l'activer. Si notre hypothèse est correcte, inhiber l'adressage du canal TRPC3/4 à la membrane devrait inhiber les réponses calciques des neurones HGE lors de l'augmentation de la concentration de glucose.

3) Comme énoncé dans l'introduction, la PLC peut activer le canal TRPC3 via la production de DAG (Hofmann et al., 1999). Bien que le canal TRPC4 seul soit insensible au DAG, le canal TRPC3/4 redox-sensible est activé par l'OAG, l'analogue perméant du DAG (Poteser et al., 2006). En accord, nous montrons que le l'OAG mime la réponse au glucose de neurones HGE. Nous émettons l'hypothèse que l'H₂O₂ active le canal TRPC3/4 dans les neurones HGE par un mécanisme dépendant de la PLC. De façon intéressante, 1) la PLC γ est exprimée dans certains neurones du NA impliqué dans le contrôle de l'homéostasie énergétique, 2) la PLC γ participe à la voie de signalisation de détection de signaux périphérique (leptine) dans ces neurones (Qiu et al., 2010). Il a été rapporté que l'H₂O₂ induit la phosphorylation de tyrosine de la PLC γ qui augmente son activité enzymatique (Peng and Arendshorst, 2008), suggérant que l'H₂O₂ induit l'activation d'une protéine tyrosine kinase (PTK). En accord, les PTK sont activées par oxydation (Chiarugi, 2005). Pour déterminer si la

PLC γ est impliquée dans la réponse au glucose des neurones HGE, la seconde application de glucose 10 mM pourrait être réalisée en présence de l'inhibiteur sélectif de la PLC γ ET-18-OCH₃ (Qiu et al., 2010). Si notre hypothèse est correcte, la réponse au glucose des neurones HGE devrait être altérée en sa présence. En complément, l'expression de la PLC γ pourrait être recherchée spécifiquement dans les neurones HGE par PCR sur cellule unique (Qiu et al., 2010).

La figure ci-dessus résume ces 3 hypothèses (**Figure 51**). Notons que l'activation du canal TRPC3 par phosphorylation est à exclure car cette modification post-traductionnelle est associée à son inhibition. Au vu des données de la littérature et de nos résultats, la voie de signalisation de la PLC nous semble la plus probable pour expliquer comment l'H₂O₂ activerait les canaux TRPC3/4 dans les neurones HGE aboutissant à leur excitation en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose.

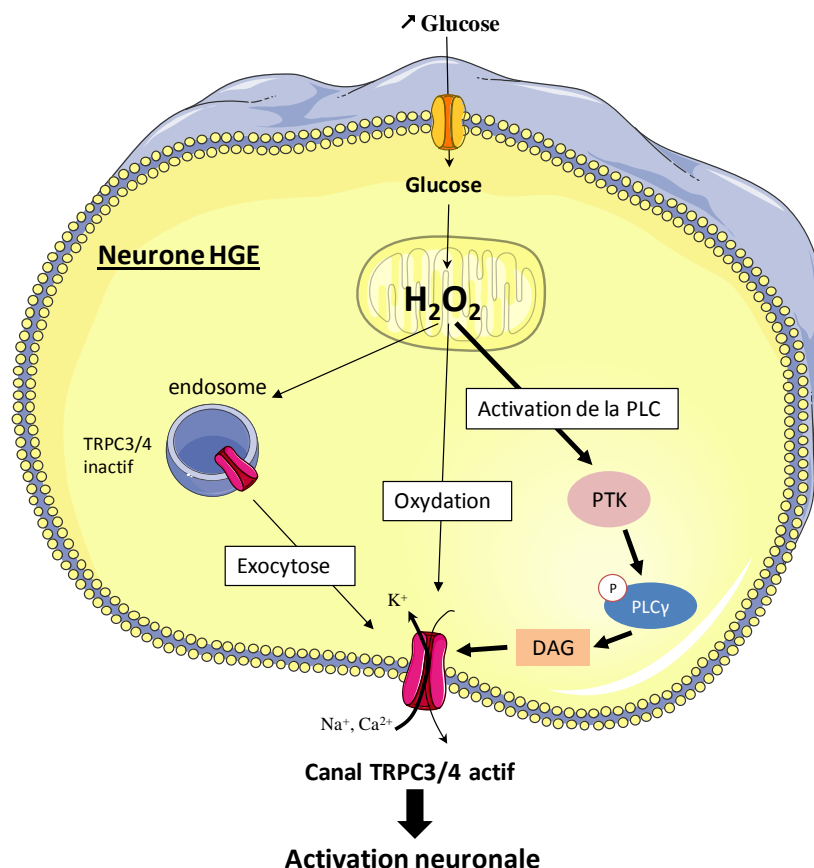


Figure 51 : mécanismes hypothétiques d'activation des canaux TRPC3/4 par l'H₂O₂ dans les neurones HGE du MBH

II.4.4. Rôles physiologiques et pathologiques des canaux TRPC3 centraux dans le contrôle de l'homéostasie glucidique et de la prise alimentaire

Les canaux TRPC sont largement exprimés dans le SNC (voir introduction p). Leur rôle dans le contrôle de l'homéostasie énergétique a été suggéré récemment par l'équipe de Kelly. Il est connu que l'activation soutenue des neurones POMC conduit à la diminution de la prise alimentaire et du poids corporel (Aponte et al., 2011; Zhan et al., 2013). L'équipe de Kelly montrent que l'insuline et la leptine excitent les neurones POMC du NA via l'activation des canaux TRPC (Qiu et al., 2010, 2014). Ainsi, ils suggèrent que les canaux TRPC, de par leur implication dans la modulation de l'activité des neurones POMC, seraient impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique.

Notre travail a permis de mettre en évidence, pour la première fois, le rôle du canal TRPC3 central, et de façon générale des canaux TRPC, dans le contrôle de l'homéostasie glucidique et de la prise alimentaire. L'augmentation de la concentration cérébrale de glucose, lors d'hyperglycémie, induit la stimulation de la sécrétion nerveuse d'insuline, la diminution de la prise alimentaire (Carneiro et al., 2012) et de la production hépatique de glucose (Lam et al., 2005). Nous montrons que la diminution de la prise alimentaire (effet satiétogène du glucose) et la stimulation nerveuse de la sécrétion d'insuline (via l'axe nerveux hypothalamo-pancréatique) induites par une augmentation de la concentration cérébrale de glucose sont altérées chez la souris génétiquement invalidée pour le canal TRPC3 dans tout l'organisme (souris TRPC3^{total} KO). Le canal TRPC3 central joue donc un rôle important dans la détection centrale de l'hyperglycémie. Il serait aussi pertinent de déterminer si le canal TRPC3 central participe à d'autres réponses physiologiques induites par l'hyperglycémie cérébrale comme la diminution de la production hépatique de glucose (Lam et al., 2005).

Nous avons ensuite déterminé le rôle du canal TRPC3 du MBH dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Puisque le canal TRPC3 participe à la diminution de la prise alimentaire en réponse au glucose, nous nous attendions à observer une susceptibilité à développer une hyperphagie et une obésité chez les souris TRPC3^{total} KO et TRPC3^{MBH} KO. En accord avec notre hypothèse, nous montrons que les souris TRPC3^{MBH} KO sont hyperphagiques. Ces résultats sont opposés à ceux obtenus pour les souris TRPC3^{total} KO, probablement lié au fait que le canal TRPC3 est exprimé dans différentes régions cérébrales impliquées dans le comportement alimentaire comme l'amygdale et le thalamus. Il serait intéressant de regarder sur quels paramètres les canaux TRPC3 du MBH modulent le comportement alimentaire. Affectent-ils la fréquence, la durée, l'amplitude, le moment des

repas ? L'hyperphagie des souris TRPC3^{MBH} KO est associée à un surpoids et cela dès 4 semaines après l'injection d'AAV. Ainsi, les canaux TRPC3 du MBH seraient impliqués dans la régulation de la prise alimentaire et du poids corporel, mais ceci reste à être confirmé. Les souris TRPC3^{MBH} KO sont normo glycémiques et ne présentent pas d'altération de la tolérance au glucose. Néanmoins, si nous avons suivi la glycémie basale et la tolérance au glucose au-delà de 6 semaines après l'injection des AAV, il est probable que les souris TRPC3^{MBH} KO aient développé un DT2. Ceci nous amène à la question suivante : les canaux TRPC hypothalamiques contribuent-ils dans l'apparition de pathologies métaboliques comme l'obésité et le DT2?

Pour répondre à cette question, il serait intéressant d'étudier la prédisposition à développer un diabète et une obésité chez les souris TRPC3^{MBH} KO nourries avec un régime riche en graisse (high fat diet, HFD). De par les résultats précédents, nous nous attendons à une exacerbation de l'hyperphagie et de l'obésité et l'apparition d'une intolérance au glucose et d'une hyperglycémie basale chez la souris TRPC3^{MBH} KO après un régime riche en graisse dit « HFD ». En accord avec cette hypothèse, les souris TRPC3^{total} KO sous régime HFD sont résistantes au régime les 4 premières semaines, puis deviennent grosses et plus intolérantes au glucose au cours du temps comparées aux souris nourries sous régime STD (données non montrées), suggérant qu'un diabète et une obésité s'installent progressivement. Toutefois, le canal TRPC3 est exprimé en périphérie notamment dans le muscle squelettique où il participe à la sensibilité à l'insuline (Fauconnier et al., 2007; Lanner et al., 2009). L'exacerbation des perturbations métaboliques observées chez la souris TRPC3^{total} KO pourraient être attribuées à un effet périphérique du canal TRPC3, et non pas central. Ces résultats préliminaires sont donc à prendre avec précaution avant d'être extrapolé à la souris TRPC3^{MBH} KO.

De nombreuses études témoignent aujourd'hui de dysfonctionnements dans la détection hypothalamique du glucose dans le DT2 et l'obésité (Alquier et al., 2003; Colombani et al., 2009; Parton et al., 2007; Routh, 2010; Song et al., 2001). Le rat Zucker obèse et insulino-résistant présente une hypersensibilité hypothalamique au glucose (Alquier et al., 2003; Colombani et al., 2009). Néanmoins, peu de choses sont connues à propos d'éventuelles perturbations de la détection hypothalamique du glucose dans les modèles animaux de diabète induit par l'alimentation. La sensibilité hypothalamique au glucose serait plutôt inhibée par l'alimentation (Parton et al., 2007; Song et al., 2001). En effet, Song et coll. rapportent une diminution des différentes populations de neurones GS en termes de nombre et une altération de leur réponse au glucose dans le VMN chez le rat rendu obèse par l'alimentation (modèle

DIO) (Song et al., 2001). De même, le pourcentage de neurones POMC du NA activés en réponse au glucose est diminuée dans un modèle de souris rendues obèses et diabétiques par un HFD (Parton et al., 2007). Nous montrons que l'intensité de la réponse au glucose des neurones HGE est altérée lors du DT2 induit par un régime HFHS. En revanche, le pourcentage de neurones HGE n'est pas affecté. Il est actuellement impossible de savoir avec exactitude si l'altération de la détection du glucose des neurones HGE du MBH est une cause ou une conséquence du DT2. Comment expliquer l'altération de la réponse au glucose des neurones HGE lors du DT2 induit par l'alimentation (régime HFHS) ?

Le DT2 altère l'expression et/ou l'activité des canaux TRPC (voir pour revue (Graham et al., 2012)). Nous proposons que l'altération de la réponse au glucose des neurones HGE lors du DT2 soit liée à une modification de l'expression des canaux TRPC3/4 dans ces neurones. Néanmoins, nos données montrent que l'expression de ces canaux TRPC3/4 est similaire chez les rats HFHS et STD dans le MBH. Bien que ce résultat n'aille pas dans le sens de notre hypothèse ils n'excluent pas que l'expression des canaux TRPC3/4 soit altérée spécifiquement dans les neurones HGE. La PCR sur cellule unique permettrait de quantifier l'expression des canaux TRPC dans les neurones HGE. Dans le cas où l'expression des canaux TRPC ne soit pas affectée dans les neurones HGE, il est possible que la cascade de signalisation permettant au glucose d'activer le canal TRPC3/4 soit altérée. Dans ce sens, il a été montré que la signalisation redox est perturbée dans le modèle de rats Zucker obèses et insulino-résistants (Colombani et al., 2009). Nous proposons que la production d'EAOs, impliquée dans la réponse au glucose des neurones HGE, soit altérée lors du DT2. En accord avec cette hypothèse, Lucie Desmoulins (doctorante au laboratoire) montre que l'altération de la détection hypothalamique de l'hyperglycémie chez le rat HFHS est corrélée à une diminution de la production d'EAOs dans le MBH (Desmoulins et al, *en préparation*). Ainsi, l'altération de détection du glucose des neurones HGE semblerait se situer en amont des canaux TRPC3/4. Nous avons alors testé s'il était possible de restaurer la détection hypothalamique de l'hyperglycémie chez le rat HFHS en activant le canal TRPC3. L'injection intra-MBH d'OAG, l'activateur du canal TRPC3, ne permettrait pas de restaurer la sécrétion nerveuse d'insuline induite par la détection centrale de l'hyperglycémie chez le rat HFHS, Néanmoins, cette étude, très préliminaire, nécessite d'être reproduite. La stimulation du canal TRPC3 n'ayant pas permis d'améliorer la détection hypothalamique d'une hyperglycémie, on pourrait se demander s'il ne serait pas nécessaire de stimuler simultanément les TRPC3 et TRPC4.

Conclusion et Perspectives

Lorsque nous avons débuté ces travaux, plusieurs points concernant la détection centrale du glucose étaient clairement montrés et admis :

- 1) le MBH joue un rôle clef dans la détection de l'hypoglycémie et de l'hyperglycémie. En effet, sa localisation stratégique proche du LCR et de la circulation sanguine (EM) et ses efférences vers les autres noyaux hypothalamiques, lui confèrent un rôle de pivot dans la régulation cérébrale de l'homéostasie énergétique de l'organisme.
- 2) le glucose, un substrat énergétique circulant fondamental à l'intégrité du SNC, joue également un rôle de molécule informative dans le contrôle du métabolisme énergétique. Il a ainsi été démontré que la concentration centrale en glucose induit, entre autre, une modulation de la prise alimentaire, de l'activité du SNA, de la sécrétion d'insuline et de glucagon ainsi que de la production hépatique de glucose.
- 3) la présence de cellules gliales et neuronales sensibles aux variations de la concentration de glucose dans le MBH, suggérant que la détection hypothalamique du glucose est soit directe par le neurone GS lui-même, soit indirecte via un couplage entre la cellule gliale et le neurone.

Jusqu'à présent, la majorité des études s'étaient focalisées sur les mécanismes cellulaires et moléculaires de détection directe des variations de la concentration de glucose en condition d'hypoglycémie. Il a alors été suggéré que les neurones GE/GI du MBH détectent l'hypoglycémie et participent à l'initiation de la contre-régulation et au déclenchement de la prise alimentaire. Néanmoins, moins d'études s'étaient intéressées aux mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la détection de l'augmentation de la concentration de glucose lors de l'hyperglycémie dans le MBH.

En combinant différentes approches *in vitro* et *in vivo*, les travaux de cette thèse mettent en évidence deux nouveaux mécanismes impliqués dans la détection hypothalamique de l'hyperglycémie :

- L'un indirect met en jeu les endozépinines astrocytaires en tant que relai du signal « glucose » aux neurones POMC pour diminuer la prise alimentaire en réponse à l'hyperglycémie.

- L'autre direct démontre l'implication, dans les neurones HGE, de l'ouverture des canaux TRPC3/4 redox-sensibles dans la détection de l'augmentation de la concentration de glucose.

L'ODN est libéré par les astrocytes en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose (Lanfray et al., 2013). Nous avons montré que l'ODN active spécifiquement les neurones POMC et diminue la fréquence des sIPSC sur ces neurones. L'ODN active-il les neurones POMC en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose en diminuant la fréquence des IPSCs? Pour répondre à cette question, il serait intéressant de comparer la fréquence des courants GABA sur les neurones POMC chez la souris sauvage et génétiquement invalidée pour le gène *acbp* (souris KO ACBP) en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose.

Même si nous montrons que les neurones HGE détectent directement l'augmentation de la concentration de glucose, *in vitro*, l'existence qu'un couplage fonctionnel entre les cellules gliales et les neurones HGE ne peut pas être exclue, *in vivo*.

Les hypothèses avancées pour expliquer le couplage glie/neurone HGE repose sur le lactate ou l'ATP puisqu'ils sont produits par les cellules gliales en réponse au glucose (Frayling et al., 2011; Orellana et al., 2012; Pellerin and Magistretti, 2012). Certains neurones GE du MBH sont activés par le lactate (Song and Routh, 2005; Yang et al., 1999). De façon intéressante, le lactate semble être un stimulus plus fort que le glucose lui-même et potentialiserait la réponse au glucose des neurones GE du VMN (Song and Routh, 2005). Ainsi, le lactate pourrait potentialiser la détection directe de l'augmentation de la concentration de glucose par les neurones HGE du MBH. Pour ce qui est de l'ATP issu des cellules gliales, il contribue directement à la régulation de l'activité neuronale via la stimulation des récepteurs purinergiques P2X et P2Y (Gordon et al., 2005). Les canaux P2X sont particulièrement intéressants car ils présentent une CCNS comme observée dans la réponse au glucose des neurones HGE. De plus, ils sont présents dans le NA où ont été identifiés les neurones HGE (Wakamori and Sorimachi, 2004). Ainsi, l'ATP produit par les tancytes, en réponse à l'hyperglycémie, pourrait informer les neurones HGE des taux de glucose ambiant (Frayling et al., 2011; Orellana et al., 2012). Il serait donc intéressant de

tester par imagerie si les neurones HGE présentent une augmentation de leur activité calcique en réponse au lactate ou l'ATP.

Par ailleurs, l'ODN produit dans le NA en réponse à l'hyperglycémie cérébrale pourrait jouer un rôle important dans la détection du glucose des neurones GS hypothalamiques. En d'autres termes, l'ODN pourrait exciter les neurones HGE du MBH via le récepteur métabotropique orphelin et ainsi diminuer la prise alimentaire (Lanfray et al., 2013; do Rego et al., 2007). Néanmoins, l'effet de l'ODN étant spécifique des neurones POMC, il semble peu probable qu'il puisse rendre compte de l'excitation des neurones HGE en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose. En revanche, si les neurones HGE font partis du système à mélanocortine, l'ODN pourrait agir indirectement sur ces neurones, par l'intermédiaire des neurones POMC. En d'autres termes, les neurones POMC pourraient activer les neurones HGE par l'intermédiaire de l' α -MSH pour diminuer la prise alimentaire en réponse à l'hyperglycémie. En accord avec cette interprétation, il a été montré que l'activité de certains neurones GS du NA est modulée par l' α -MSH (Wang et al., 2004). Il serait donc intéressant de déterminer si les neurones HGE sont sensibles à l' α -MSH et s'ils expriment les récepteurs MC3/4-R.

Dans le cadre de la régulation du métabolisme énergétique par le SNC, le laboratoire a montré que les mEAOs sont requises pour la détection hypothalamique du glucose (Leloup et al., 2006). Cette notion a pu être étendue à la détection pancréatique du glucose (Leloup et al., 2009; Pi and Collins, 2010). Les mEAOs sont également nécessaires au contrôle de la prise alimentaire et de la sécrétion d'insuline dans le cadre de la détection hypothalamique de l'hyperglycémie (Carneiro et al., 2012). L'importance de la production des mEAOs hypothalamiques en réponse à d'autres stimuli, comme la ghréline et la leptine a aussi été démontrée. La ghréline abaisse les taux de EAOs dans les neurone NPY ce qui conduit à leur excitation et l'augmentation de la prise alimentaire (Andrews et al., 2008). A l'opposé, la production de EAOs dans les neurones POMC est positivement corrélée aux taux de leptine circulante induisant leur activation et la diminution de la prise alimentaire (Diano et al., 2011). Si le type cellulaire produisant les EAOs en réponse à la ghréline et la leptine est connu, il n'a pas été déterminé en ce qui concerne les réponses au glucose. Un objectif important de l'équipe est l'identification du type cellulaire qui produit les mEAOs dans le MBH lors de l'hyperglycémie centrale. Nous montrons pour la première fois que les EAOs sont impliquées dans l'activation des neurones HGE lors de détection hypothalamique du

glucose. Bien que nous n'ayons pas réussi à le montrer directement, ceci suggère fortement que ce serait les neurones HGE qui produiraient les EAOs dans le MBH, ceci reste à être confirmé.

Bien que nous ayons identifié les canaux mis en jeu dans la réponse au glucose des neurones HGE, le(s) neuromédiateur(s) libéré(s) par les neurones HGE demeure(nt) inconnus. Un moyen indirect de mettre en évidence le rôle physiologique des neurones HGE a été de moduler leur activité *in vivo* en affectant le canal TRPC3 responsable de leur réponse au glucose. Cette stratégie a préalablement été utilisée pour étudier le rôle des neurones GE et GI du MBH (Fioramonti et al., 2010; Miki et al., 2001). Elle nous a permis de suggérer que les neurones HGE participent aux réponses physiologiques induites par l'hyperglycémie cérébrale. De plus, la connaissance du neuromédiateur exprimé dans les neurones HGE permettra de confirmer leur rôle dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Enfin, dans le cas où les neurones HGE constituent une population homogène, l'inhibition de l'expression du canal TRPC3 spécifiquement dans les neurones HGE permettra également de leur attribuer définitivement un rôle physiologique.

Ce travail montre que le canal TRPC3 est un acteur moléculaire de la détection hypothalamique du glucose. On peut tout de même se demander si le canal TRPC3 du MBH ne pourrait pas être impliqué dans la détection d'autres signaux périphériques. En effet, en plus de l'altération de la détection centrale du glucose, l'ablation génétique du canal TRPC3 du MBH aboutit à la dérégulation de la balance énergétique (augmentation de la prise alimentaire et apparition d'un surpoids). Nous avons vu que la production d'EAOs et l'activation de la voie de signalisation de la PLC ouvre le canal TRPC3. Quels signaux périphériques pourraient activer les canaux TRPC3 du MBH par l'intermédiaire des EAOs ou du DAG pour contrôler l'homéostasie énergétique?

L'hyperglycémie induit l'augmentation des taux plasmatiques d'insuline et de GLP1. L'administration icv d'insuline produit des EAOs dans le MBH qui sont nécessaires à l'effet anorexigène de cette hormone (Jaillard et al., 2009). Ainsi, nous proposons que l'effet anorexigène de l'insuline implique l'activation des canaux TRPC3 du MBH par les EAOs. Par ailleurs, l'administration icv de GLP1 diminue la prise alimentaire (Turton et al., 1996).

Le récepteur au GLP1, est fortement exprimé dans le NA notamment dans certains neurones contrôlant l'homéostasie énergétique (Sandoval et al., 2008). Le récepteur du GLP1 peut activer la voie de la PLC dans les cellules β du pancréas (Suzuki et al., 2006). Ainsi, il pourrait activer les canaux TRPC3 du MBH via la production de DAG induisant la diminution de la prise alimentaire. Les canaux TRPC3 pourraient alors être un acteur moléculaire de la détection hypothalamique, entre autre, de l'insuline et du GLP1.

Le glucose n'est pas le seul facteur métabolique périphérique à être détecté par le SNC. Nous avons vu que les lipides sont aussi capables de moduler la prise alimentaire (Obici et al., 2002). Comme l'insuline, la détection hypothalamique des lipides implique la production de mEAOs dans le MBH nécessaire à la diminution de la prise alimentaire (Benani et al., 2007). Nous proposons que l'effet satiétogène des lipides implique l'ouverture des canaux TRPC3 du MBH par les EAOs. Par ailleurs, des études montrent que des neurones GE/GI du MBH détectent des variations de la concentration en AG (Le Foll et al., 2009a, 2009b; Wang et al., 2006). De façon intéressante, les travaux de notre collaborateur T. Alquier montrent que l'augmentation de la concentration de glucose augmente l'estérification du palmitate en DAG dans les neurones hypothalamiques (Taïb et al., 2013). Ainsi, même si les neurones HGE ne sont pas sensibles aux lipides, ceux-ci pourraient potentialiser la réponse au glucose de ces neurones en ouvrant les canaux TRPC3. Les canaux TRPC3 pourraient alors être un acteur moléculaire de la détection hypothalamique des lipides. Il serait donc intéressant de déterminer, d'une part si les neurones HGE du MBH détectent eux aussi les lipides et d'autre part, si cela met en jeu le canal TRPC3.

Toutes ces données de la littérature suggèrent que les canaux TRPC3 pourraient se trouver au carrefour de l'intégration de plusieurs paramètres énergétiques hormonaux et/ou métaboliques.

Pour conclure, nos travaux confortent la présence d'au moins deux modes de détection centrale du glucose (**Figure 52**):

- Ils permettent de proposer un couplage entre les astrocytes et les neurones POMC dans la détection hypothalamique du glucose par l'intermédiaire des endozépinines. Cette notion de détection indirecte du glucose pour les neurones POMC est originale.
- Ils mettent en évidence un nouveau « senseurs de glucose moléculaires », le canal TRPC3. Le rôle des canaux TRPC dans le contrôle de l'homéostasie énergétique est novateur.

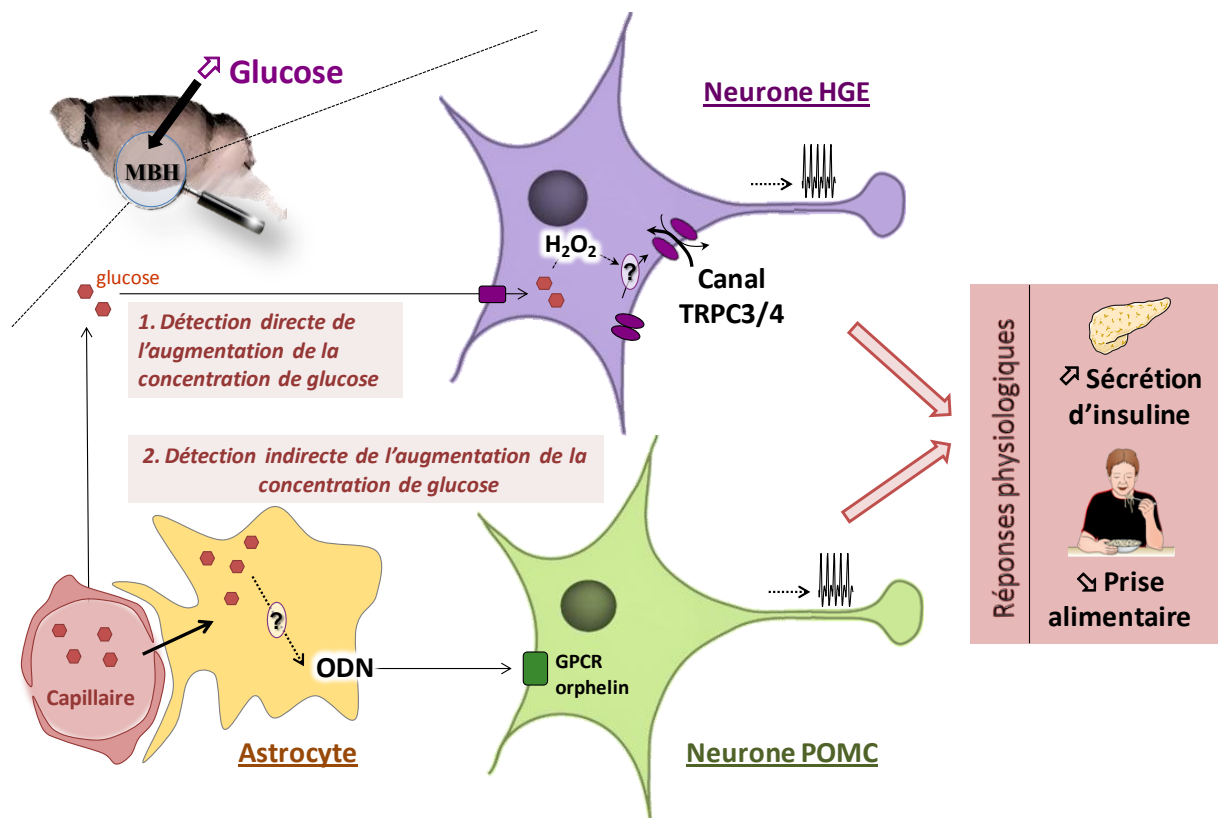


Figure 52 : Schéma de conclusion

Annexes

I. Matériel et méthodes

I.1. Animaux

Les expériences sont réalisées sur des rats mâles Wistar (Charles Rivers, France) et des souris mâles génétiquement invalidées pour le canal TRPC3 dans tout l'organisme (souris TRPC3^{totale}KO) ou des souris mâles TRPC^{lox/lox} offertes par le Pr L. Birbaumer (Hartmann et al., 2008). Les expériences *in vitro* sont effectuées chez des animaux âgés de 4 à 5 semaines et celles *in vitro* chez des animaux âgés de 8 à 12 semaines. Les animaux sont maintenus dans un environnement contrôlé (12 h/j à 22 °C), nourriture (Safe A04) et boisson fournies *ad libitum*. Les protocoles expérimentaux suivent les directives européennes (86/609/EEC) et ont été approuvés par le comité d'éthique de l'Université de Bourgogne (C2EA Grand Campus N° 105).

I.2. Etudes *in vitro* et *ex vivo*

I.2.1. *Obtention de tranches de cerveau*

Comme décrit précédemment (Fioramonti et al., 2004), après anesthésie (ip, pentobarbital sodique, 60 mg/kg, Ceva Santé Animale), les animaux sont perfusés en intracardiaque avec une solution saline froide (4°C, composition en mM : 200 sucrose, 28 NaHCO₃, 2,5 KCl, 0,5 CaCl₂, 8 MgCl₂, 1,25 NaH₂PO₄, 0,5 CaCl₂, 5 HEPES, 1 L-Ascorbate et 8 D-glucose ; pH 7,3 ; osmolarité ≈ 310 mOsmol/l) et oxygénée (95/5 % O₂/CO₂). Cette étape permet d'éliminer le sang du cerveau et de refroidir rapidement les régions cérébrales profondes pour préserver au mieux l'intégrité cellulaire. Après décapitation, le cerveau est rapidement prélevé et immergé dans cette même solution oxygénée. Des coupes frontales de 300 µm sont réalisées à l'aide d'un vibratome (Leica). 4 à 5 coupes frontales contenant le MBH sont obtenues et conservées à température ambiante dans une solution saline physiologique oxygénée (contenant en mM : 118 NaCl, 3 KCl, 1,2 NaH₂PO₄, 1 MgCl₂, 2,5 NaHCO₃, 1,5 CaCl₂, 5 HEPES et 5 D-glucose ; pH 7,3 ; osmolarité ≈ 310 mOsmol/l).

1.2.2. Culture primaire de neurones dissociés de MBH

Les neurones isolés de MBH sont préparés comme décrit précédemment (Dunn-Meynell et al., 2002; Kang et al., 2006). Rapidement, après avoir réalisé les tranches de cerveau, le MBH est isolé. Les cellules de MBH sont ensuite dissociées mécaniquement avec de la papaïne à l'aide du kit « neural tissue Dissociator Kit » (MACS Miltenyi Biotec) puis centrifugée 5 min à 200g. Après centrifugation, les cellules sont resuspendues dans 0,5 ml de milieu «conditionné» astrocytaire (ACM) contenant 2,5 mM de glucose (cf préparation de l'ACM ci-dessous), favorisant la survie des neurones. Les cellules sont ensuiteensemencées dans des cylindres posés sur des lamelles de verre préalablement recouvertes de poly-L-lysine (50 µg/ml ; Sigma) pour favoriser l'adhésion cellulaire. L'ensemencement dans les cylindres permet de concentrer suffisamment les cellules pour les expériences ultérieures d'imagerie calcique. Après 1 h d'incubation à 37°C, les cylindres sont enlevés et de l'ACM est ajouté. Les cellules sont finalement maintenues dans un incubateur à 37°C dans une atmosphère humide enrichie en CO₂ (95/5 % O₂/CO₂) pendant 18 h maximum pour éviter une perte de sensibilité au glucose.

1.2.3. Préparation du milieu conditionné astrocytaire (ACM)

La culture d'astrocytes est issue du MBH de 3 animaux mâles âgés de 4 à 5 semaines. Les animaux sont anesthésiés au pentobarbital. Après décapitation, les cerveaux sont rapidement prélevés et les MBH sont isolés et rincés dans du PBS froid. Les MBH sont coupés en morceau et triturés rapidement dans du milieu Neurobasal-A (contenant en mM : 5 D-glucose, 1 L-lactate, 2,3 L-pyruvate, 0,5 L-glutamine; 10 % FBS, 100 U/ml pénicilline/streptomycine et 50 µg/ml gentamycine ; Invitrogen). La suspension cellulaire estensemencée dans une flasque préalablement recouverte de poly-L-lysine (50 µg/ml ; Sigma). Une fois à confluence (environ 10 jours), les cellules sont agitées à 250 rpm pendant 18 h à 37 °C. Après agitation, les cellules en suspension (principalement les neurones, les oligodendrocytes et la microglie) sont éliminées alors que les cellules adhérentes (essentiellement des astrocytes) (Rogers *et al.* 1997) sont décollés à l'aide de trypsine (Trypsin/EDTA 0,05% ; Gibco) puis centrifugé à température ambiante pendant 5min à 200g. Le culot de cellules est remis en suspension et les astrocytes cultivés dans du milieu Neurobasal-A (5 mM de glucose) et conservés dans incubateur à 37°C dans une atmosphère

humide enrichie en CO₂ (95/5 % O₂/CO₂) jusqu'à leur utilisation pour préparer le milieu «conditionné».

La veille de la culture primaire de neurones dissociés de MBH, le milieu de culture des astrocytes est remplacé par du milieu Neurobasal-A contenant 2,5 mM de glucose. 24 h après incubation, le milieu «conditionné» appelé ACM est filtré, supplémenté avec 1 % de B-27 (Invitrogen) et utilisé pour préparer les neurones dissociés de MBH.

1.2.4. L'imagerie cellulaire sur les neurones dissociés de MBH

Pour étudier la réponse à l'augmentation de la concentration de glucose des neurones HGE, nous avons utilisé l'imagerie calcique sur les neurones dissociés de MBH comme décrit précédemment (Dunn-Meynell et al., 2002; Kang et al., 2006). Les neurones GS ont été discriminé en fonction des changements de la concentration intracellulaire de Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose de 2,5 à 10 mM.

1.2.4.1. Caractéristiques de la sonde Fura-2

Dans cette étude, les réponses calciques sont mesurées avec un indicateur ratiométrique de calcium intracellulaire excitable à la lumière UV, le Fura-2/AM (Fura-2/acétoxyméthyl ester). Sous forme estérifiée, le Fura-2/AM traverse la membrane plasmique puis est déestérifié sous forme Fura-2 dans le cytoplasme cellulaire sous l'action des estérases endogènes. Après clivage des groupements méthyl, le Fura-2, devenu hydrophobe, ne peut plus sortir de la cellule. Le Fura-2 est ensuite excité à 340 nm et à 380 nm et émet une fluorescence à 510 nm. L'intensité de fluorescence mesurée suite à l'excitation à 340 nm représente la proportion de la sonde Fura-2 liée au Ca²⁺. L'intensité de fluorescence mesurée suite à l'excitation à 380 nm reflète la proportion de la sonde Fura-2 non-liée au Ca²⁺. Ainsi, la mesure du ratio (340/380 nm) de l'intensité de fluorescence est directement proportionnelle à la [Ca²⁺]_i. Ce ratio permet de s'affranchir du «bleaching» de la sonde (perte de fluorescence au cours du temps), des variations de concentration intracellulaire en sonde entre les cellules et de la morphologie des cellules.

1.2.4.2. Protocole

Les neurones dissociés de MBH sont incubés pendant 20 min à 37 °C dans du milieu d'enregistrement à 2,5 mM de glucose (ME 2,5 : contenant en mM : 25 HEPES, 121 NaCl, 4,7 KCl, 1,2 MgSO₄, 1,2 KH₂PO₄, 5 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 2,5 D-glucose ; pH 7,4 ; osmolarité ajustée à 300–310 mOsmol/l avec du sucrose) en présence de 1,7 μM de Fura-2/AM

(Molecular probes) et de 0,02% d'acide pluronique (Molecular probes) favorisant la pénétration de la sonde Fura-2 dans les cellules. Après rinçage, les cellules sont transférées dans une chambre d'enregistrement thermostatée (37°C) sous un microscope inversé (Olympus IX70) et visualisées à l'objectif x20. Les paires images de fluorescence (excitation 340 et 380 nm) de la sonde Fura-2 sont acquises toutes les 10 secondes grâce à une caméra CCD intensifiée (Charged Coupled Device, Hamamatsu). Les valeurs d'intensité de fluorescence sont collectées à 510 nm et les valeurs de ratio 340/380 nm sont obtenues après soustraction du bruit de fond. Toutes les expériences débutent à 2,5 mM de glucose, en accord avec la concentration physiologique de glucose dans le cerveau, comme utilisé précédemment pour identifier les neurones GS (Song et al., 2001).

1.2.4.3. Double imagerie

La mesure simultanée de la $[Ca^{2+}]_i$ et de la production de EAOs est réalisée en collaboration avec les équipes des Dr Routh et Shirokova (Rutgers, New Jersey). Les neurones dissociés de MBH sont incubés simultanément avec la sonde calcique Asante Calcium Red (1 h, 5 μ m, 37°C ; Teflabs) et la sonde redox H₂DCFDA (30min, 5 μ m, 37°C ; Molecular probes). Après rinçage, les cellules sont transférées dans une chambre d'enregistrement thermostatée (37°C) dans un microscope confocal (Olympus, IX81) et visualisées à l'objectif x10. L'émission de fluorescence des sondes ACR (excitation : 540nm, émission : 650nm) et H₂DCFDA (excitation : 488nm, émission : 520nm) est acquise toutes les 30 secondes, avec 5 secondes d'intervalle entre l'excitation de chaque sonde, grâce à une caméra CCD intensifiée (Charged Coupled Device), après soustraction du bruit de fond, en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose de 2,5 à 10 mM.

1.2.4.4. Analyse des données

L'acquisition et l'analyse des images sont réalisées à l'aide du logiciel TILL Photonics. Les changements de la $[Ca^{2+}]_i$ sont quantifiés en calculant l'aire sous la courbe intégrée de chaque réponse calcique durant l'augmentation de la concentration de glucose grâce au logiciel MathLab. **Un neurone est qualifié de HGE si l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose de 2,5 à 10 mM a lieu entre 2 et 20 min après traitement, avec une amplitude supérieure à 0,1 Δ ratio 340/380, dure au moins 30 secondes et est transitoire.** En fin de chaque enregistrement, une solution de KCl à 50 mM est ajoutée dans la chambre d'enregistrement pendant 2 min pour s'assurer de la capacité d'excitabilité des neurones. 90 à 95 % des cellules répondent au KCl dans ce modèle de culture. Les neurones non répondants au KCl sont éliminés de l'étude. La quantification

des réponses au glucose est exprimée sous forme de moyenne \pm sem. L'analyse de chaque expérience est obtenue à partir d'au moins 3 cultures indépendantes préparées à partir d'au moins 6 animaux. Des tests de Student (*t*-test) appariés et non appariés ou des one-way ANOVA sont réalisés pour déterminer les différences.

1.2.5. Agents pharmacologiques

Le Glutathione reduced ethyl ester (GSH-EE, 0.1 mM), le trolox (0.2 mM), la catalase (4000U/ml), le SFK96365 (5 μ M), le Pyrrole3 (Pyr3; 1 μ M (*in vitro*), 3 μ M (*in vivo*)), le 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG, 10 μ M) sont fournis par Sigma Aldrich ; le ML204 (1 μ M) par Tocris ; l'ODN et le CDLOP par notre collaborateur, le Dr T.Alquier. Tous les agents pharmacologiques sont préparés dans du DMSO ou de l'éthanol puis dilués dans du milieu d'enregistrement pour une concentration final de DMSO n'excédant pas 0,002% (v/v). Pour tous les agents pharmacologiques, la plus faible concentration est déterminée pour éviter les effets non spécifiques.

1.2.6. RT-qPCR

Les ARN totaux ont été extraits des tissus par chromatographie avec le kit RNAeasy plus (Qiagen) qui comprend une étape d'élimination de l'ADN génomique. La quantité et la qualité des échantillons d'ARN ont été évaluées par microélectrophorèse sur puce Experion (Biorad). Cette analyse fournit pour chaque échantillon un indice de qualité (RQI) de 1 à 10. Seuls les échantillons ayant obtenu un indice supérieur ou égal à 7 sont inclus dans l'étude. La concentration des ARN est éventuellement standardisée par dilution et la transcription inverse (RT) est réalisée sur une quantité d'ARN fixée et identique pour tous les échantillons avec le kit Quantitect (Qiagen). Ce kit comprend également une étape préliminaire d'élimination enzymatique de toute trace d'ADN. La PCR quantitative est mise en œuvre à l'aide d'un thermocycleur StepOnePlus (Applied Biosystems) sur les cDNA obtenus avec un maximum de 10% de RT dans la réaction de PCR. La détection de l'amplification des gènes cibles se fait par hydrolyse de sondes Taqman (Applied Biosystems) spécifique pour des cDNAs et pré-validées (Taqman gene expression assays). Le mélange de PCR est le Taqman Universal Master Mix II avec UNG ou le Taqman Gene Expression master mix (Applied Biosystems). Des contrôles dépourvus de transcriptase inverse (noRT) et un contrôle dépourvu d'ADN (no

template) sont systématiquement inclus dans chaque étude/plaque. Les résultats sont analysés avec le logiciel StepOne (Applied Biosystems) et/ou Data Assist (Applied Biosystems).

I.3. Etudes in vivo

I.3.1. Stéréotaxie

La stéréotaxie est une technique utilisée en neurochirurgie pour atteindre des zones du cerveau de manière précise. La position des différentes structures cérébrales est définie à partir de l'atlas stéréotaxique (Paxinos G et Watson C, The brain stereotaxic coordinates-2nd Edition). Avant la chirurgie, les animaux reçoivent une injection sous-cutanée de buprénorphine (0,03 mg/kg Axience) et de la lidocaïne (50µl, Ceva Santé Animale) à la surface du crâne pour atténuer la douleur. Sous anesthésie gazeuse (isoflurane), après avoir fixé la tête de l'animal dans le cadre stéréotaxique (Kopf), la peau du crâne est incisée et l'os est nettoyé avec de l'eau oxygénée pour permettre la vue des sutures crâniennes.

I.3.1.1. Implantation de canules

Pour les expériences chez le rat, une canule bilatérale est implantée dans le MBH (AP: -3,4 mm vs. bregma; L: -0,5mm vs. suture sagitale; DV: -9,5mm vs. surface du crâne). Pour les souris TRPC3^{total} KO, une simple canule est implantée dans le ventricule latéral (AP: -0,5 mm vs. bregma; L: -1,0mm vs. suture sagitale; DV: -2,2mm vs. surface du crâne). Du ciment dentaire, ancré à la boîte crânienne à l'aide deux vis, maintient la canule en place. Après la chirurgie, les animaux sont réhydratés avec du sérum physiologique injecté en sous-cutané (souris : 100 µL ; rats : 500 µl). Les animaux sont ensuite placés dans leur cage sur un tapis chauffant et surveillés jusqu'à leur réveil. Tous les animaux ont récupéré leur poids pré-chirurgie après environ 7 jours. Après récupération, le test de sécrétion d'insuline en réponse à l'hyperglycémie centrale est réalisé chez le rat et le test de réalimentation en réponse au glucose icv est effectué chez la souris TRPC3^{total} KO.

I.3.1.2. Génération des souris TRPC3^{MBH} KO

Un adénovirus, AAV-Cre-GFP, est utilisé pour induire une recombinaison génétique dans le MBH des souris TRPC3^{lox/lox}. Le plasmide CBA.nls myc Cre.eGFP exprime la protéine de fusion myc-nls-Cre-GFP fournie par Richard Palmiter (Université de Washington, Seattle, USA). Les AAV ayant un sérotype 2/9 (AAV2/9) (~3-10×10¹¹ particules virales/ml) sont fournis par la plateforme de production de virus de UMR INSERM 1089 (Nantes,

France). Les souris TRPC3^{lox/lox} reçoivent 250 nl d'AAV Cre-GFP ($3 \cdot 10^{11}$ particules virales/ml) ou d'AAV- CMV (contrôle, $5 \cdot 10^{12}$ particules/ml) de part et d'autre du MBH par stéréotaxie (AP: -1.4 mm vs. bregma; L: -0.4 mm vs. suture sagittale; DV: -5.4mm vs. surface du crâne) pour invalider l'expression du canal TRPC3 spécifiquement dans le MBH. Ces souris sont appelées TRPC3^{MBH} KO.

1.3.2. Test tolérance au glucose (GTT) et à l'insuline (ITT)

Les souris sont préalablement placées en cages individuelles sans nourriture pendant environ 5h avant les tests de tolérance au glucose et à l'insuline. La tolérance au glucose ou à l'insuline est mesurée en suivant la glycémie par prélèvement de sang à la queue de l'animal à t=0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 min après injection intra-péritonéal de glucose (2g/kg) ou d'insuline (0,75U/ml). Les échantillons de plasma sont collectés à t=0, 15, 30 pour mesurer la sécrétion d'insuline induite par le test de tolérance au glucose par alphaLISA (AL204, Perkin Elmer).

1.3.3. Sécrétion d'insuline induite par l'hyperglycémie centrale

Le test de la détection centrale de l'augmentation de la concentration de glucose est toujours réalisé en début d'après-midi suite à une période de 5 heures sans croquettes, permettant ainsi une stabilisation des glycémies et une homogénéisation des groupes. Le test est pratiqué sur des animaux anesthésiés (rats, souris TRPC3^{total} KO, TRPC3^{MBH} KO) au pentobarbital (60 mg/kg). Une incision est pratiquée à la base du cou, les tissus conjonctifs et musculaires sont dégagés. La carotide est isolée, ligaturée à l'extrémité la plus proche du coeur. Le cathéter est inséré dans la carotide en direction du cerveau et ligaturé pour le maintenir en place. Après stabilisation de la glycémie, l'animal reçoit un bolus de glucose (rat : 9 mg/kg, 100 µl en 30 secondes / souris : 25mg/kg, 30µl en 30 secondes). Des échantillons de sang sont prélevés au niveau de la queue au temps t=0 min (juste avant l'injection du bolus de glucose), t=1, 3 et 5 min et la glycémie est mesurée. Ce protocole est connu pour induire une sécrétion rapide (1 min) et transitoire d'insuline dont la commande est nerveuse (vagale), sans modification de la glycémie périphérique, ce qui exclut toute stimulation directe du pancréas par ce métabolite. Les échantillons de sang sont centrifugés à 200 g/min, pendant 7min à 4°C afin d'en récolter les plasmas pour la mesure ultérieure de la concentration en insuline par alphaLISA (AL204, Perkin Elmer).

Pour l'étude pharmacologique chez le rat, 5 min après infusion intra-MBH de Pyr3 (3 μ M, 1 μ l en 10 min) pour inhiber l'activité du canal TRPC3 ou de liquide cébrospinal artificiel (aCSF, 1 μ l en 10 min, Tocris) dans le MBH, l'injection du bolus carotidien de glucose est réalisée. A la fin du test, les rats sont sacrifiés et une solution de bleu de bromophénol est infusée pour vérifier le bon emplacement de la canule.

Pour les souris TRPC3^{total} KO et TRPC3^{MBH} KO, le MBH est prélevé pour quantifier les taux d'expression des canaux TRPC par RT-qPCR et vérifier le site d'injection des AAV.

1.3.4. Tests de réalimentation en réponse au glucose

Les souris sont placées en cycle inversé pour mesurer la prise alimentaire durant leur phase d'activité. Après 18h de jeûne, du glucose ou du sucrose (125 μ g dans 2 μ l en 5 min, osmolarité similaire) est infusé dans le ventricule latéral des souris éveillées. 30 min après injection, les croquettes sont réintroduites dans la cage et la prise alimentaire est mesurée pendant 6h, toutes les 2 heures. A la fin du test, les animaux sont sacrifiés et une solution de bleu de bromophénol est injectée afin de vérifier le bon emplacement de la canule. La prise alimentaire a aussi été testée après injection de glucose (2g/kg) ou de NaCl en intrapéritonéal.

1.3.5. Analyses biochimiques

La glycémie est mesurée à partir d'une gouttelette de sang déposée sur une bandelette d'un lecteur glycémique Performa AccuChek (Roche). L'insulinémie est mesurée en utilisant un kit alphaLISA ultra-sensible (AL204, Perkin Elmer).

1.3.6. Analyses statistiques

L'analyse statistique est réalisée avec le logiciel Prism 5.0 (GraphPad). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm sem. Des tests de Student (ou des *t*-tests) appariés ou non-appariés ont été réalisés pour les comparaisons de deux groupes de données. Pour les comparaisons multiples, une analyse de variance (ANOVA) à 1 ou 2 paramètres (suivie d'un post-test de Bonferroni) a été réalisée pour détecter les différences. Les tests utilisés sont mentionnés dans les légendes des figures. Les différences significatives sont notées * #, ** ##, *** ### sur les figures lorsque les valeurs de « p » étaient respectivement < 0,05 ; 0,01 et 0,001.

II. Publications et communications

Publications :

1- FERGUSSON G, ETHIER M, GUEVREMONT M, **CHRÉTIEN C**, ATTANÉ-JOLY; E, FIORAMONTI X, PRENTKI M, POITOUT V, ALQUIER T. *Defective insulin secretory response to intravenous glucose in C57Bl/6J compared to C57Bl/6N mice*. **Mol. Metab.** 2014 Sep **28;3(9)**.

2- ALLARD C, CARNEIRO L, GRALL S, CLINE BH, FIORAMONTI X, **CHRÉTIEN C**, BABA-AISSA F, GIAUME C, PÉNICAUD L, LELOUP C. *Hypothalamic astroglial connexins are required for brain glucose sensing-induced insulin secretion*. **J Cereb Blood Flow Metab.** 2014 Feb;**34(2)**:339-46.

3- ALLARD C, CARNEIRO L, COLLINS SC, **CHRÉTIEN C**, GRALL S, PÉNICAUD L, LELOUP C. *Alteration of hypothalamic glucose and lactate sensing in 48h hyperglycemic rats*. **Neurosci Lett.** 2013 Feb **534(8)**:75-9.

En préparation :

1- BOUYAKDAN K, **CHRÉTIEN C**, RODAROS D, LIÉNARD F, PÉNICAUD L, FIORAMONTI X, ALQUIER T. *The gliotransmitter octadecaneuropeptide ODN targets hypothalamic pro-opiomelanocortin neurons to control energy homeostasis through α -GABAA independent pathway*. En soumission (cf p. 154)

2- **CHRÉTIEN C**, FENECH C, LIÉNARD F, GRALL S, PÉNICAUD L, LELOUP C & FIORAMONTI X. *Hypothalamic Transient Receptor Potential Canonical type 3 (TRPC3) channels are critical for hypothalamic glucose detection and energy homeostasis*.

Présentations orales :

1- **CHRÉTIEN C**, FENECH C, GRALL S, PÉNICAUD L, LELOUP C & FIORAMONTI X. *Glucose excites hypothalamic neurons through the activation of Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) channels*. **Annual Meeting of the Society for Neuroscience (SFN)**, 2014, USA.

2- **CHRÉTIEN C**. *Rôle des canaux Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) dans la sensibilité au glucose des neurones hypothalamiques*. **Forum des Jeunes Chercheurs (FJC)**, 2014, France. [Obtention du 1^{er} prix de la communication orale.](#)

3- **CHRÉTIEN C**. *Un TRiP au pays du Candy*. **Journée des doctorants**, 2014, France

Posters :

1- **CHRÉTIEN C**, FENECH C, GRALL S, PÉNICAUD L, LELOUP C & FIORAMONTI X. *Hypothalamic Transient Receptor Potential Canonical type 3 (TRPC3) channels are critical for hypothalamic glucose detection and energy homeostasis*. **Société française de Neuroendocrinologie (SNE)**, 2015, France.

- 2- **CHRÉTIEN C, FENECH C, GRALL S, PÉNICAUD L, LELOUP C & FIORAMONTI X.** *Glucose excites hypothalamic neurons through the activation of Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) channels.* **Société Francophone du Diabète (SFD)**, 2015, France.
- 3- **CHRÉTIEN C, FENECH C, GRALL S, PÉNICAUD L, LELOUP C & FIORAMONTI X.** *Glucose excites hypothalamic neurons through the activation of Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) channels.* **Canadian Neurosciences Meeting**, 2014, Canada.
- 4- **CHRÉTIEN C, FENECH C, GRALL S, PÉNICAUD L, LELOUP C & FIORAMONTI X.** *Glucose excites hypothalamic neurons through the activation of Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) channels.* **Société Francophone du Diabète (SFD)**, 2014, France.
- 5- **CHRÉTIEN C, FENECH C, GRALL S, PÉNICAUD L, LELOUP C & FIORAMONTI X.** *Rôle des Espèces Actives de l'Oxygène (EAOs) et des caaux Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) dans la sensibilité au glucose des neurones hypothalamiques.* **Association Française d'Etudes et de Recherches sur l'Obésité (AFERO)**, 2014, France. Obtention du 1^{er} prix du poster.
- 6- **CHRÉTIEN C, FENECH C, GRALL S, PÉNICAUD L, LELOUP C & FIORAMONTI X.** *Role of reactive oxygen species and TRPC channels in hypothalamic neuron glucose sensitivity.* **Forum des Jeunes Chercheurs (FJC)**, 2013, France.
- 7- **CHRÉTIEN C, FENECH C, GRALL S, PÉNICAUD L, LELOUP C & FIORAMONTI X.** *Role of reactive oxygen species and TRPC channels in hypothalamic neuron glucose sensitivity.* **Société Française des Neurosciences**, 2013, France.
- 8- **CHRÉTIEN C, FENECH C, GRALL S, PÉNICAUD L, LELOUP C & FIORAMONTI X.** *Role of reactive oxygen species in glucose sensitivity of hypothalamic neurons.* **Vitagora**, 2013, France.

III. Article

L'objectif 1 de cette thèse a fait l'objet d'un papier soumis dans le journal « American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology » en octobre 2015.

The gliotransmitter octadecaneuropeptide ODN targets hypothalamic proopiomelanocortin neurons to control energy homeostasis

Running title: ODN activates POMC neurons to control energy homeostasis

Khalil Bouyakdan^{1,*}, Chloé Chrétien^{2,*}, Demetra Rodaros¹, Fabienne Liénard², Sylvain Wagner³, Eric Biron³, Luc Pénicaud², Xavier Fioramonti^{2,†}, Thierry Alquier^{1,†,§}.

¹ Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montreal Diabetes Research Center, and Departments of Medicine and Biochemistry, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada H3T 1J4.

² Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation; UMR 6265 CNRS, 1324 INRA, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France.

³ Faculty of Pharmacy, Université Laval and Laboratory of Medicinal Chemistry, Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CRCHUQ), Québec, QC, Canada G1V 4G2.

*These authors contributed equally to this work

†These authors co-directed the study

§To whom correspondence should be addressed: Thierry Alquier, CRCHUM-Tour Viger, 900 rue Saint-Denis, Montreal, QC, Canada, H2X0A9. Tel.: (1)514-890-8000#23628; Fax: (1)514-412-7655; E-mail: thierry.alquier@umontreal.ca

ABSTRACT

The melanocortin pathway is well known to play a key role in the hypothalamic control of energy balance. Recent evidences demonstrate that the octadecaneuropeptide (ODN), an endozepine secreted by astrocytes, modulates feeding behaviour and glucose homeostasis. It was suggested that the anorectic effect of ODN involves the activation of the melanocortin pathway. The aim of the present study was to determine whether ODN specifically activates proopiomelanocortin (POMC) neurons of the arcuate nucleus (ARC) and modulate energy homeostasis in a melanocortin-4 receptor (MC4R)-dependent manner. Our results demonstrate that decreased feeding as well as increased respiratory exchange ratio and locomotor activity induced by central administration of ODN are blunted in MC4R-deficient mice. Using electrophysiological recordings in brain slices from POMC-eGFP mice, we show that ODN increases the firing of GFP-positive neurons but not neighbouring non-GFP cells suggesting that ODN selectively activates POMC neurons in the ARC. Importantly, ODN decreases the frequency of inhibitory GABA inputs in both POMC and non-POMC neurons to suggest a GABA_A-independent activation. Finally, calcium imaging recordings in dissociated primary hypothalamic neurons show that the antagonist of the ODN G-protein coupled receptor (GPCR) inhibits ODN-induced calcium oscillations. In summary, our study demonstrates that the gliotransmitter ODN specifically activates POMC neurons of the ARC in a GABA_A-independent and ODN GPCR-dependent manner to decrease feeding and regulate metabolic responses via the MC4R. These findings highlight the importance of endozepines in the regulation of the melanocortin pathway and open new research avenues related to the hypothalamic control of energy balance by endozepines.

Key-words:

Food intake, hypothalamus, arcuate nucleus, endozepines, electrophysiology

INTRODUCTION

The past two decades have witnessed major advances in our understanding of the control of energy balance by hypothalamic neuronal populations. This control relies on neurons that are capable of integrating metabolic signals including hormones (e.g. leptin, insulin and ghrelin) and nutrients (i.e. glucose, fatty and amino acids) (21). Anatomically, neurons responding to these signals are clustered in areas of the hypothalamus including the arcuate nucleus (ARC), ventromedial hypothalamus (VMH), paraventricular nucleus (PVN) and the lateral hypothalamus. In the ARC, metabolic signals are known to modulate the activity of two functionally opposing neuronal populations that project to other nuclei: orexigenic neuropeptide Y (NPY) neurons and anorexigenic proopiomelanocortin (POMC) neurons (21). POMC neurons release α -Melanocyte-Stimulating Hormone that activates the melanocortin-4 receptor (MC4R) expressed in PVN neurons. POMC neurons are generally viewed as “catabolic” given that their activation decreases food intake and promotes expenditure. The importance of the melanocortin pathway in the etiology of obesity and type 2 diabetes is underscored by several lines of evidence showing that impairments in POMC signalling lead to obesity, glucose intolerance and chronic hyperglycemia in rodents (4, 22) and that mutations in the genes coding for POMC and MC4R are the most frequent form of monogenic human obesity (7, 24, 27). In addition to this well-established metabolic neurocircuit, non-neuronal cells of the hypothalamus have recently emerged as new players in the regulation of energy balance (2). Astrocytes, the most abundant glial cells in the brain, provide anatomical and metabolic support for neurons. Importantly, astrocytes of the hypothalamus play an important role in metabolic sensing, energy balance regulation and obesity (2). However the mechanisms and pathways by which astrocytes regulate the activity of metabolic neurocircuits in the hypothalamus remain elusive.

Acyl-CoA Binding Protein (ACBP) was initially identified in the brain as a secreted peptide that displaces benzodiazepines from their binding sites on the GABA_A ionotropic receptor (15). For this reason, ACBP is also named Diazepam Binding Inhibitor (DBI) and is referred to as an endozepine. ACBP is expressed throughout the brain and, we (5) and others (18) showed it is mainly expressed in astrocytes and tanycytes in the hypothalamus. Since its discovery, studies have shown that ACBP is secreted by cultured astrocytes in response to different stimuli (18, 20, 23). Once secreted, ACBP is cleaved leading to the generation of two endozepine peptides, triakontatetrapeptide (TTN) and octadecaneuropeptide (ODN) (11).

Of importance, studies have shown that intracerebroventricular (ICV) administration of ODN decreases food intake (8, 10) and increases glucose tolerance in rodents (18). These studies also suggested that the anorectic effect of ODN is not contingent on the GABA_A receptor and involves an unidentified G-protein coupled receptor (GPCR) (8, 10, 18). In addition, the appetite-suppressing effect of ODN is blunted by antagonism of MC3R and MC4R (18) suggesting that the melanocortin pathway is involved. Despite these evidences, whether ODN activates POMC neurons and the neuronal signalling mechanisms involved (GABA_A and/or ODN GPCR) are still unknown. Thus, the goal of the present study was to 1) determine whether ODN regulates feeding and metabolic responses in a MC4R-dependent manner, 2) establish whether ODN specifically targets and activates POMC neurons of the ARC, and 3) determine the contribution of GABA_A and ODN GPCR signalling in the modulation of POMC neurons activity. To this end, we have employed complementary approaches and models consisting of MC4R knockout (KO) mice, electrophysiological recordings in POMC-GFP reporter mice and Ca²⁺ imaging in primary hypothalamic neurons.

MATERIAL AND METHODS

Animals: Male MC4R KO and control wild type (WT, same genetic background) mice (B6;129S4-Mc4r^{tm1Low}/J, stock number 006414,) and POMC-eGFP mice (C57BL/6J-Tg(Pomc-EGFP)1Low/J, stock number 009593) were purchased from the Jackson Laboratory. Animals were housed on a 12 h light/dark cycle at 21°C with free access to water and standard chow diet for at least ten days before starting the experimentation. All procedures using animals were approved by the institutional animal care and use committee (Comité Institutionnel de Protection de Animaux, protocol #An12012TArS) of Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) and the French Ministry of Research and local ethic committees of the University of Burgundy (C2EA Grand Campus de Dijon N°105).

Stereotaxic surgery: Mice (10-12 week old) were anaesthetised with isoflurane and placed on a stereotaxic apparatus (Kopf instrument). Animals were implanted with a guide cannula (Plastics One) into the right lateral ventricle according to stereotaxic coordinates (from bregma: -0.5 mm antero-posterior, +1 mm lateral and -2.1 mm dorso-ventral from the dura). Cannulated mice were allowed to recover for a week before intracerebroventricular (ICV) administration of angiotensin II (40 ng in 2 µl) to verify cannula placement. Mice that did not drink within the first 5 min with repeated bouts were excluded from the study.

Food intake studies: Animals were food deprived for 18h. Freshly reconstituted ODN (100 ng in 2 µl; Phoenix pharmaceuticals) or saline control was administered 1h before the onset of the dark cycle. Access to food was restored 30 min after the ICV injection and food intake was measured for 24 h.

Indirect calorimetry: Respiratory exchange ratio (RER), energy expenditure and locomotor activity were measured using indirect calorimetry in Comprehensive Lab Animal Monitoring System (CLAMS) metabolic cages (Columbus Instruments). Cannulated mice were single housed in metabolic cages during 24h for habituation and were injected ICV with saline or ODN (100 ng in 2µl) 1 h before the onset of the dark cycle and monitored for 24 h.

Electrophysiological recordings: Brain slices (250 µm) were prepared from 6-8 weeks old POMC-eGFP mice as previously described (13). After recovery, slices were perfused with an

oxygenated extracellular medium containing (in mM): 118 NaCl, 3 KCl, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄, 1.5 CaCl₂, 5 Hepes, 2.5 D-glucose (osmolarity adjusted to 310 mOsm with sucrose, pH 7.3) in a recording chamber placed under a microscope (Nikon EF600) outfitted for fluorescence and IR-DIC videomicroscopy. Viable ARC POMC neurons were visualized with a fluorescence video camera (Nikon). For cell-attached recordings, borosilicate pipettes (4-6 MΩ; 1.5 mm OD, Sutter Instrument) were filled with filtered extracellular medium. For whole-cell spontaneous inhibitory post-synaptic currents (sIPSC) recordings, pipettes were filled with a cesium-chloride solution containing (in mM): 140 CsCl, 3.6 NaCl, 1MgCl₂, 10 HEPES, 0.1 Na₄EGTA, 4 Mg-ATP, 0.25 Na-GTP (290 mOsm, pH 7.3).

Calcium imaging: Mediobasal hypothalamic neurons were prepared from 3-4 weeks-old Wistar rats as described previously (25). Cells were loaded with Fura-2/acetoxymethyl ester (0.5 μM; Fura-2/AM; Molecular Probes) for 20 min at 37°C in Hanks buffer balanced salt solution (containing (in mM): 25 HEPES, 121 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgSO₄, 1.2 KH₂PO₄, 5 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 2.5 D-glucose; pH 7.4)). Fura-2 fluorescence images were acquired every 10 sec by alternating excitation at 340 and 380 nm and emissions (420–600 nm) with a CDD camera coupled to Live Acquisition software (TiLL Photonics). Changes in intracellular calcium levels ([Ca⁺⁺]_i) were monitored in cells held at 2.5 mM glucose in response to ODN (1 nM) with or without the ODN GPCR antagonist cyclo₁₋₈[dLeu⁵]OP (cdLOP) (10 nM) prepared by standard Fmoc solid-phase peptide synthesis based on a previous study (19).

Expression of data and statistics: Data are expressed as means ± SEM. Intergroup comparisons were performed by ANOVA with Bonferroni post hoc tests or Student's *t*-test as described in figure legends. *p* < 0.05 was considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Central action of ODN on energy homeostasis is MC4R-dependent. Consistent with previous findings (10), our results show that ICV injection of ODN decreases food consumption in WT mice (Fig 1A). To confirm that ODN anorectic action is dependent on the melanocortin pathway (18), similar experiments were performed in MC4R KO mice. The anorectic effect of ODN was totally blunted in mice lacking the MC4R (Fig 1A). Activation of the melanocortin system has been associated with increased respiratory exchange ratio (RER), locomotor activity as well as energy expenditure (3, 4). Interestingly, central administration of ODN increases RER and locomotor activity in WT but not MC4R KO mice (Fig 1B). Energy expenditure was not affected by ODN in MC4R WT or KO mice (Fig 1B). Previous work showed that pharmacological antagonism of MC3R and MC4R blunted the anorectic effect of the ODN GPCR agonist in rats (18). Together, our findings demonstrate that ODN anorectic action as well as its effect on RER and locomotor activity are dependent on MC4R but not MC3R. The lack of ODN effect on energy expenditure is somehow surprising given that activation of the melanocortin pathway is usually associated with increased energy expenditure. It is possible that higher dose or repeated injections may be necessary to observe changes in energy expenditure.

ODN specifically activates POMC neurons. Our *in vivo* findings demonstrate that the MC4R is mediating the central actions of ODN suggesting that ODN activates POMC neurons in the ARC. To address this question, we monitored the effect of ODN on POMC neurons in the ARC using electrophysiology in brain slices from POMC-eGFP reporter mice (Fig 2A). Cell-attached recordings show that ODN increases action potential frequency in all POMC neurons tested (Fig 2B & C). Importantly, recordings of non-fluorescent neurons in the ARC in brain slices from POMC-eGFP mice show that ODN failed to modulate the electrical activity of non-POMC neurons (Fig 2C). These results suggest that ODN specifically activates POMC neurons in the ARC.

ODN activates POMC neurons through a GABA_A independent mechanism. ODN has been shown to act as a negative allosteric modulator (NAM) of the GABA_A receptor (1). Importantly, POMC neurons of the ARC receive GABAergic inhibitory inputs from neighboring neurons (26) suggesting that ODN-induced POMC neuron activation could be mediated via inhibition of GABAergic input. Thus, we quantified the frequency and amplitude of spontaneous Inhibitory Postsynaptic Currents (sIPSC) onto POMC and non-

POMC neurons in brain slices from POMC-eGFP mice. sIPSC amplitude is not affected by ODN in both POMC and non-POMC neurons (data not shown). However, ODN decreases sIPSC frequency onto POMC neurons (Fig 3). Interestingly, ODN also decreases sIPSC frequency onto non-POMC neurons suggesting that the peptide acts as a NAM of the GABA_A receptor in all ARC neurons. Although we cannot exclude that the decreased sIPSC frequency may favor ODN-induced POMC neurons activation, our results suggest that ODN-induced POMC neurons activation is GABA_A independent (Fig 3) and thus involves an additional pathway.

To confirm the idea that POMC neurons activation by ODN is GABA_A independent, we performed Ca²⁺ imaging on freshly dissociated neurons of the mediobasal hypothalamus (MBH, including the ARC and VMH) in response to ODN. Neurons in culture are isolated from each other (no dendrites and axons) ruling out potential GABAergic inputs (Fig 4A). Calcium imaging was used as a surrogate of neuronal activation in isolated MBH neurons. Our recordings show that ODN increases [Ca²⁺]_i oscillations in ~10% of MBH neurons tested (Fig 4B & C). Previous studies have demonstrated that ODN activates an unidentified GPCR coupled to Phospholipase C and Ca²⁺ (14, 19). Importantly, we found that the antagonist of ODN GPCR (cdLOP) decreases the number of ODN-responsive neurons as well as the magnitude of Ca²⁺ response to ODN in MBH neurons (Fig 4B & C). Together, our electrophysiology and Ca²⁺ imaging results demonstrate that ODN specifically activates POMC neurons of the ARC and suggest that ODN-induced POMC neurons activation is dependent on the ODN GPCR.

Our findings highlight several important aspects of endozepine signaling and action in the hypothalamus.

First, it was shown that, depending on the brain regions, ODN acts as a NAM (1) or a positive allosteric modulator (6) of the GABA_A receptor. Our results showing that ODN decreases sIPSC frequency in ARC neurons suggest that ODN behaves as a NAM of the GABA_A in ARC neurons, even though we cannot exclude a possible effect of ODN directly on GABA synaptic terminals. Although we cannot extend our findings to other hypothalamic nuclei, it is important to note that approximately 50% of synapses in the hypothalamus are GABAergic (9). Thus ODN may be an important regulator of GABAergic signaling in the hypothalamus and therefore affect the activity of circuits involved in neuroendocrine responses.

Second, our findings indicate that the effect of ODN on neuronal activity cannot be explained solely by its NAM activity on the GABA_A and implicate the ODN GPCR.

Importantly, the effect of ODN was specific to ~10% of hypothalamic neurons in culture (Ca²⁺ imaging) and to POMC neurons (electrophysiology studies). Although the identity of neurons studied in Ca²⁺ studies was unknown, the percentage of ODN-responsive neurons is compatible with the proportion of POMC neurons in the MBH. Together, this strongly suggests that ODN GPCR is specifically expressed in POMC neurons in the ARC. However, we cannot exclude the possibility that ODN modulates the activity of neurons in other hypothalamic nuclei.

Although our results support the concept that POMC neurons activation by ODN is GPCR-dependent, the downstream signaling pathways are still unknown. Studies showed that ODN GPCR activation stimulates PLC, [Ca²⁺]_i and a PKC-dependent activation of the ERK pathway (14, 17, 19). In our study, Ca²⁺ imaging was used as a surrogate of neuronal activation. Thus, we cannot conclude that ODN GPCR is coupled to downstream Ca²⁺ signaling in MBH neurons. Additional studies are required to decipher which pathway(s) triggers POMC neurons activation in response to ODN.

Third, our study supports the idea that ODN might be involved in hypothalamic glucose sensing. The recent study by Lanfray et al (18) demonstrated that ODN secretion is increased by glucose in hypothalamic explants. In addition, they show that the anorectic action of glucose was blunted by the ODN GPCR antagonist. Together, this suggests that ODN is a glucose-induced gliotransmitter targeting hypothalamic neurons to decrease feeding. Our results add an important piece to the endozepine signaling puzzle by showing that ODN specifically activates anorectic POMC neurons in the ARC to decrease feeding and regulate metabolic responses via the MC4R. Previous studies suggested that POMC neurons are activated by glucose (16, 22). However, it is still unclear whether glucose directly activates POMC neurons (12). Our findings combined with the study of Lanfray et al (18) support the model by which glucose-induced POMC neurons activation could be dependent on ODN secretion in astrocytes.

More generally, our results support the emerging concept that hypothalamic astrocytes and astrocyte-derived signals play a key role in the regulation of metabolic neurocircuits activity and energy balance. Future astrocyte-specific loss-of-function studies will be important to assess the role of endogenously expressed endozepine.

In summary, our study demonstrates that the gliotransmitter ODN specifically activates POMC neurons of the hypothalamus in a manner dependent on the ODN GPCR to decrease feeding and regulate metabolic responses via the MC4R. These findings open new

research avenues related to the hypothalamic control of energy balance by endozepines and their contribution to the etiology of metabolic diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are thankful to A. Lefranc, L. Decocq and A. Mathou for animal care.

GRANTS

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP115042 to TA), Marie Curie Foundation (CIG NeuROSenS PCIG09-GA-2011-293738 to XF), Société Francophone du Diabète and Réseau de recherche en santé cardiométabolique, diabète & obésité (CMDO, to TA and XF). TA and EB were supported by a salary award from Fonds de Recherche Québec-Santé (FRQS). KB was supported by a doctoral fellowship from Diabète Québec.

DISCLOSURES

Authors have no conflict of interest to declare.

REFERENCES

1. **Alfonso J, Le Magueresse C, Zuccotti A, Khodosevich K, and Monyer H.** Diazepam binding inhibitor promotes progenitor proliferation in the postnatal SVZ by reducing GABA signaling. *Cell stem cell* 10: 76-87, 2012.
2. **Argente-Arizon P, Freire-Regatillo A, Argente J, and Chowen JA.** Role of non-neuronal cells in body weight and appetite control. *Frontiers in endocrinology* 6: 42, 2015.
3. **Balthasar N, Dalgaard LT, Lee CE, Yu J, Funahashi H, Williams T, Ferreira M, Tang V, McGovern RA, Kenny CD, Christiansen LM, Edelstein E, Choi B, Boss O, Aschkenasi C, Zhang CY, Mountjoy K, Kishi T, Elmquist JK, and Lowell BB.** Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell* 123: 493-505, 2005.
4. **Berglund ED, Vianna CR, Donato J, Jr., Kim MH, Chuang JC, Lee CE, Lauzon DA, Lin P, Brule LJ, Scott MM, Coppari R, and Elmquist JK.** Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. *The Journal of clinical investigation* 122: 1000-1009, 2012.
5. **Bouyakdan K, Taib B, Budry L, Zhao S, Rodaros D, Neess D, Mandrup S, Faergeman NJ, and Alquier T.** A novel role for central ACBP/DBI as a regulator of long-chain fatty acid metabolism in astrocytes. *Journal of neurochemistry* 133: 253-265, 2015.
6. **Christian CA, Herbert AG, Holt RL, Peng K, Sherwood KD, Pangratz-Fuehrer S, Rudolph U, and Huguenard JR.** Endogenous positive allosteric modulation of GABA(A) receptors by diazepam binding inhibitor. *Neuron* 78: 1063-1074, 2013.
7. **Coll AP, Farooqi IS, Challis BG, Yeo GS, and O'Rahilly S.** Proopiomelanocortin and energy balance: insights from human and murine genetics. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89: 2557-2562, 2004.
8. **de Mateos-Verchere JG, Leprince J, Tonon MC, Vaudry H, and Costentin J.** The octadecaneuropeptide [diazepam-binding inhibitor (33-50)] exerts potent anorexigenic effects in rodents. *Eur J Pharmacol* 414: 225-231, 2001.
9. **Decavel C, and Van den Pol AN.** GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. *The Journal of comparative neurology* 302: 1019-1037, 1990.
10. **do Rego JC, Orta MH, Leprince J, Tonon MC, Vaudry H, and Costentin J.** Pharmacological characterization of the receptor mediating the anorexigenic action of the octadecaneuropeptide: evidence for an endozepinergic tone regulating food intake. *Neuropsychopharmacology* 32: 1641-1648, 2007.
11. **Farzampour Z, Reimer RJ, and Huguenard J.** Endozepines. *Advances in pharmacology* 72: 147-164, 2015.
12. **Fioramonti X, Contie S, Song Z, Routh VH, Lorsignol A, and Penicaud L.** Characterization of glucosensing neuron subpopulations in the arcuate nucleus: integration in neuropeptide Y and pro-opio melanocortin networks? *Diabetes* 56: 1219-1227, 2007.
13. **Fioramonti X, Lorsignol A, Taupignon A, and Penicaud L.** A new ATP-sensitive K⁺ channel-independent mechanism is involved in glucose-excited neurons of mouse arcuate nucleus. *Diabetes* 53: 2767-2775, 2004.
14. **Gandolfo P, Patte C, Leprince J, Thoumas JL, Vaudry H, and Tonon MC.** The stimulatory effect of the octadecaneuropeptide (ODN) on cytosolic Ca²⁺ in rat astrocytes is not mediated through classical benzodiazepine receptors. *Eur J Pharmacol* 322: 275-281, 1997.

15. **Guidotti A, Forchetti CM, Corda MG, Konkel D, Bennett CD, and Costa E.** Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 3531-3535, 1983.
16. **Hu J, Jiang L, Low MJ, and Rui L.** Glucose rapidly induces different forms of excitatory synaptic plasticity in hypothalamic POMC neurons. *PLoS one* 9: e105080, 2014.
17. **Kaddour H, Hamdi Y, Vaudry D, Basille M, Desrues L, Leprince J, Castel H, Vaudry H, Tonon MC, Amri M, and Masmoudi-Kouki O.** The octadecaneuropeptide ODN prevents 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of cerebellar granule neurons through a PKC-MAPK-dependent pathway. *Journal of neurochemistry* 125: 620-633, 2013.
18. **Lanfray D, Arthaud S, Ouellet J, Compere V, Do Rego JL, Leprince J, Lefranc B, Castel H, Bouchard C, Monge-Roffarello B, Richard D, Pelletier G, Vaudry H, Tonon MC, and Morin F.** Gliotransmission and brain glucose sensing: critical role of endozepines. *Diabetes* 62: 801-810, 2013.
19. **Leprince J, Oulyadi H, Vaudry D, Masmoudi O, Gandolfo P, Patte C, Costentin J, Fauchere JL, Davoust D, Vaudry H, and Tonon MC.** Synthesis, conformational analysis and biological activity of cyclic analogs of the octadecaneuropeptide ODN. Design of a potent endozepine antagonist. *European journal of biochemistry / FEBS* 268: 6045-6057, 2001.
20. **Loomis WF, Behrens MM, Williams ME, and Anjard C.** Pregnenolone sulfate and cortisol induce secretion of acyl-CoA-binding protein and its conversion into endozepines from astrocytes. *J Biol Chem* 285: 21359-21365, 2010.
21. **Myers MG, Jr., and Olson DP.** Central nervous system control of metabolism. *Nature* 491: 357-363, 2012.
22. **Parton LE, Ye CP, Coppari R, Enriori PJ, Choi B, Zhang CY, Xu C, Vianna CR, Balthasar N, Lee CE, Elmquist JK, Cowley MA, and Lowell BB.** Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 449: 228-232, 2007.
23. **Tokay T, Hachem R, Masmoudi-Kouki O, Gandolfo P, Desrues L, Leprince J, Castel H, Diallo M, Amri M, Vaudry H, and Tonon MC.** Beta-amyloid peptide stimulates endozepine release in cultured rat astrocytes through activation of N-formyl peptide receptors. *Glia* 56: 1380-1389, 2008.
24. **Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, and Froguel P.** A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet* 20: 113-114, 1998.
25. **Vazirani RP, Fioramonti X, and Routh VH.** Membrane potential dye imaging of ventromedial hypothalamus neurons from adult mice to study glucose sensing. *J Vis Exp* 2013.
26. **Vong L, Ye C, Yang Z, Choi B, Chua S, Jr., and Lowell BB.** Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons. *Neuron* 71: 142-154, 2011.
27. **Yeo GS, Farooqi IS, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG, and O'Rahilly S.** A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet* 20: 111-112, 1998.

FIGURES LEGENDS

Figure 1: Central regulation of energy homeostasis by ODN is MC4R-dependent. **A-** Cumulative food intake in fasted MC4R WT or KO mice injected ICV with saline or ODN (100 ng). **B-** Respiratory exchange ratio (RER, *top panel*), energy expenditure (*middle panel*) and locomotor activity (*bottom panel*) in MC4R WT or KO injected ICV with saline or ODN (100 ng). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Two-way ANOVA, $n = 7-8$ /group.

Figure 2: ODN activates POMC neurons in the ARC. **A-** POMC-GFP neuron (thick white arrow) visualized with x60 objective under infrared (left panel) and (right panel) fluorescent light during a patch-clamp recording (the white thin arrow shows the recording pipette). **B-** Representative cell-attached recording of a POMC-GFP neuron activated by ODN (1 nM, thick black bar above the trace). **C-** Quantification of action potential (AP) frequency in POMC ($n = 9$) and non-POMC ($n = 15$) neurons before (control; over the last 60 sec before ODN application), during (ODN, over the last 60 sec of ODN application) and after (reversal, over 60 sec, 10 min after ODN application) ODN application, ** $p < 0.01$ vs. control. One-Way ANOVA in repeated measures followed by Bonferroni post hoc test.

Figure 3: ODN decreases sIPSC frequency in ARC neurons. **A-** Representative voltage-clamp whole-cell recording of a POMC (*top panel*) or non-POMC (*bottom panel*) neuron before (control, over the last 4 min before ODN application) or during ODN application (over the last 4 min of 10 min ODN application). **B-** Quantification of sIPSC frequency of POMC (*top panel*, $n = 6$) and non-POMC (*bottom panel*, $n = 5$) neurons before (control; over the last 4 min before ODN application), during ODN application (ODN, over the last 4 min of 10 min ODN application). * $p < 0.05$ vs. control. Paired Student *t*-test.

Figure 4: The ODN GPCR antagonist inhibits ODN-induced Ca^{2+} responses in MBH neurons. **A-** Representative bright-field image of cultured dissociated MBH cells (x20 objective, scale bar = 40 μ m). **B-** Representative calcium imaging traces of a MBH neuron activated by ODN (1 nM) in absence (*top panel*) or presence of the ODN GPCR antagonist cyclo₁₋₈[dLeu⁵]OP (cdLOP) (10 nM; *bottom panel*). **C-** Percentage of ODN-responsive neurons in MBH dissociated neuron culture (*left panel*) and quantification of ODN response intensity (AUC; *right panel*) with or without cdLOP (ODN: $n = 36$ ODN responsive / 425 total cells; ODN + cdLOP: $n = 17$ ODN responsive / 455 total cells, 3 independent cultures). * $p < 0.05$. Unpaired Student *t*-test.

Figure 1

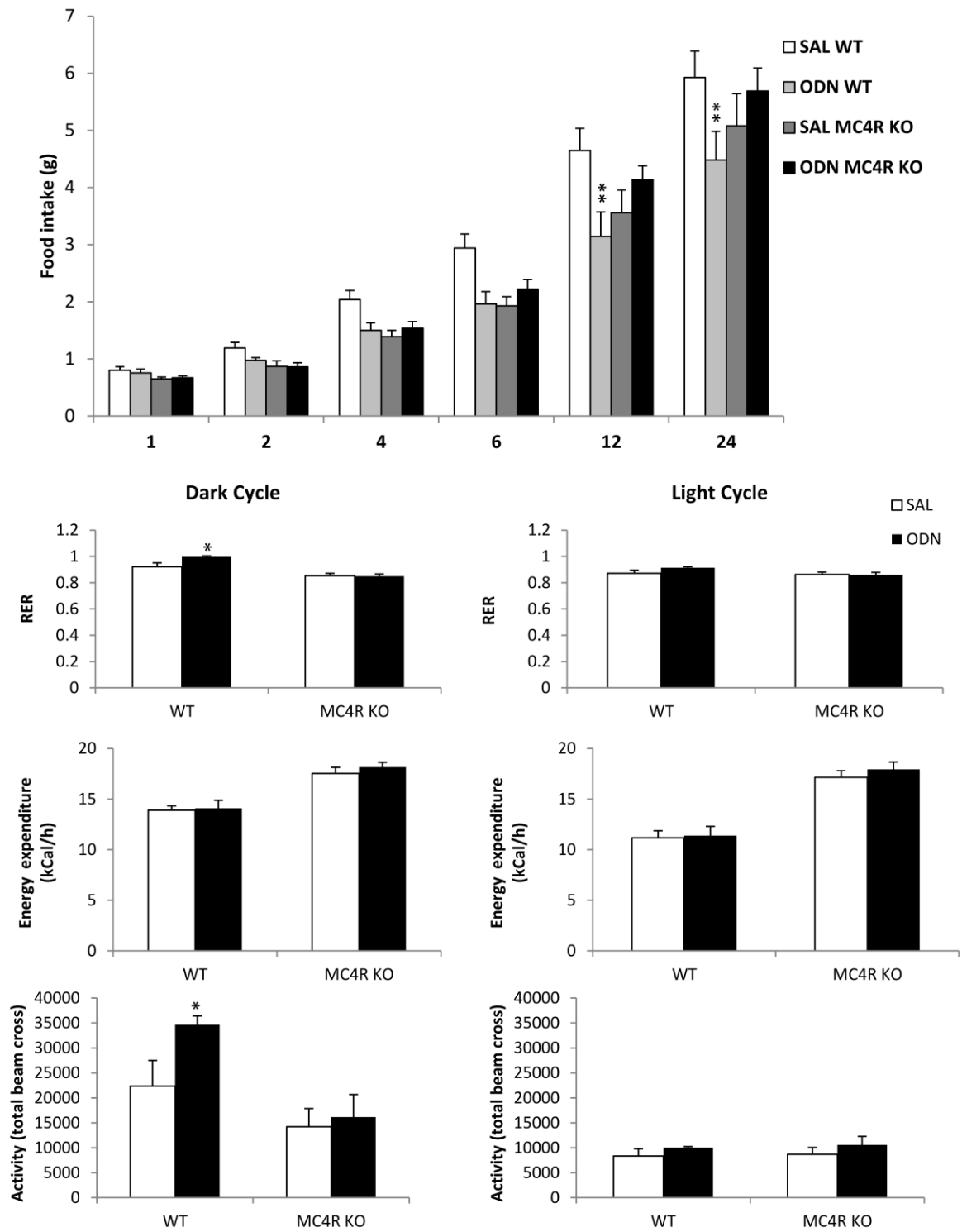


Figure 2

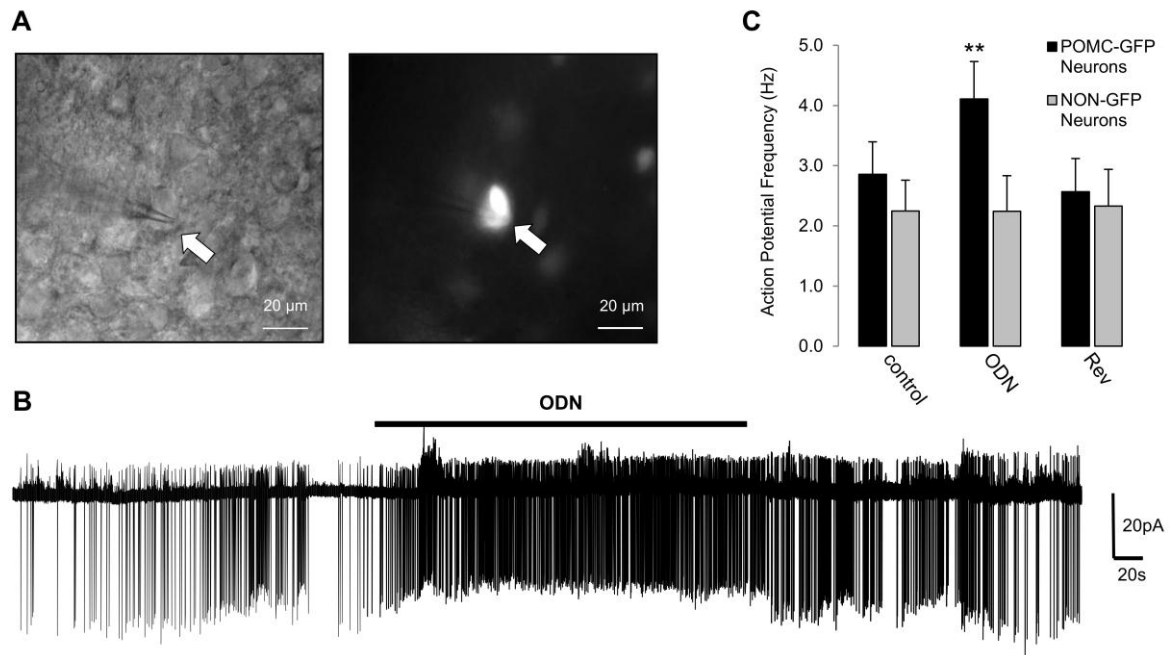


Figure 3

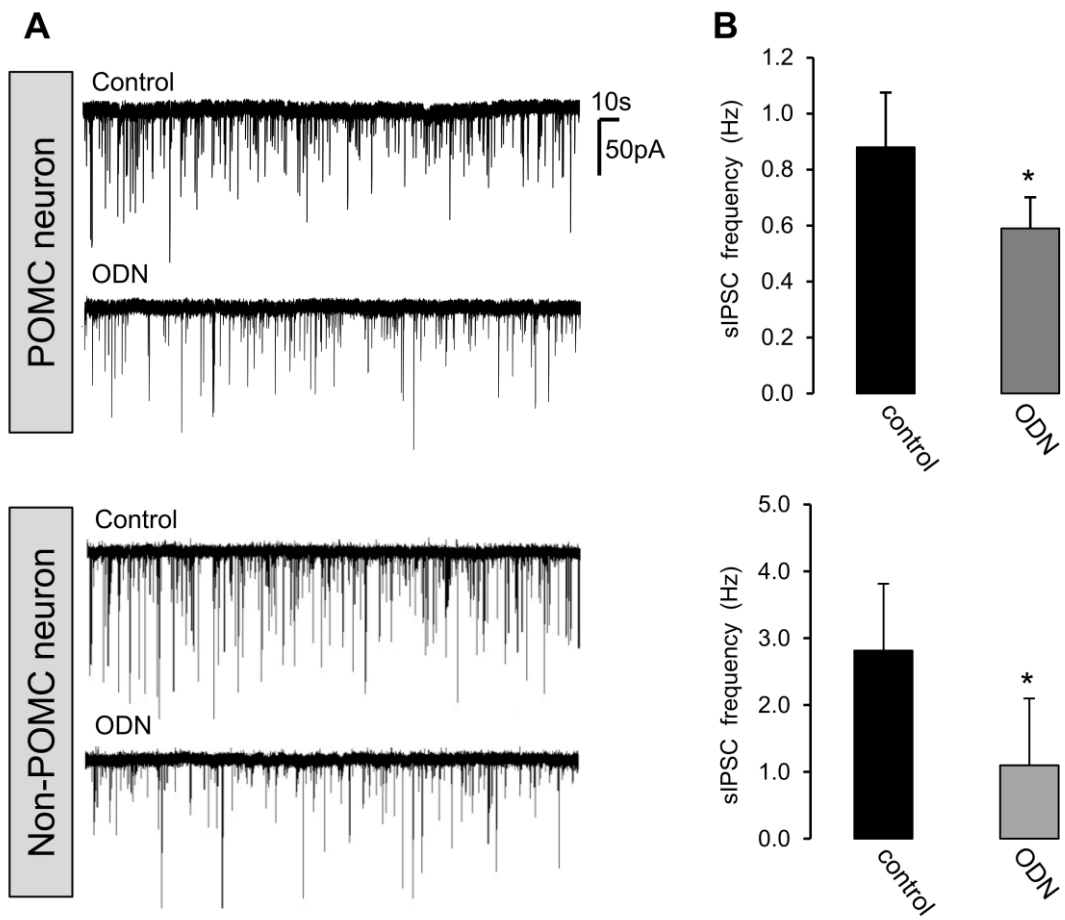
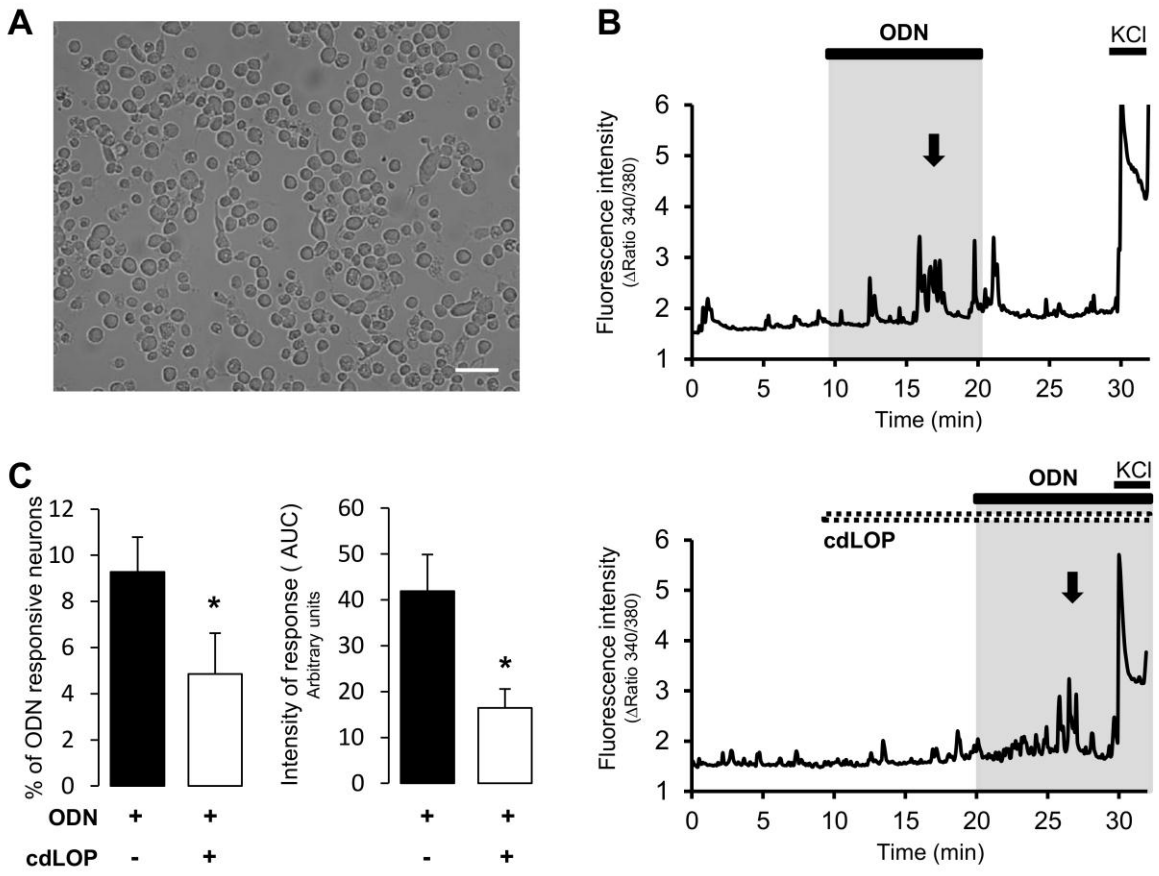


Figure 4



Bibliographie

- Abbott, C.R., Rossi, M., Wren, A.M., Murphy, K.G., Kennedy, A.R., Stanley, S.A., Zollner, A.N., Morgan, D.G.A., Morgan, I., Ghatei, M.A., et al. (2001). Evidence of an orexigenic role for cocaine- and amphetamine-regulated transcript after administration into discrete hypothalamic nuclei. *Endocrinology* *142*, 3457–3463.
- Abramowitz, J., and Birnbaumer, L. (2009). Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *23*, 297–328.
- Adachi, A., Kobashi, M., and Funahashi, M. (1995). Glucose-responsive neurons in the brainstem. *Obesity Research* *3 Suppl 5*, 735S – 740S.
- Adkins, B.A., Myers, S.R., Hendrick, G.K., Stevenson, R.W., Williams, P.E., and Cherrington, A.D. (1987). Importance of the route of intravenous glucose delivery to hepatic glucose balance in the conscious dog. *Journal of Clinical Investigation* *79*, 557–565.
- Ainscow, E.K., Mirshamsi, S., Tang, T., Ashford, M.L.J., 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. *The Journal of Physiology* *544*, 429–445.
- Allard, C., Carneiro, L., Collins, S.C., Chrétien, C., Grall, S., Pénicaud, L., and Leloup, C. (2013). Alteration of hypothalamic glucose and lactate sensing in 48h hyperglycemic rats. *Neuroscience Letters* *534*, 75–79.
- Alquier, T., Leloup, C., Atef, N., Fioramonti, X., Lorsignol, A., and Pénicaud, L. (2003). Cerebral insulin increases brain response to glucose. *Journal of Neuroendocrinology* *15*, 75–79.
- Alquier, T., Kawashima, J., Tsuji, Y., and Kahn, B.B. (2007). Role of hypothalamic adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase in the impaired counterregulatory response induced by repetitive neuroglucopenia. *Endocrinology* *148*, 1367–1375.
- Anand, B.K., Chhina, G.S., Sharma, K.N., Dua, S., and Singh, B. (1964). Activity of single neurons in the hypothalamic feeding centers: effect of glucose. *The American Journal of Physiology* *207*, 1146–1154.
- Andrew, S.F., Dinh, T.T., and Ritter, S. (2007). Localized glucoprivation of hindbrain sites elicits corticosterone and glucagon secretion. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* *292*, R1792–R1798.
- Andrews, Z.B., Liu, Z.-W., Wallingford, N., Erion, D.M., Borok, E., Friedman, J.M., Tschöp, M.H., Shanabrough, M., Cline, G., Shulman, G.I., et al. (2008). UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* *454*, 846–851.
- Aponte, Y., Atasoy, D., and Sternson, S.M. (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nature Neuroscience* *14*, 351–355.
- Arluison, M., Quignon, M., Nguyen, P., Thorens, B., Leloup, C., and Penicaud, L. (2004a). Distribution and anatomical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain--an immunohistochemical study. *Journal of Chemical Neuroanatomy* *28*, 117–136.
- Arluison, M., Quignon, M., Thorens, B., Leloup, C., and Penicaud, L. (2004b). Immunocytochemical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain. II. Electron microscopic study. *Journal of Chemical Neuroanatomy* *28*, 137–146.
- Ashford, M.L., Boden, P.R., and Treherne, J.M. (1990). Glucose-induced excitation of hypothalamic neurones is mediated by ATP-sensitive K⁺ channels. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* *415*, 479–483.
- Atalayer, D., Robertson, K.L., Haskell-Luevano, C., Andreasen, A., and Rowland, N.E. (2010). Food demand and meal size in mice with single or combined disruption of melanocortin type 3 and 4 receptors. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* *298*, R1667–R1674.

- Atasoy, D., Betley, J.N., Su, H.H., and Sternson, S.M. (2012). Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature* 488, 172–177.
- Atef, N., Ktorza, A., and Pénicaud, L. (1995). CNS involvement in the glucose induced increase of islet blood flow in obese Zucker rats. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 19, 103–107.
- Atef, N., Laury, M.C., N’Guyen, J.M., Mokhtar, N., Ktorza, A., and Penicaud, L. (1997). Increased pancreatic islet blood flow in 48-hour glucose-infused rats: Involvement of central and autonomic nervous systems. *Endocrinology* 138, 1836–1840.
- Bady, I., Marty, N., Dallaporta, M., Emery, M., Gyger, J., Tarussio, D., Foretz, M., and Thorens, B. (2006). Evidence from *glut2*-null mice that glucose is a critical physiological regulator of feeding. *Diabetes* 55, 988–995.
- Bagnol, D., Lu, X.Y., Kaelin, C.B., Day, H.E., Ollmann, M., Gantz, I., Akil, H., Barsh, G.S., and Watson, S.J. (1999). Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19, RC26.
- Balzer, M., Lintschinger, B., and Groschner, K. (1999). Evidence for a role of Trp proteins in the oxidative stress-induced membrane conductances of porcine aortic endothelial cells. *Cardiovascular Research* 42, 543–549.
- Beall, C., Hamilton, D.L., Gallagher, J., Logie, L., Wright, K., Soutar, M.P., Dadak, S., Ashford, F.B., Haythorne, E., Du, Q., et al. (2012). Mouse hypothalamic GT1-7 cells demonstrate AMPK-dependent intrinsic glucose-sensing behaviour. *Diabetologia* 55, 2432–2444.
- Benani, A., Troy, S., Carmona, M.C., Fioramonti, X., Lorsignol, A., Leloup, C., Casteilla, L., and Pénicaud, L. (2007). Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: Redox regulation of food intake. *Diabetes* 56, 152–160.
- Berrout, J., Jin, M., and O’Neil, R.G. (2012). Critical role of TRPP2 and TRPC1 channels in stretch-induced injury of blood-brain barrier endothelial cells. *Brain Research* 1436, 1–12.
- Berthoud, H.-R. (2002). Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 26, 393–428.
- Bezzarides, V.J., Ramsey, I.S., Kotecha, S., Greka, A., and Clapham, D.E. (2004). Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nature Cell Biology* 6, 709–720.
- Billington, C.J., Briggs, J.E., Grace, M., and Levine, A.S. (1991). Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *The American Journal of Physiology* 260, R321–R327.
- Bolborea, M., and Dale, N. (2013). Hypothalamic tanycytes: Potential roles in the control of feeding and energy balance. *Trends in Neurosciences* 36, 91–100.
- Borg, M.A., Sherwin, R.S., Borg, W.P., Tamborlane, W. V., and Shulman, G.I. (1997). Local ventromedial hypothalamus glucose perfusion blocks counterregulation during systemic hypoglycemia in awake rats. *Journal of Clinical Investigation* 99, 361–365.
- Borg, W.P., During, M.J., Sherwin, R.S., Borg, M.A., Brines, M.L., and Shulman, G.I. (1994). Ventromedial hypothalamic lesions in rats suppress counterregulatory responses to hypoglycemia. *Journal of Clinical Investigation* 93, 1677–1682.
- Borg, W.P., Sherwin, R.S., During, M.J., Borg, M.A., and Shulman, G.I. (1995). Local ventromedial hypothalamus glucopenia triggers counterregulatory hormone release. *Diabetes* 44, 180–184.

- Bouyakdan, K., Taïb, B., Budry, L., Zhao, S., Rodaros, D., NBeess, D., Mandrup, S., Faergeman, N.J., Alquier, T. (2015). A novel rôle of ACBP/DBI as a regulator of long-chain acid metabolism in astrocytes. *Journal of Neurochemistry* *133*, 253-265.
- Bouzier-Sore, A.K., Voisin, P., Bouchaud, V., Bezancon, E., Franconi, J.M., and Pellerin, L. (2006). Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: A comparative NMR study. *European Journal of Neuroscience* *24*, 1687–1694.
- Broberger, C., Landry, M., Wong, H., Walsh, J.N., and Hökfelt, T. (1997). Subtypes Y1 and Y2 of the neuropeptide Y receptor are respectively expressed in pro-opiomelanocortin- and neuropeptide-Y-containing neurons of the rat hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* *66*, 393–408.
- Burcelin, R. (2003). Apollinaire Bouchardat prize 2003. Glycemic equilibrium and glucose detection. *Journées Annuelles de Diabetologie de l'Hotel-Dieu* 37–52.
- Burcelin, R., Dolci, W., and Thorens, B. (2000a). Portal glucose infusion in the mouse induces hypoglycemia: Evidence that the hepatoportal glucose sensor stimulates glucose utilization. *Diabetes* *49*, 1635–1642.
- Burcelin, R., Dolci, W., and Thorens, B. (2000b). Glucose sensing by the hepatoportal sensor is GLUT2-dependent: In vivo analysis in GLUT2-null mice. *Diabetes* *49*, 1643–1648.
- Burcelin, R., Crivelli, V., Perrin, C., Da Costa, A., Mu, J., Kahn, B.B., Birnbaum, M.J., Kahn, C.R., Vollenweider, P., and Thorens, B. (2003). GLUT4, AMP kinase, but not the insulin receptor, are required for hepatoportal glucose sensor-stimulated muscle glucose utilization. *Journal of Clinical Investigation* *111*, 1555–1562.
- Burdakov, D., Gerasimenko, O., and Verkhatsky, A. (2005a). Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentrating hormone and orexin neurons in situ. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* *25*, 2429–2433.
- Burdakov, D., Luckman, S.M., and Verkhatsky, A. (2005b). Glucose-sensing neurons of the hypothalamus. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* *360*, 2227–2235.
- Burdakov, D., Jensen, L.T., Alexopoulos, H., Williams, R.H., Fearon, I.M., O'Kelly, I., Gerasimenko, O., Fugger, L., and Verkhatsky, A. (2006). Tandem-pore K⁺ channels mediate inhibition of orexin neurons by glucose. *Neuron* *50*, 711–722.
- Canabal, D.D., Potian, J.G., Duran, R.G., McArdle, J.J., and Routh, V.H. (2007a). Hyperglycemia impairs glucose and insulin regulation of nitric oxide production in glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* *293*, R592–R600.
- Canabal, D.D., Song, Z., Potian, J.G., Beuve, A., McArdle, J.J., and Routh, V.H. (2007b). Glucose, insulin, and leptin signaling pathways modulate nitric oxide synthesis in glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* *292*, R1418–R1428.
- Cansell, C., Castel, J., Denis, R.G.P., Rouch, C., Delbes, A.-S., Martinez, S., Mestivier, D., Finan, B., Maldonado-Aviles, J.G., Rijnsburger, M., et al. (2014). Dietary triglycerides act on mesolimbic structures to regulate the rewarding and motivational aspects of feeding. *Molecular Psychiatry* 1–11.
- Carneiro, L., Allard, C., Guissard, C., Fioramonti, X., Tourrel-Cuzin, C., Bailbé, D., Barreau, C., Offer, G., Nédelec, E., Salin, B., et al. (2012). Importance of Mitochondrial Dynamin-Related Protein 1 in Hypothalamic Glucose Sensitivity in Rats. *Antioxidants & Redox Signaling* *17*, 433–444.
- Cha, S.H., and Lane, M.D. (2009). Central lactate metabolism suppresses food intake via the hypothalamic AMP kinase/malonyl-CoA signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *386*, 212–216.

- Cha, S.H., Wolfgang, M., Tokutake, Y., Chohan, S., and Lane, M.D. (2008). Differential effects of central fructose and glucose on hypothalamic malonyl-CoA and food intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 16871–16875.
- Chari, M., Yang, C.S., Lam, C.K.L., Lee, K., Mighiu, P., Kokorovic, A., Cheung, G.W.C., Lai, T.Y.Y., Wang, P.Y.T., and Lam, T.K.T. (2011). Glucose transporter-1 in the hypothalamic glial cells mediates glucose sensing to regulate glucose production in vivo. *Diabetes* *60*, 1901–1906.
- Chiarugi, P. (2005). PTPs versus PTKs: the redox side of the coin. *Free Radical Research* *39*, 353–364.
- Chowen, J.A., Argente, J., and Horvath, T.L. (2013). Uncovering novel roles of nonneuronal cells in body weight homeostasis and obesity. *Endocrinology* *154*, 3001–3007.
- Chung, A.W.Y., Au Yeung, K., Chum, E., Okon, E.B., and van Breemen, C. (2009). Diabetes modulates capacitative calcium entry and expression of transient receptor potential canonical channels in human saphenous vein. *European Journal of Pharmacology* *613*, 114–118.
- Ciofi, P. (2011). The arcuate nucleus as a circumventricular organ in the mouse. *Neuroscience Letters* *487*, 187–190.
- Clapham, D.E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* *426*, 517–524.
- Clapham, D.E., and Garbers, D.L. (2005). International Union of Pharmacology. L. Nomenclature and structure-function relationships of CatSper and two-pore channels. *Pharmacological Reviews* *57*, 451–454.
- Claret, M., Smith, M.A., Batterham, R.L., Selman, C., Choudhury, A.I., Fryer, L.G.D., Clements, M., Al-Qassab, H., Heffron, H., Xu, A.W., et al. (2007). AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *The Journal of Clinical Investigation* *117*, 2325–2336.
- Colombani, A., Carneiro, L., Benani, A., Galinier, A., Jaillard, T., Duparc, T., Lorsignol, A., Magnan, C., Casteilla, L., and Saba, P. (2009). Enhanced Hypothalamic Glucose Sensing in Obesity: Alteration of Redox Signaling. *October* *58*, 2189–2197.
- Compère, V., Li, S., Leprince, J., Tonon, M.C., Vaudry, H., and Pelletier, G. (2003). Effect of intracerebroventricular administration of the octadecaneuropeptide on the expression of pro-opiomelanocortin, neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone mRNAs in rat hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology* *15*, 197–203.
- Compère, V., Lanfray, D., Castel, H., Morin, F., Leprince, J., Dureuil, B., Vaudry, H., Pelletier, G., and Tonon, M.C. (2010). Acute food deprivation reduces expression of diazepam-binding inhibitor, the precursor of the anorexigenic octadecaneuropeptide ODN, in mouse glial cells. *Journal of Molecular Endocrinology* *44*, 295–299.
- Coppola, A., Liu, Z.W., Andrews, Z.B., Paradis, E., Roy, M.C., Friedman, J.M., Ricquier, D., Richard, D., Horvath, T.L., Gao, X.B., et al. (2007). A Central Thermogenic-like Mechanism in Feeding Regulation: An Interplay between Arcuate Nucleus T3 and UCP2. *Cell Metabolism* *5*, 21–33.
- Cortes-Campos, C., Elizondo, R., Carril, C., Martínez, F., Boric, K., Nualart, F., and Garcia-Robles, M.A. (2013). MCT2 Expression and Lactate Influx in Anorexigenic and Orexigenic Neurons of the Arcuate Nucleus. *PLoS ONE* *8*.
- Cosens, D.J., and Manning, A. (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* *224*, 285–287.
- Costa, E., and Guidotti, A. (1991). Diazepam binding inhibitor (DBI): a peptide with multiple biological actions. *Life Sciences* *49*, 325–344.

- Cotero, V.E., and Routh, V.H. (2009). Insulin blunts the response of glucose-excited neurons in the ventrolateral-ventromedial hypothalamic nucleus to decreased glucose. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 296, E1101–E1109.
- Cotero, V.E., Zhang, B.B., and Routh, V.H. (2010). The response of glucose-excited neurons in the ventromedial hypothalamus to decreased glucose is enhanced in a murine model of type 2 diabetes mellitus. *Journal of Neuroendocrinology* 22, 65–74.
- Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdán, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., and Low, M.J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411, 480–484.
- Cruciani-Guglielmacci, C., Hervalet, A., Douared, L., Sanders, N.M., Levin, B.E., Ktorza, A., and Magnan, C. (2004). Beta oxidation in the brain is required for the effects of non-esterified fatty acids on glucose-induced insulin secretion in rats. *Diabetologia* 47, 2032–2038.
- Cryer, P.E. (2008). The barrier of hypoglycemia in diabetes. *Diabetes* 57, 3169–3176.
- Dallaporta, M., Himmi, T., Perrin, J., and Orsini, J.C. (1999). Solitary tract nucleus sensitivity to moderate changes in glucose level. *Neuroreport* 10, 2657–2660.
- Delaere, F., Magnan, C., and Mithieux, G. (2010). Hypothalamic integration of portal glucose signals and control of food intake and insulin sensitivity. *Diabetes & Metabolism* 36, 257–262.
- Delaere, F., Duchampt, A., Mounien, L., Seyer, P., Duraffourd, C., Zitoun, C., Thorens, B., and Mithieux, G. (2013). The role of sodium-coupled glucose co-transporter 3 in the satiety effect of portal glucose sensing. *Molecular Metabolism* 2, 47–53.
- Diano, S., Liu, Z.-W., Jeong, J.K., Dietrich, M.O., Ruan, H.-B., Kim, E., Suyama, S., Kelly, K., Gyengesi, E., Arbiser, J.L., et al. (2011). Peroxisome proliferation-associated control of reactive oxygen species sets melanocortin tone and feeding in diet-induced obesity. *Nature Medicine* 17, 1121–1127.
- Dietrich, A., Mederos Y Schnitzler, M., Emmel, J., Kalwa, H., Hofmann, T., and Gudermann, T. (2003). N-Linked Protein Glycosylation Is a Major Determinant for Basal TRPC3 and TRPC6 Channel Activity. *Journal of Biological Chemistry* 278, 47842–47852.
- Dietrich, M.O., Zimmer, M.R., Bober, J., and Horvath, T.L. (2015). Hypothalamic *Agrp* neurons drive stereotypic behaviors beyond feeding. *Cell* 160, 1222–1232.
- Diggs-Andrews, K.A., Zhang, X., Song, Z., Daphna-Iken, D., Routh, V.H., and Fisher, S.J. (2010). Brain insulin action regulates hypothalamic glucose sensing and the counterregulatory response to hypoglycemia. *Diabetes* 59, 2271–2280.
- Dunn-Meynell, A.A., Routh, V.H., Kang, L., Gaspers, L., and Levin, B.E. (2002). Glucokinase is the likely mediator of glucosensing in both glucose-excited and glucose-inhibited central neurons. *Diabetes* 51, 2056–2065.
- Dunn-Meynell, A.A., Sanders, N.M., Compton, D., Becker, T.C., Eiki, J., Zhang, B.B., and Levin, B.E. (2009). Relationship among brain and blood glucose levels and spontaneous and glucoprivic feeding. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29, 7015–7022.
- Edwards, C.M.B., Abbott, C.R., Sunter, D., Kim, M.S., Dakin, C.L., Murphy, K.G., Abusnana, S., Taheri, S., Rossi, M., and Bloom, S.R. (2000). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript, glucagon-like peptide-1 and corticotrophin releasing factor inhibit feeding via agouti-related protein independent pathways in the rat. *Brain Research* 866, 128–134.

- Elmqvist, J.K., Elias, C.F., and Saper, C.B. (1999). From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22, 221–232.
- Evans, M.L., McCrimmon, R.J., Flanagan, D.E., Keshavarz, T., Fan, X., McNay, E.C., Jacob, R.J., and Sherwin, R.S. (2004). Hypothalamic ATP-sensitive K⁺ channels play a key role in sensing hypoglycemia and triggering counterregulatory epinephrine and glucagon responses. *Diabetes* 53, 2542–2551.
- Færgeman, N.J., Wadum, M., Feddersen, S., Burton, M., Kragelund, B.B., and Knudsen, J. (2007). Acyl-CoA binding proteins; structural and functional conservation over 2000 MYA. *Molecular and Cellular Biochemistry* 299, 55–65.
- Farrell, C.L., and Pardridge, W.M. (1991). Blood-brain barrier glucose transporter is asymmetrically distributed on brain capillary endothelial luminal and abluminal membranes: an electron microscopic immunogold study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 5779–5783.
- Fauconnier, J., Lanner, J.T., Sultan, A., Zhang, S.J., Katz, A., Bruton, J.D., and Westerblad, H. (2007). Insulin potentiates TRPC3-mediated cation currents in normal but not in insulin-resistant mouse cardiomyocytes. *Cardiovascular Research* 73, 376–385.
- Fergusson, G., Ethier, M., Guevremont, M., Chretien, C., Attane, C., Joly, E., Fioramonti, X., Prentki, M., Poitout, V., and Alquier, T. (2014). Defective insulin secretory response to intravenous glucose in C57Bl/6J compared to C57Bl/6N mice. *Mol Metab* 3, 848–854.
- Fioramonti, X., Lorsignol, A., Taupignon, A., and Pénicaud, L. (2004). A new ATP-sensitive K⁺ channel-independent mechanism is involved in glucose-excited neurons of mouse arcuate nucleus. *Diabetes* 53, 2767–2775.
- Fioramonti, X., Contié, S., Song, Z., Routh, V.H., Lorsignol, A., and Pénicaud, L. (2007). Characterization of glucosensing neuron subpopulations in the arcuate nucleus: integration in neuropeptide Y and pro-opiomelanocortin networks? *Diabetes* 56, 1219–1227.
- Fioramonti, X., Marsollier, N., Song, Z., Fakira, K.A., Patel, R.M., Brown, S., Duparc, T., Pica-Mendez, A., Sanders, N.M., Knauf, C., et al. (2010). Ventromedial hypothalamic nitric oxide production is necessary for hypoglycemia detection and counterregulation. *Diabetes* 59, 519–528.
- Fioramonti, X., Song, Z., Vazirani, R.P., Beuve, A., and Routh, V.H. (2011). Hypothalamic nitric oxide in hypoglycemia detection and counterregulation: a two-edged sword. *Antioxidants & Redox Signaling* 14, 505–517.
- Fioramonti, X., Deak, A., Deshpande, S., Carneiro, L., Zhou, C., Sayed, N., Orban, B., Berlin, J.R., Pénicaud, L., Leloup, C., et al. (2013). Hypothalamic S-nitrosylation contributes to the counter-regulatory response impairment following recurrent hypoglycemia. *PLoS One* 8, e68709.
- Le Foll, C., Irani, B.G., Magnan, C., Dunn-Meynell, A. a, and Levin, B.E. (2009a). Characteristics and mechanisms of hypothalamic neuronal fatty acid sensing. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 297, R655–R664.
- Le Foll, C., Irani, B.G., Magnan, C., Dunn-Meynell, A., and Levin, B.E. (2009b). Effects of maternal genotype and diet on offspring glucose and fatty acid-sensing ventromedial hypothalamic nucleus neurons. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 297, R1351–R1357.
- Le Foll, C., Dunn-Meynell, A. a, Mizioro, H.M., and Levin, B.E. (2014). Regulation of hypothalamic neuronal sensing and food intake by ketone bodies and Fatty acids. *Diabetes* 63, 1259–1269.
- Frayling, C., Britton, R., and Dale, N. (2011). ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanycytes. *The Journal of Physiology* 589, 2275–2286.

- Freeman, S.L., Bohan, D., Darcel, N., and Raybould, H.E. (2006). Luminal glucose sensing in the rat intestine has characteristics of a sodium-glucose cotransporter. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 291, G439–G445.
- Fujita, S., and Donovan, C.M. (2005). Celiac-superior mesenteric ganglionectomy, but not vagotomy, suppresses the sympathoadrenal response to insulin-induced hypoglycemia. *Diabetes* 54, 3258–3264.
- Fujita, S., Bohland, M., Sanchez-Watts, G., Watts, A.G., and Donovan, C.M. (2007). Hypoglycemic detection at the portal vein is mediated by capsaicin-sensitive primary sensory neurons. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 293, E96–E101.
- Fukaya, M., Mizuno, A., Arai, H., Muto, K., Uebanso, T., Matsuo, K., Yamamoto, H., Taketani, Y., Doi, T., and Takeda, E. (2007). Mechanism of rapid-phase insulin response to elevation of portal glucose concentration. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 293, E515–E522.
- Gantulga, D., Maejima, Y., Nakata, M., and Yada, T. (2012). Glucose and insulin induce Ca²⁺ signaling in nesfatin-1 neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 420, 811–815.
- García-Fernández, M., Ortega-Sáenz, P., Castellano, A., and López-Barneo, J. (2007). Mechanisms of low-glucose sensitivity in carotid body glomus cells. *Diabetes* 56, 2893–2900.
- Garfield, A.S., Shah, B.P., Madara, J.C., Burke, L.K., Patterson, C.M., Flak, J., Neve, R.L., Evans, M.L., Lowell, B.B., Myers, M.G., et al. (2014). A parabrachial-hypothalamic cholecystokinin neurocircuit controls counterregulatory responses to hypoglycemia. *Cell Metabolism* 20, 1030–1037.
- Gees, M., Colosoul, B., and Nilius, B. (2010). The role of transient receptor potential cation channels in Ca²⁺ signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2.
- George, P.S., Tavendale, R., Palmer, C.N., and McCrimmon, R.J. (2015). Diazoxide improves hormonal counterregulatory responses to acute hypoglycemia in long-standing Type 1 Diabetes. *Diabetes*.
- Gomis, A., Soriano, S., Belmonte, C., and Viana, F. (2008). Hypoosmotic- and pressure-induced membrane stretch activate TRPC5 channels. *The Journal of Physiology* 586, 5633–5649.
- González, J.A., Jensen, L.T., Fugger, L., and Burdakov, D. (2008). Metabolism-independent sugar sensing in central orexin neurons. *Diabetes* 57, 2569–2576.
- González, J.A., Reimann, F., and Burdakov, D. (2009). Dissociation between sensing and metabolism of glucose in sugar sensing neurones. *The Journal of Physiology* 587, 41–48.
- Gordon, G.R.J., Baimoukhametova, D. V., Hewitt, S.A., Rajapaksha, W.R.A.K.J.S., Fisher, T.E., and Bains, J.S. (2005). Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nature Neuroscience* 8, 1078–1086.
- Graham, S., Ding, M., Ding, Y., Sours-Brothers, S., Luchowski, R., Gryczynski, Z., Yorio, T., Ma, H., and Ma, R. (2010). Canonical transient receptor potential 6 (TRPC6), a redox-regulated cation channel. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 23466–23476.
- Graham, S., Gorin, Y., Abboud, H.E., Ding, M., Lee, D.Y., Shi, H., Ding, Y., and Ma, R. (2011). Abundance of TRPC6 protein in glomerular mesangial cells is decreased by ROS and PKC in diabetes. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 301, C304–C315.
- Graham, S., Yuan, J.P., and Ma, R. (2012). Canonical transient receptor potential channels in diabetes. *Experimental Biology and Medicine* 237, 111–118.

- Gromada, J., Franklin, I., and Wollheim, C.B. (2007). α -cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocrine Reviews* 28, 84–116.
- Groschner, K., Rosker, C., and Lukas, M. (2004). Role of TRP channels in oxidative stress. *Novartis Foundation Symposium* 258, 222–230; discussion 231–235, 263–266.
- Guillod-Maximin, E., Lorsignol, A., Alquier, T., and Pénicaud, L. (2004). Acute intracarotid glucose injection towards the brain induces specific c-fos activation in hypothalamic nuclei: Involvement of astrocytes in cerebral glucose-sensing in rats. *Journal of Neuroendocrinology* 16, 464–471.
- Han, S.-M., Namkoong, C., Jang, P.G., Park, I.S., Hong, S.W., Katakami, H., Chun, S., Kim, S.W., Park, J.-Y., Lee, K.-U., et al. (2005). Hypothalamic AMP-activated protein kinase mediates counter-regulatory responses to hypoglycaemia in rats. *Diabetologia* 48, 2170–2178.
- Harris, G.C., Wimmer, M., and Aston-Jones, G. (2005). A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature* 437, 556–559.
- Harteneck, C., Klose, C., and Krautwurst, D. (2011). Synthetic modulators of TRP channel activity. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 87–106.
- Hartmann, J., Dragicevic, E., Adelsberger, H., Henning, H.A., Sumser, M., Abramowitz, J., Blum, R., Dietrich, A., Freichel, M., Flockerzi, V., et al. (2008). TRPC3 Channels Are Required for Synaptic Transmission and Motor Coordination. *Neuron* 59, 392–398.
- Hevener, A.L., Bergman, R.N., and Donovan, C.M. (2000). Portal vein afferents are critical for the sympathoadrenal response to hypoglycemia. *Diabetes* 49, 8–12.
- Hofmann, T., Obukhov, G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., and Schultz, G. (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397, 259–263.
- Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., and Gudermann, T. (2002). Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7461–7466.
- Horvath, T.L., Andrews, Z.B., and Diano, S. (2009). Fuel utilization by hypothalamic neurons: roles for ROS. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 20, 78–87.
- Huszar, D., Lynch, C.A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Berkemeier, L.R., Gu, W., Kesterson, R.A., Boston, B.A., Cone, R.D., et al. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88, 131–141.
- Ibrahim, N., Bosch, M.A., Smart, J.L., Qiu, J., Rubinstein, M., Rønnekleiv, O.K., Low, M.J., and Kelly, M.J. (2003). Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels. *Endocrinology* 144, 1331–1340.
- Ionut, V., Castro, A.V.B., Woolcott, O.O., Stefanovski, D., Iyer, M.S., Broussard, J.L., Burch, M., Elazary, R., Kolka, C.M., Mkrtyan, H., et al. (2014). Hepatic portal vein denervation impairs oral glucose tolerance, but not exenatide's effect on glycemia. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*.
- Jaillard, T., Roger, M., Galinier, A., Guillou, P., Benani, A., Leloup, C., Casteilla, L., Pénicaud, L., and Lorsignol, A. (2009). Hypothalamic reactive oxygen species are required for insulin-induced food intake inhibition: An NADPH oxidase-dependent mechanism. *Diabetes* 58, 1544–1549.
- James W. Putney, J. (2007). Multiple Mechanisms of TRPC Activation. In *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*, pp. 31–44.

- Kang, L., Routh, V.H., Kuzhikandathil, E. V., Gaspers, L.D., and Levin, B.E. (2004). Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons. *Diabetes* 53, 549–559.
- Kang, L., Dunn-Meynell, A.A., Routh, V.H., Gaspers, L.D., Nagata, Y., Nishimura, T., Eiki, J., Zhang, B.B., and Levin, B.E. (2006). Glucokinase is a critical regulator of ventromedial hypothalamic neuronal glucosensing. *Diabetes* 55, 412–420.
- Karnani, M.M., Szabó, G., Erdélyi, F., and Burdakov, D. (2013). Lateral hypothalamic GAD65 neurons are spontaneously firing and distinct from orexin- and melanin-concentrating hormone neurons. *The Journal of Physiology* 591, 933–953.
- Kim, E.Y., Anderson, M., and Dryer, S.E. (2012). Insulin increases surface expression of TRPC6 channels in podocytes: role of NADPH oxidases and reactive oxygen species. *AJP: Renal Physiology* 302, F298–F307.
- Kim, J., Kwak, M., Jeon, J.P., Myeong, J., Wie, J., Hong, C., Kim, S.Y., Jeon, J.H., Kim, H.J., and So, I. (2014). Isoform- and receptor-specific channel property of canonical transient receptor potential (TRPC)1/4 channels. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 466, 491–504.
- Kim, M.S., Zeng, W., Yuan, J.P., Shin, D.M., Worley, P.F., and Muallem, S. (2009). Native Store-operated Ca²⁺ Influx Requires the Channel Function of Orai1 and TRPC1. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 9733–9741.
- Kiyonaka, S., Kato, K., Nishida, M., and Mori, Y. (2010). Pharmacological properties of novel TRPC channel inhibitors. *Yakugaku Zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 130, 303–311.
- Kokorovic, A., Cheung, G.W., Rossetti, L., and Lam, T.K. (2009). Hypothalamic sensing of circulating lactate regulates glucose production. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13, 4403–4408.
- Kong, D., Vong, L., Parton, L.E., Ye, C., Tong, Q., Hu, X., Choi, B., Brüning, J.C., and Lowell, B.B. (2010). Glucose stimulation of hypothalamic MCH neurons involves KATP channels, is modulated by ucp2, and regulates peripheral glucose homeostasis. *Cell Metabolism* 12, 545–552.
- Koyama, Y., Coker, R.H., Stone, E.E., Lacy, D.B., Jabbour, K., Williams, P.E., and Wasserman, D.H. (2000). Evidence that carotid bodies play an important role in glucose regulation in vivo. *Diabetes* 49, 1434–1442.
- Kozai, D., Ogawa, N., and Mori, Y. (2013). Redox Regulation of Transient Receptor Potential Channels. *Antioxidants & Redox Signaling* 00.
- Krashes, M.J., Koda, S., Ye, C., Rogan, S.C., Adams, A.C., Cusher, D.S., Maratos-Flier, E., Roth, B.L., and Lowell, B.B. (2011). Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *Journal of Clinical Investigation* 121, 1424–1428.
- Krashes, M.J., Shah, B.P., Koda, S., and Lowell, B.B. (2013). Rapid versus delayed stimulation of feeding by the endogenously released agRP neuron mediators GABA, NPY, and AgRP. *Cell Metabolism* 18, 588–595.
- Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K.N., Wulff, B.S., Clausen, J.T., Jensen, P.B., Madsen, O.D., Vrang, N., et al. (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393, 72–76.
- Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G., and Grüters, A. (1998). Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nature Genetics* 19, 155–157.
- Lam, C.K.L., Chari, M., Wang, P.Y.T., and Lam, T.K.T. (2008). Central lactate metabolism regulates food intake. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 295, E491–E496.

- Lam, T.K.T., Gutierrez-Juarez, R., Poci, A., and Rossetti, L. (2005). Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. *Science (New York, N.Y.)* 309, 943–947.
- Lanfray, D., Arthaud, S., Ouellet, J., Compère, V., Do Rego, J.L., Leprince, J., Lefranc, B., Castel, H., Bouchard, C., Monge-Roffarello, B., et al. (2013). Gliotransmission and brain glucose sensing critical role of endozepines. *Diabetes* 62, 801–810.
- Langlet, F., Levin, B.E., Luquet, S., Mazzone, M., Messina, A., Dunn-Meynell, A. a, Balland, E., Lacombe, A., Mazur, D., Carmeliet, P., et al. (2013). Tanycytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting. *Cell Metabolism* 17, 607–617.
- Lanner, J.T., Bruton, J.D., Assefaw-Redda, Y., Andronache, Z., Zhang, S.-J., Severa, D., Zhang, Z.-B., Melzer, W., Zhang, S.-L., Katz, A., et al. (2009). Knockdown of TRPC3 with siRNA coupled to carbon nanotubes results in decreased insulin-mediated glucose uptake in adult skeletal muscle cells. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, 1728–1738.
- Lee, K., Dixon, A.K., Richardson, P.J., and Pinnock, R.D. (1999). Glucose-receptive neurones in the rat ventromedial hypothalamus express KATP channels composed of Kir6.1 and SUR1 subunits. *The Journal of Physiology* 515 (Pt 2, 439–452.
- Leloup, C., Arluison, M., Lepetit, N., Cartier, N., Marfaing-Jallat, P., Ferré, P., and Pénicaud, L. (1994). Glucose transporter 2 (GLUT 2): expression in specific brain nuclei. *Brain Research* 638, 221–226.
- Leloup, C., Orosco, M., Serradas, P., Nicolaïdis, S., and Pénicaud, L. (1998). Specific inhibition of GLUT2 in arcuate nucleus by antisense oligonucleotides suppresses nervous control of insulin secretion. *Brain Research. Molecular Brain Research* 57, 275–280.
- Leloup, C., Magnan, C., Benani, A., Bonnet, E., Alquier, T., Offer, G., Carriere, A., Périquet, A., Fernandez, Y., Ktorza, A., et al. (2006). Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing. *Diabetes* 55, 2084–2090.
- Leloup, C., Tourrel-Cuzin, C., Magnan, C., Karaca, M., Castel, J., Carneiro, L., Colombani, A.L., Ktorza, A., Casteilla, L., and Pénicaud, L. (2009). Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 58, 673–681.
- Leshan, R.L., Greenwald-Yarnell, M., Patterson, C.M., Gonzalez, I.E., and Myers, M.G. (2012). Leptin action through hypothalamic nitric oxide synthase-1-expressing neurons controls energy balance. *Nature Medicine* 18, 820–823.
- Leuner, K., Heiser, J.H., Derksen, S., Mladenov, M.I., Fehske, C.J., Schubert, R., Gollasch, M., Schneider, G., Harteneck, C., Chatterjee, S.S., et al. (2010). Simple 2,4-diacylphloroglucinols as classic transient receptor potential-6 activators--identification of a novel pharmacophore. *Molecular Pharmacology* 77, 368–377.
- Levin, B.E., Becker, T.C., Eiki, J., Zhang, B.B., and Dunn-Meynell, A.A. (2008). Ventromedial hypothalamic glucokinase is an important mediator of the counterregulatory response to insulin-induced hypoglycemia. *Diabetes* 57, 1371–1379.
- Lin, S., Boey, D., and Herzog, H. (2004). NPY and Y receptors: Lessons from transgenic and knockout models. *Neuropeptides* 38, 189–200.
- Lintschinger, B., Balzer-Geldsetzer, M., Baskaran, T., Graier, W.F., Romanin, C., Zhu, M.X., and Groschner, K. (2000). Coassembly of Trp1 and Trp3 proteins generates diacylglycerol- and Ca²⁺-sensitive cation channels. *Journal of Biological Chemistry* 275, 27799–27805.
- Liu, B.-C., Song, X., Lu, X.-Y., Li, D.T., Eaton, D.C., Shen, B.-Z., Li, X.-Q., and Ma, H.-P. (2013). High glucose induces podocyte apoptosis by stimulating TRPC6 via elevation of reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta* 1833, 1434–1442.

- Liu, D., Maier, A., Scholze, A., Rauch, U., Boltzen, U., Zhao, Z., Zhu, Z., and Tepel, M. (2008). High glucose enhances transient receptor potential channel canonical type 6-dependent calcium influx in human platelets via phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28, 746–751.
- Liu, T., Kong, D., Shah, B., Ye, C., Koda, S., Saunders, A., Ding, J., Yang, Z., Sabatini, B., and Lowell, B. (2012). Fasting activation of AgRP neurons requires NMDA receptors and involves spinogenesis and increased excitatory tone. *Neuron* 73, 511–522.
- Lu, D., Willard, D., Patel, I.R., Kadwell, S., Overton, L., Kost, T., Luther, M., Chen, W., Woychik, R.P., and Wilkison, W.O. (1994). Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 371, 799–802.
- Luquet, S., Perez, F.A., Hnasko, T.S., and Palmiter, R.D. (2005). NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science (New York, N.Y.)* 310, 683–685.
- Maroto, R., Raso, A., Wood, T.G., Kurosky, A., Martinac, B., and Hamill, O.P. (2005). TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nature Cell Biology* 7, 179–185.
- Marston, O.J., Hurst, P., Evans, M.L., Burdakov, D.I., and Heisler, L.K. (2011). Neuropeptide Y cells represent a distinct glucose-sensing population in the lateral hypothalamus. *Endocrinology* 152, 4046–4052.
- Marty, N., Dallaporta, M., Foretz, M., Emery, M., Tarussio, D., Bady, I., Binnert, C., Beermann, F., and Thorens, B. (2005). Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors. *Journal of Clinical Investigation* 115, 3545–3553.
- Mayer, J. (1953). Glucostatic mechanism of regulation of food intake. *The New England Journal of Medicine* 249, 13–16.
- McCrimmon, R.J., Fan, X., Ding, Y., Zhu, W., Jacob, R.J., and Sherwin, R.S. (2004). Potential role for AMP-activated protein kinase in hypoglycemia sensing in the ventromedial hypothalamus. *Diabetes* 53, 1953–1958.
- McCrimmon, R.J., Evans, M.L., Fan, X., McNay, E.C., Chan, O., Ding, Y., Zhu, W., Gram, D.X., and Sherwin, R.S. (2005). Activation of ATP-sensitive K⁺ channels in the ventromedial hypothalamus amplifies counterregulatory hormone responses to hypoglycemia in normal and recurrently hypoglycemic rats. *Diabetes* 54, 3169–3174.
- McCrimmon, R.J., Fan, X., Cheng, H., McNay, E., Chan, O., Shaw, M., Ding, Y., Zhu, W., and Sherwin, R.S. (2006). Activation of AMP-activated protein kinase within the ventromedial hypothalamus amplifies counterregulatory hormone responses in rats with defective counterregulation. *Diabetes* 55, 1755–1760.
- McCrimmon, R.J., Shaw, M., Fan, X., Cheng, H., Ding, Y., Vella, M.C., Zhou, L., McNay, E.C., and Sherwin, R.S. (2008). Key role for AMP-activated protein kinase in the ventromedial hypothalamus in regulating counterregulatory hormone responses to acute hypoglycemia. *Diabetes* 57, 444–450.
- McDougal, D.H., Rogers, R.C., and Hermann, G.E. (2011). Astrocytes in rat nucleus of the solitary tract are activated by low glucose or glucoprivic challenges. *Autonomic Neuroscience* 163, 76.
- McNay, E.C., McCarty, R.C., and Gold, P.E. (2001). Fluctuations in brain glucose concentration during behavioral testing: dissociations between brain areas and between brain and blood. *Neurobiology of Learning and Memory* 75, 325–337.
- Medeiros, N., Dai, L., and Ferguson, A.V. (2012). Glucose-responsive neurons in the subfornical organ of the rat—a novel site for direct CNS monitoring of circulating glucose. *Neuroscience* 201, 157–165.
- Melnick, I. V., Price, C.J., and Colmers, W.F. (2011). Glucosensing in parvocellular neurons of the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *The European Journal of Neuroscience* 34, 272–282.

- Miki, T., Liss, B., Minami, K., Shiuchi, T., Saraya, A., Kashima, Y., Horiuchi, M., Ashcroft, F., Minokoshi, Y., Roeper, J., et al. (2001). ATP-sensitive K⁺ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nature Neuroscience* 4, 507–512.
- Millán, C., Martínez, F., Cortés-Campos, C., Lizama, I., Yañez, M.J., Llanos, P., Reinicke, K., Rodríguez, F., Peruzzo, B., Nualart, F., et al. (2010). Glial glucokinase expression in adult and post-natal development of the hypothalamic region. *ASN Neuro* 2, e00035.
- Miller, M.R., Shi, J., Wu, M., Engers, J., Hopkins, C.R., Lindsley, C.W., Salovich, J.M., Zhu, Y., Tian, J.B., Zhu, M.X., et al. (2010). Novel Chemical Inhibitor of TRPC4 Channels. In *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program*.
- Mimee, A., and Ferguson, A. V (2015). Glycemic state regulates melanocortin, but not nesfatin-1, responsiveness of glucose-sensing neurons in the nucleus of the solitary tract. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 308, R690–R699.
- Minke, B., and Selinger, Z. (1996). The roles of trp and calcium in regulating photoreceptor function in *Drosophila*. *Current Opinion in Neurobiology* 6, 459–466.
- Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y.-B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Fofelle, F., Ferré, P., Birnbaum, M.J., et al. (2004). AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428, 569–574.
- Mithieux, G., Misery, P., Magnan, C., Pillot, B., Gautier-Stein, A., Bernard, C., Rajas, F., and Zitoun, C. (2005). Portal sensing of intestinal gluconeogenesis is a mechanistic link in the diminution of food intake induced by diet protein. *Cell Metabolism* 2, 321–329.
- Montell, C., and Rubin, G.M. (1989). Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2, 1313–1323.
- Morley, J.E., Alshaher, M.M., Farr, S.A., Flood, J.F., and Kumar, V.B. (1999). Leptin and neuropeptide Y (NPY) modulate nitric oxide synthase: further evidence for a role of nitric oxide in feeding. *Peptides* 20, 595–600.
- Morley, J.E., Farr, S.A., Sell, R.L., Hileman, S.M., and Banks, W.A. (2011). Nitric oxide is a central component in neuropeptide regulation of appetite. *Peptides* 32, 776–780.
- Morton, G.J., Meek, T.H., and Schwartz, M.W. (2014). Neurobiology of food intake in health and disease. *Nature Reviews. Neuroscience* 15, 367–378.
- Mounien, L., Bizet, P., Boutelet, I., Vaudry, H., and Jégou, S. (2005). Expression of melanocortin MC3 and MC4 receptor mrnas by neuropeptide Y neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* 82, 164–170.
- Mountjoy, P.D., and Rutter, G.A. (2007). Glucose sensing by hypothalamic neurones and pancreatic islet cells: AMPle evidence for common mechanisms? *Experimental Physiology* 92, 311–319.
- Mueckler, M., and Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular Aspects of Medicine* 34, 121–138.
- Mullier, A., Bouret, S.G., Prevot, V., and Dehouck, B. (2010). Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *Journal of Comparative Neurology* 518, 943–962.
- Murai, Y., Ishibashi, H., Koyama, S., and Akaike, N. (1997). Ca²⁺-activated K⁺ currents in rat locus coeruleus neurons induced by experimental ischemia, anoxia, and hypoglycemia. *Journal of Neurophysiology* 78, 2674–2681.

- Muroya, S., Yada, T., Shioda, S., and Takigawa, M. (1999). Glucose-sensitive neurons in the rat arcuate nucleus contain neuropeptide Y. *264*, 113–116.
- Muroya, S., Funahashi, H., Yamanaka, A., Kohno, D., Uramura, K., Nambu, T., Shibahara, M., Kuramochi, M., Takigawa, M., Yanagisawa, M., et al. (2004). Orexins (hypocretins) directly interact with neuropeptide Y, POMC and glucose-responsive neurons to regulate Ca²⁺ signaling in a reciprocal manner to leptin: orexigenic neuronal pathways in the mediobasal hypothalamus. *The European Journal of Neuroscience* *19*, 1524–1534.
- Murphy, B.A., Fioramonti, X., Jochnowitz, N., Fakira, K., Gagen, K., Contie, S., Lorsignol, A., Penicaud, L., Martin, W.J., and Routh, V.H. (2009a). Fasting enhances the response of arcuate neuropeptide Y-glucose-inhibited neurons to decreased extracellular glucose. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* *296*, C746–C756.
- Murphy, B.A., Fakira, K.A., Song, Z., Beuve, A., and Routh, V.H. (2009b). AMP-activated protein kinase and nitric oxide regulate the glucose sensitivity of ventromedial hypothalamic glucose-inhibited neurons. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* *297*, C750–C758.
- Myers, M.G., and Olson, D.P. (2012). Central nervous system control of metabolism. *Nature* *491*, 357–363.
- Nakano, Y., Oomura, Y., Lénárd, L., Nishino, H., Aou, S., Yamamoto, T., and Aoyagi, K. (1986). Feeding-related activity of glucose- and morphine-sensitive neurons in the monkey amygdala. *Brain Research* *399*, 167–172.
- Naufahu, J., Cunliffe, A.D., and Murray, J.F. (2013). The roles of melanin-concentrating hormone in energy balance and reproductive function: Are they connected. *Reproduction* *146*.
- Netchiporouk, L.I., Shram, N.F., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., and Cespuglio, R. (1996). In vivo brain glucose measurements: differential normal pulse voltammetry with enzyme-modified carbon fiber microelectrodes. *Analytical Chemistry* *68*, 4358–4364.
- Nguyen, A.D., Mitchell, N.F., Lin, S., Macia, L., Yulyaningsih, E., Baldock, P.A., Enriquez, R.F., Zhang, L., Shi, Y.C., Zolotukhin, S., et al. (2012). Y1 and Y5 receptors are both required for the regulation of food intake and energy homeostasis in mice. *PLoS ONE* *7*.
- Nilius, B., and Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biology* *12*, 218.
- Obici, S., Feng, Z., Morgan, K., Stein, D., Karkanias, G., and Rossetti, L. (2002). Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* *51*, 271–275.
- Odell, A.F., Scott, J.L., and Van Helden, D.F. (2005). Epidermal growth factor induces tyrosine phosphorylation, membrane insertion, and activation of transient receptor potential channel 4. *Journal of Biological Chemistry* *280*, 37974–37987.
- Oomura, Y., Ono, T., Ooyama, H., and Wayner, M.J. (1969). Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. *Nature* *222*, 282–284.
- Orellana, J.A., Sáez, P.J., Cortés-campos, C., Elizondo, R.J., Shoji, K.F., Contreras-Duarte, S., Figueroa, V., Velarde, V., Jiang, J.X., Nualart, F., et al. (2012). Glucose increases intracellular free Ca²⁺ in tanycytes via ATP released through connexin 43 hemichannels. *GLIA* *60*, 53–68.
- Pałasz, A., Krzystanek, M., Worthington, J., Czajkowska, B., Kostro, K., Wiaderkiewicz, R., and Bajor, G. (2012). Nesfatin-1, a unique regulatory neuropeptide of the brain. *Neuropeptides* *46*, 105–112.
- Pardal, R., and López-Barneo, J. (2002). Carotid body thin slices: Responses of glomus cells to hypoxia and K⁺-channel blockers. *Respiratory Physiology and Neurobiology* *132*, 69–79.

- Parton, L.E., Ye, C.P., Coppari, R., Enriori, P.J., Choi, B., Zhang, C.-Y., Xu, C., Vianna, C.R., Balthasar, N., Lee, C.E., et al. (2007). Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* *449*, 228–232.
- Pedersen, S.F., Owsianik, G., and Nilius, B. (2005). TRP channels: An overview. *Cell Calcium* *38*, 233–252.
- Pellerin, L. (2005). How astrocytes feed hungry neurons. *Molecular Neurobiology* *32*, 59–72.
- Pellerin, L., and Magistretti, P.J. (2012). Sweet sixteen for ANLS. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* *32*, 1152–1166.
- Peng, Z., and Arendshorst, W.J. (2008). Activation of phospholipase C γ 1 protects renal arteriolar VSMCs from H₂O₂-induced cell death. *Kidney and Blood Pressure Research* *31*, 1–9.
- Pénicaud, L., Thompson, D.A., and Le Magnen, J. (1986). Effects of 2-deoxy-D-glucose on food and water intake and body temperature in rats. *Physiology & Behavior* *36*, 431–435.
- Peruzzo, B., Pastor, F.E., Blázquez, J.L., Schöbitz, K., Peláez, B., Amat, P., and Rodríguez, E.M. (2000). A second look at the barriers of the medial basal hypothalamus. *Experimental Brain Research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation Cerebrale* *132*, 10–26.
- Pi, J., and Collins, S. (2010). Reactive oxygen species and uncoupling protein 2 in pancreatic β -cell function. *Diabetes, Obesity & Metabolism* *12 Suppl 2*, 141–148.
- Pi, J., Bai, Y., Daniel, K.W., Liu, D., Lyght, O., Edelstein, D., Brownlee, M., Corkey, B.E., and Collins, S. (2009). Persistent oxidative stress due to absence of uncoupling protein 2 associated with impaired pancreatic β -cell function. *Endocrinology* *150*, 3040–3048.
- Pi, J., Zhang, Q., Fu, J., Woods, C.G., Hou, Y., Corkey, B.E., Collins, S., and Andersen, M.E. (2010). ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function. *Toxicology and Applied Pharmacology* *244*, 77–83.
- Picard, A., Moulle, V.S., Le Foll, C., Cansell, C., Veret, J., Coant, N., Le Stunff, H., Migrenne, S., Luquet, S., Cruciani-Guglielmacci, C., et al. (2014). Physiological and pathophysiological implications of lipid sensing in the brain. *Diabetes Obesity & Metabolism* *16 Suppl 1*, 49–55.
- Pierre, K., and Pellerin, L. (2005). Monocarboxylate transporters in the central nervous system: Distribution, regulation and function. *Journal of Neurochemistry* *94*, 1–14.
- Pinto, S., Roseberry, A.G., Liu, H., Diano, S., Shanabrough, M., Cai, X., Friedman, J.M., and Horvath, T.L. (2004). Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science (New York, N.Y.)* *304*, 110–115.
- Poteser, M., Graziani, A., Rosker, C., Eder, P., Derler, I., Kahr, H., Zhu, M.X., Romanin, C., and Groschner, K. (2006). TRPC3 and TRPC4 associate to form a redox-sensitive cation channel. Evidence for expression of native TRPC3-TRPC4 heteromeric channels in endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* *281*, 13588–13595.
- Prasad, S., Sajja, R.K., Naik, P., and Cucullo, L. (2014). Diabetes Mellitus and Blood-Brain Barrier Dysfunction: An Overview. *J Pharmacovigil* *2*, 125.
- Prebil, M., Vardjan, N., Jensen, J., Zorec, R., and Kreft, M. (2011). Dynamic monitoring of cytosolic glucose in single astrocytes. *GLIA* *59*, 903–913.
- Qiu, J., Fang, Y., Rønnekleiv, O.K., and Kelly, M.J. (2010). Leptin excites proopiomelanocortin neurons via activation of TRPC channels. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* *30*, 1560–1565.

- Qiu, J., Fang, Y., Bosch, M.A., Rønnekleiv, O.K., and Kelly, M.J. (2011). Guinea pig kisspeptin neurons are depolarized by leptin via activation of TRPC channels. *Endocrinology* *152*, 1503–1514.
- Qiu, J., Zhang, C., Borgquist, A., Nestor, C.C., Smith, A.W., Bosch, M.A., Ku, S., Wagner, E.J., Rønnekleiv, O.K., and Kelly, M.J. (2014). Insulin excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons via activation of canonical transient receptor potential channels. *Cell Metabolism* *19*, 682–693.
- Do Rego, J.-C., Orta, M.-H., Leprince, J., Tonon, M.-C., Vaudry, H., and Costentin, J. (2007). Pharmacological characterization of the receptor mediating the anorexigenic action of the octadecaneuropeptide: evidence for an endozepinergic tone regulating food intake. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* *32*, 1641–1648.
- Richter, J.M., Schaefer, M., and Hill, K. (2014). Riluzole activates TRPC5 channels independently of PLC activity. *British Journal of Pharmacology* *171*, 158–170.
- Riediger, T. (2012). The receptive function of hypothalamic and brainstem centres to hormonal and nutrient signals affecting energy balance. *Proceedings of the Nutrition Society* *71*, 463–477.
- Roland, A. V, and Moenter, S.M. (2011). Glucosensing by GnRH neurons: inhibition by androgens and involvement of AMP-activated protein kinase. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* *25*, 847–858.
- Rossi, M., Kim, M.S., Morgan, D.G.A., Small, C.J., Edwards, C.M.B., Sunter, D., Abusnana, S., Goldstone, A.P., Russell, S.H., Stanley, S.A., 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.
- Routh, V.H. (2002). Glucose-sensing neurons: are they physiologically relevant? *Physiology & Behavior* *76*, 403–413.
- Routh, V.H. (2010). Glucose sensing neurons in the ventromedial hypothalamus. *Sensors (Basel, Switzerland)* *10*, 9002–9025.
- Saberi, M., Bohland, M., and Donovan, C.M. (2008). The locus for hypoglycemic detection shifts with the rate of fall in glycemia: The role of portal-superior mesenteric vein glucose sensing. *Diabetes* *57*, 1380–1386.
- Sakaguchi, T., and Bray, G.A. (1987). The effect of intrahypothalamic injections of glucose on sympathetic efferent firing rate. *Brain Research Bulletin* *18*, 591–595.
- Salido, G.M., Jardín, I., and Rosado, J.A. (2011). The TRPC ion channels: Association with orai1 and STIM1 proteins and participation in capacitative and non-capacitative calcium entry. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 413–433.
- Sánchez-Lasheras, C., Christine Könnner, A., and Brüning, J.C. (2010). Integrative neurobiology of energy homeostasis-neurocircuits, signals and mediators. *Frontiers in Neuroendocrinology* *31*, 4–15.
- Sanders, N.M., Dunn-Meynell, A.A., and Levin, B.E. (2004). Third Ventricular Alloxan Reversibly Impairs Glucose Counterregulatory Responses. *Diabetes* *53*, 1230–1236.
- Sandoval, D.A., Bagnol, D., Woods, S.C., D'Alessio, D.A., and Seeley, R.J. (2008). Arcuate glucagon-like peptide 1 receptors regulate glucose homeostasis but not food intake. *Diabetes* *57*, 2046–2054.
- Schaeffer, M., Langlet, F., Lafont, C., Molino, F., Hodson, D.J., Roux, T., Lamarque, L., Verdié, P., Bourrier, E., Dehouck, B., et al. (2013). Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 1512–1517.

- Schindl, R., Frischauf, I., Kahr, H., Fritsch, R., Krenn, M., Derndl, A., Vales, E., Muik, M., Derler, I., Groschner, K., et al. (2008). The first ankyrin-like repeat is the minimum indispensable key structure for functional assembly of homo- and heteromeric TRPC4/TRPC5 channels. *Cell Calcium* *43*, 260–269.
- Schneeberger, M., Gomis, R., and Claret, M. (2014). Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *Journal of Endocrinology* *220*.
- Seo, K., Rainer, P.P., Lee, D.I., Hao, S., Bedja, D., Birnbaumer, L., Cingolani, O.H., and Kass, D.A. (2014). Hyperactive adverse mechanical stress responses in dystrophic heart are coupled to transient receptor potential canonical 6 and blocked by cgmp-protein kinase g modulation. *Circulation Research* *114*, 823–832.
- Sheng, Z., Santiago, A.M., Thomas, M.P., and Routh, V.H. (2014). Metabolic regulation of lateral hypothalamic glucose-inhibited orexin neurons may influence midbrain reward neurocircuitry. *Molecular and Cellular Neurosciences* *62*, 30–41.
- Shimizu, S., Takahashi, N., and Mori, Y. (2014). TRPs as chemosensors (ROS, RNS, RCS, gasotransmitters). *Handbook of Experimental Pharmacology* *223*, 767–794.
- Silver, I.A., and Erecińska, M. (1994). Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* *14*, 5068–5076.
- Silver, I.A., and Erecińska, M. (1998). Glucose-induced intracellular ion changes in sugar-sensitive hypothalamic neurons. *Journal of Neurophysiology* *79*, 1733–1745.
- Simpson, I.A., Dwyer, D., Malide, D., Moley, K.H., Travis, A., and Vannucci, S.J. (2008). The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* *295*, E242–E253.
- Sinkins, W.G., Estacion, M., and Schilling, W.P. (1998). Functional expression of TrpC1: a human homologue of the *Drosophila* Trp channel. *The Biochemical Journal* *331 (Pt 1)*, 331–339.
- Sohn, J.W., Xu, Y., Jones, J.E., Wickman, K., Williams, K.W., and Elmquist, J.K. (2011). Serotonin 2C receptor activates a distinct population of arcuate pro-opiomelanocortin neurons via TRPC channels. *Neuron* *71*, 488–497.
- Song, Z., and Routh, V.H. (2005). Differential effects of glucose and lactate on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes* *54*, 15–22.
- Song, M.Y., Makino, A., and Yuan, J.X.-J. (2011). Role of reactive oxygen species and redox in regulating the function of transient receptor potential channels. *Antioxidants & Redox Signaling* *15*, 1549–1565.
- Song, Z., Levin, B.E., McArdle, J.J., Bakhos, N., and Routh, V.H. (2001). Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes* *50*, 2673–2681.
- Song, Z., Levin, B.E., Stevens, W., and Sladek, C.D. (2014). Supraoptic oxytocin and vasopressin neurons function as glucose and metabolic sensors. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* *306*, R447–R456.
- Souza, L.B. de, and Ambudkar, I.S. (2014). Trafficking mechanisms and regulation of TRPC Channels. *Cell Calcium*.
- Spanswick, D., Smith, M.A., Mirshamsi, S., Routh, V.H., and Ashford, M.L. (2000). Insulin activates ATP-sensitive K⁺ channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. *Nature Neuroscience* *3*, 757–758.

- Stanley, B.G., and Leibowitz, S.F. (1984). Neuropeptide Y: Stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. *Life Sciences* 35, 2635–2642.
- Stanley, S., Domingos, A.I., Kelly, L., Garfield, A., Damanpour, S., Heisler, L., and Friedman, J. (2013). Profiling of glucose-sensing neurons reveals that ghrelin neurons are activated by hypoglycemia. *Cell Metabolism* 18, 596–607.
- Steinbusch, L., Labouèbe, G., and Thorens, B. (2015). Brain glucose sensing in homeostatic and hedonic regulation. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*.
- Stengel, A., Wang, L., Goebel-Stengel, M., and Taché, Y. (2011). Centrally injected kisspeptin reduces food intake by increasing meal intervals in mice. *Neuroreport* 22, 253–257.
- Sternson, S.M., Shepherd, G.M.G., and Friedman, J.M. (2005). Topographic mapping of VMH --> arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nature Neuroscience* 8, 1356–1363.
- Strübing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., and Clapham, D.E. (2001). TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* 29, 645–655.
- Strübing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., and Clapham, D.E. (2003). Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *Journal of Biological Chemistry* 278, 39014–39019.
- Sung, T.S., Kim, M.J., Hong, S., Jeon, J.P., Kim, B.J., Jeon, J.H., Kim, S.J., and So, I. (2009). Functional characteristics of TRPC4 channels expressed in HEK 293 cells. *Molecules and Cells* 27, 167–173.
- Suzuki, Y., Zhang, H., Saito, N., Kojima, I., Urano, T., and Mogami, H. (2006). Glucagon-like peptide 1 activates protein kinase C through Ca²⁺-dependent activation of phospholipase C in insulin-secreting cells. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 28499–28507.
- Taïb, B., Bouyakdan, K., Hryhorczuk, C., Rodaros, D., Fulton, S., and Alquier, T. (2013). Glucose regulates hypothalamic long-chain fatty acid metabolism via AMP-activated kinase (AMPK) in neurons and astrocytes. *Journal of Biological Chemistry* 288, 37216–37229.
- Takahashi, N., Kozai, D., and Mori, Y. (2012). TRP channels: Sensors and transducers of gasotransmitter signals. *Frontiers in Physiology* 3 AUG.
- Tang, J., Lin, Y., Zhang, Z., Tikunova, S., Birnbaumer, L., and Zhu, M.X. (2001). Identification of Common Binding Sites for Calmodulin and Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors on the Carboxyl Termini of Trp Channels. *Journal of Biological Chemistry* 276, 21303–21310.
- Tesfaye, N., and Seaquist, E.R. (2010). Neuroendocrine responses to hypoglycemia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1212, 12–28.
- Thorens, B. (2011). Brain glucose sensing and neural regulation of insulin and glucagon secretion. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 13, 82–88.
- Thorens, B. (2015). GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia* 58, 221–232.
- Tong, Q., Ye, C., McCrimmon, R.J., Dhillon, H., Choi, B., Kramer, M.D., Yu, J., Yang, Z., Christiansen, L.M., Lee, C.E., et al. (2007). Synaptic Glutamate Release by Ventromedial Hypothalamic Neurons Is Part of the Neurocircuitry that Prevents Hypoglycemia. *Cell Metabolism* 5, 383–393.
- Tong, Q., Ye, C.-P., Jones, J.E., Elmquist, J.K., and Lowell, B.B. (2008). Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. *Nature Neuroscience* 11, 998–1000.
- Tonon, M.C., Desy, L., Nicolas, P., Vaudry, H., and Pelletier, G. (1990). Immunocytochemical localization of the endogenous benzodiazepine ligand octadecaneuropeptide (ODN) in the rat brain. *Neuropeptides* 15, 17–24.

- Tucker, K., Cho, S., Thiebaud, N., Henderson, M.X., and Fadool, D.A. (2013). Glucose sensitivity of mouse olfactory bulb neurons is conveyed by a voltage-gated potassium channel. *The Journal of Physiology* 591, 2541–2561.
- Turton, M.D., O’Shea, D., Gunn, I., Beak, S.A., Edwards, C.M., Meeran, K., Choi, S.J., Taylor, G.M., Heath, M.M., Lambert, P.D., et al. (1996). A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 379, 69–72.
- Venkatachalam, K., Zheng, F., and Gill, D.L. (2003). Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 278, 29031–29040.
- Vennekens, R., Menigoz, A., and Nilius, B. (2012). TRPs in the brain. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 163, 27–64.
- Venner, A., Karnani, M.M., Gonzalez, J.A., Jensen, L.T., Fugger, L., and Burdakov, D. (2011). Orexin neurons as conditional glucosensors: paradoxical regulation of sugar sensing by intracellular fuels. *The Journal of Physiology* 589, 5701–5708.
- Vong, L., Ye, C., Yang, Z., Choi, B., Chua, S., and Lowell, B.B. (2011). Leptin Action on GABAergic Neurons Prevents Obesity and Reduces Inhibitory Tone to POMC Neurons. *Neuron* 71, 142–154.
- De Vries, M.G., Arseneau, L.M., Lawson, M.E., and Beverly, J.L. (2003). Extracellular glucose in rat ventromedial hypothalamus during acute and recurrent hypoglycemia. *Diabetes* 52, 2767–2773.
- Wakamori, M., and Sorimachi, M. (2004). Properties of native P2X receptors in large multipolar neurons dissociated from rat hypothalamic arcuate nucleus. *Brain Research* 1005, 51–59.
- Wang, R., Liu, X., Hentges, S.T., Dunn-Meynell, A.A., Levin, B.E., Wang, W., and Routh, V.H. (2004). The regulation of glucose-excited neurons in the hypothalamic arcuate nucleus by glucose and feeding-relevant peptides. *Diabetes* 53, 1959–1965.
- Wang, R., Cruciani-Guglielmacci, C., Migrenne, S., Magnan, C., Cotero, V.E., and Routh, V.H. (2006). Effects of oleic acid on distinct populations of neurons in the hypothalamic arcuate nucleus are dependent on extracellular glucose levels. *Journal of Neurophysiology* 95, 1491–1498.
- Wen, Y., Liu, K., Yang, H., Li, Y., Lan, H., Liu, Y., Zhang, X., and Yi, T. (2014). A highly sensitive ratiometric fluorescent probe for the detection of cytoplasmic and nuclear hydrogen peroxide. *Analytical Chemistry* 86, 9970–9976.
- Williams, R.H., and Burdakov, D. (2009). Silencing of ventromedial hypothalamic neurons by glucose-stimulated K⁺ currents. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 458, 777–783.
- Williams, R.H., Alexopoulos, H., Jensen, L.T., Fugger, L., and Burdakov, D. (2008). Adaptive sugar sensors in hypothalamic feeding circuits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 11975–11980.
- Wren, A.M., Small, C.J., Abbott, C.R., Jethwa, P.H., Kennedy, A.R., Murphy, K.G., Stanley, S.A., Zollner, A.N., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2002). Hypothalamic actions of neuromedin U. *Endocrinology* 143, 4227–4234.
- Wuensch, T., Thilo, F., Krueger, K., Scholze, A., Ristow, M., and Tepel, M. (2010). High glucose-induced oxidative stress increases transient receptor potential channel expression in human monocytes. *Diabetes* 59, 844–849.

- Wyss, M.T., Jolivet, R., Buck, A., Magistretti, P.J., and Weber, B. (2011). In vivo evidence for lactate as a neuronal energy source. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* *31*, 7477–7485.
- Xu, A.W., Kaelin, C.B., Morton, G.J., Ogimoto, K., Stanhope, K., Graham, J., Baskin, D.G., Havel, P., Schwartz, M.W., and Barsh, G.S. (2005). Effects of hypothalamic neurodegeneration on energy balance. *PLoS Biology* *3*, 1–9.
- Xu, S.-Z., Sukumar, P., Zeng, F., Li, J., Jairaman, A., English, A., Naylor, J., Ciurtin, C., Majeed, Y., Milligan, C.J., et al. (2008). TRPC channel activation by extracellular thioredoxin. *Nature* *451*, 69–72.
- Xu, Y., Berglund, E.D., Sohn, J.-W., Holland, W.L., Chuang, J.-C., Fukuda, M., Rossi, J., Williams, K.W., Jones, J.E., Zigman, J.M., et al. (2010). 5-HT₂CRs expressed by pro-opiomelanocortin neurons regulate insulin sensitivity in liver. *Nature Neuroscience* *13*, 1457–1459.
- Yang, X.J., Kow, L.M., Funabashi, T., and Mobbs, C. V (1999). Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms. *Diabetes* *48*, 1763–1772.
- 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.
- Yoshida, T., Inoue, R., Morii, T., Takahashi, N., Yamamoto, S., Hara, Y., Tominaga, M., Shimizu, S., Sato, Y., and Mori, Y. (2006). Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nature Chemical Biology* *2*, 596–607.
- Zagranichnaya, T.K., Wu, X., and Villereal, M.L. (2005). Endogenous TRPC1, TRPC3, and TRPC7 proteins combine to form native store-operated channels in HEK-293 cells. *Journal of Biological Chemistry* *280*, 29559–29569.
- Zawar, C., Plant, T.D., Schirra, C., Konnerth, A., and Neumcke, B. (1999). Cell-type specific expression of ATP-sensitive potassium channels in the rat hippocampus. *The Journal of Physiology* *514* (Pt 2, 327–341.
- Zhan, C., Zhou, J., Feng, Q., Zhang, J.-E., Lin, S., Bao, J., Wu, P., and Luo, M. (2013). Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* *33*, 3624–3632.
- Zhang, M., Buttigieg, J., and Nurse, C.A. (2007). Neurotransmitter mechanisms mediating low-glucose signalling in cocultures and fresh tissue slices of rat carotid body. *The Journal of Physiology* *578*, 735–750.
- Zhou, L., Podolsky, N., Sang, Z., Ding, Y., Fan, X., Tong, Q., Levin, B.E., and McCrimmon, R.J. (2010). The medial amygdalar nucleus: a novel glucose-sensing region that modulates the counterregulatory response to hypoglycemia. *Diabetes* *59*, 2646–2652.
- Zhou, Q., Liu, C., Liu, W., Zhang, H., Zhang, R., Liu, J., Zhang, J., Xu, C., Liu, L., Huang, S., et al. (2015). Rotenone induction of hydrogen peroxide inhibits mTOR-mediated S6K1 and 4E-BP1/eIF4E pathways, leading to neuronal apoptosis. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology* *143*, 81–96.
- Zhu, Y., Lu, Y., Qu, C., Miller, M., Tian, J., Thakur, D.P., Zhu, J., Deng, Z., Hu, X., Wu, M., et al. (2015). Identification and optimization of 2-aminobenzimidazole derivatives as novel inhibitors of TRPC4 and TRPC5 channels. *British Journal of Pharmacology* *172*, 3495–3509.