



HAL
open science

Role du système neuropeptidergique 26RFa/GPR103 dans la régulation de la glycémie dans un modèle murin d'obésité et d'hyperglycémie chronique.

Marie-Anne Le Sollic

► To cite this version:

Marie-Anne Le Sollic. Role du système neuropeptidergique 26RFa/GPR103 dans la régulation de la glycémie dans un modèle murin d'obésité et d'hyperglycémie chronique.. Endocrinologie et métabolisme. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMR089 . tel-03696523

HAL Id: tel-03696523

<https://theses.hal.science/tel-03696523>

Submitted on 16 Jun 2022

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Role du système neuropeptidergique 26RFa/GPR103 dans la régulation de la glycémie dans un modèle murin d'obésité et d'hyperglycémie chronique.

**Présentée et soutenue par
MARIE-ANNE LE SOLLIEC**

**Thèse soutenue le 13/12/2021
devant le jury composé de**

MME NATACHA GERMAIN	PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., UNIVERSITE SAINT ETIENNE JEAN MONNET	Rapporteur du jury
MME CAROLE ROVERE	CHARGE DE RECHERCHE, UNIVERSITE NICE SOPHIA ANTIPOLIS	Rapporteur du jury
M. ARNAUD ARABO	INGENIEUR DE RECHERCHE RF, Université de Rouen Normandie	Membre du jury
M. MOISE COEFFIER	PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., Université de Rouen Normandie	Membre du jury
MME ODILE VILTART	MAITRE DE CONFERENCES HDR, UNIVERSITE PARIS 5 UNIVERSITE PARIS DESC	Membre du jury
M. GAETAN PREVOST	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

**Thèse dirigée par GAETAN PREVOST, DIFFERENCIATION ET COMMUNICATION
NEURONALE ET NEUROENDOCRINE**

À ma grand-mère,

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à **l'ensemble des membres du jury** pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Je remercie aussi le **Pr. Natacha Germain** et le **Dr. Carole Rovère** pour avoir accepté d'être les rapportrices de cette thèse et pour leurs expertises. Je remercie également le **Dr. Odile Viltart** pour avoir suivi mes travaux de thèse lors de mes différents CSI et pour avoir une nouvelle fois accepté d'apporter son expertise en tant qu'examinatrice dans ce jury de thèse. Enfin je remercie le **Pr. Moïse Coëffier** pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse ainsi que pour tout ce qu'il m'a apporté lors de mes débuts dans la recherche durant mes différents stages de Master. Je remercie également les membres de mon CSI : **Dr. Laurent Poulain**, **Dr. Julie Kerr-Conte** et le **Dr. Agnès Cottalorda**. Merci pour avoir accepté de suivre mes travaux de thèse durant ces trois années et pour tous vos conseils.

Je remercie également les organismes financeurs de cette thèse notamment **la Région Normandie** qui a accepté de financer ces trois années de recherches ainsi que la **Société Française du Diabète** pour nous avoir permis d'obtenir un financement afin de mener à bien mes projets de thèse. Je remercie également la **Société de Neuroendocrinologie (SNE)** pour avoir financé mon voyage au 43^e congrès de la SNE ainsi que mon voyage au *Max Planck Institute for Metabolism Research*. Je remercie par ailleurs le **Dr. Sophie Stéculorum** pour avoir accepté de m'accueillir dans son laboratoire durant ces quelques jours. Je remercie aussi la **Société Française d'Endocrinologie (SFE)** pour avoir financé mon inscription et mon voyage au 37^e congrès de la SFE.

Je remercie le **Dr. Youssef Anouar**, directeur du laboratoire DC2N pour m'avoir accueillie dans son unité.

Je remercie chaleureusement mon directeur de thèse, le **Pr. Gaëtan Prévost**. Merci à vous de m'avoir permis de faire ce projet de thèse et pour m'avoir fait confiance. Merci pour ces trois années que vous avez passées à diriger cette thèse, à me conseiller, me rassurer dans les moments de doutes. Merci, pour avoir m'avoir transmis toutes ces connaissances et pour avoir apporté votre expertise durant l'ensemble de mon doctorat. Merci également pour le temps que vous avez passé à relire ce manuscrit en le rendant à chaque fois meilleur.

Un très grand merci à mon co-encadrant de thèse, le **Dr. Arnaud Arabo**. Merci pour m'avoir fait confiance, pour tous tes conseils, pour m'avoir rassurée dans mes moments de stress et de doute. Merci pour m'avoir consacré du temps (beaucoup de temps...) alors que tu avais déjà beaucoup à faire avec la gestion de l'animalerie. Merci pour toutes ces heures passées à l'animalerie en manip et pour ta bonne humeur en réunion.

Je remercie aussi chaleureusement le **Dr. Nicolas Chartrel** pour m'avoir acceptée dans son équipe. Merci pour tous ce que tu m'as apportée. Merci d'avoir contribué à cette thèse en apportant ton expertise. Merci pour tes mots d'encouragements chaque matin qui me donnaient toujours la patate. Merci pour m'avoir rassuré dans les moments de doute. Merci pour ta bonne humeur et ta positive attitude !

Merci à tout le **personnel de l'animalerie**, Stéphane, Garris, Domi, et David pour vous être occupé de mes animaux et pour tous ce que vous réalisez chaque jour pour que le service fonctionne. Et merci à toute l'équipe technique du laboratoire notamment Hind Berrahmoune pour avoir réalisé une partie de mes qPCR.

Merci au **Dr. Alexandre Benani** et **Emmanuelle Nedelec** pour avoir réalisé l'intégralité de nos dosages plasmatiques d'insuline (Et il n'y en avait pas qu'un peu...). Merci pour avoir su déchiffrer mon écriture, et merci pour votre professionnalisme !

Je remercie **Jérôme Leprince** et **Benjamin Lefranc** pour tout le 26RFa que vous avez synthétisé pour moi et pour m'avoir permis de faire toute mes manip. Sans le 26RFa, je n'aurais pas fait grand-chose.

Merci au **Dr. Marie Picot**. Merci pour ta gentillesse, ton expertise. Merci pour ces longues heures que l'on a passé à discuter de mon avenir, merci pour tous tes précieux conseils. Et surtout merci pour cette semaine que l'on a passé toutes les deux à Cologne.

Je tenais aussi à remercier particulièrement le **Pr. Sergueï Fetissov**. Merci pour m'avoir permis de faire mes premiers pas dans la recherche en m'acceptant en stage de L3. Merci pour m'avoir permis de poursuivre en m'acceptant en stage de M1 et de M2. Merci pour m'avoir permis de rester dans le domaine de la recherche en tant que technicienne de laboratoire chez Targedys alors que je n'avais pas de thèse à l'issue de mon Master. Merci pour m'avoir transmis l'offre de thèse qui m'a permis de réaliser ce doctorat et pour avoir soutenu ma candidature.

Un immense merci à **Julie Maucotel**. Julie, que dire... Merci pour tout ! Merci pour ta gentillesse inégalée, ta bonne humeur, ta disponibilité... Merci pour être qui tu es. Surtout ne change jamais, tu es une fille en or ! Merci pour toutes ces heures passées en manip in vivo, sans toi elles m'auraient paru interminables... Merci pour tout ce que tu as fait pour moi. Je ne pourrais jamais te remercier assez pour tout ce que tu as fait pour moi. Je te suis extrêmement reconnaissante !

Merci à **Saloua** ! La meilleure technicienne sans aucun doute ! Merci pour tous ce que tu as fait pour le projet. Mais surtout merci pour ta gentillesse, ta rigueur, ton professionnalisme, ton franc-parler. Merci pour m'avoir épaulée durant certaines manip. C'est un vrai plaisir de travailler avec toi, vraiment ! Tu anticipe tout, tu prends les devants même sur des manip que tu ne maîtrise pas. L'équipe a une chance énorme de te compter parmi elle. Un grand merci !!

Merci aussi à tous les autres membres de l'équipe, **Emilie**, **Mouna** (merci de m'avoir transmis ton savoir, tes astuces et pour les kinder bueno), mais aussi Myriam et Yamina.

Et merci aussi à toute l'équipe surréale et particulièrement **Céline** et **Sylvie** pour leur bonne humeur et pour tous les goûters que l'on a pu faire durant ces 3 années (même si le covid nous a un peu embêté).

Un immense merci à **Manue** ! Que dire... Les deux inséparables. On a commencé ensemble et à l'image de ces trois années, nous allons soutenir ensemble. Je pense que c'est sans surprise que je peux t'annoncer que ces 3 années n'auraient pas été pareilles sans toi ! Tu étais mon binôme, mon repère dans ce labo. Merci pour avoir été là dans les bons et les mauvais moments ! Merci pour toutes ces fous rires ! Merci pour ta bonne humeur, ta naïveté adorable. Tu es une personne formidable, tu apportes de la bonne humeur partout où tu vas, surtout ne change pas ! Et aussi, un immense merci pour avoir été ma secrétaire personnelle et pour me rappeler toujours les deadlines et les impératifs car bin.... Je n'ai pas de tête... Qu'est-ce que j'aurai fait sans toi ?! Merci pour tout !

Merci **aux filles du bureau**. Merci à **Mélodie**, pour ton calme, ta gentillesse, pour toute nos discussions, pour tous nos fous rires. Merci aussi **Marion** ! Merci pour avoir été là quand je n'allais pas bien. Merci pour tous tes précieux conseils. Merci pour tous ces fous rires. Merci pour tous ces délires dans le bureau ! Merci aussi à **Cassandra**, même si tu as intégré le bureau tardivement, merci pour ta bonne humeur ! Les filles, sans vous, cette thèse n'aurait pas été pareil. Vous avez contribué à la bonne ambiance du bureau. Merci pour avoir été là !!

Je remercie évidemment tous les autres membres du laboratoire, trop nombreux pour être cité un à un. Une pensée particulière à **Marjo, Catherine, Dorte, Nathalie** et mes co-doctorants notamment **Alex, Lucie, Inès, Cédric, Fanny, Lisa, Amine et Mickael**. Merci pour tous les échanges que l'on a eus, les fous rires avec certains, les longues discussions philosophiques avec d'autres. Merci pour avoir participé à la bonne ambiance du laboratoire.

Merci à tous les membres de mon anciens **laboratoire l'U1073** et surtout merci à **Manon, Asma, Marie, Charlène, Pauline et Camille** pour m'avoir encouragée notamment durant ces derniers mois.

Je remercie aussi mes amis ainsi que la petite bande d'**escrocs** qui se reconnaîtront. Si on nous avait dit en 2012 quand on a commencé l'IUT ensemble qu'on en serait là aujourd'hui, je pense qu'on aurait bien rigolé !

Voilà, j'espère n'avoir oublié personne. Merci à vous tous car vous avez tous participé à la réussite de cette thèse. Merci pour avoir permis que cette thèse soit à la fois épanouissante sur le plan professionnel et personnel. Merci pour avoir partagé ces trois années avec moi !

Enfin mes derniers remerciements vont à mes proches. **Baptiste**, je te remercie tellement ! Merci pour m'apporter tous ce que tu m'apporte au quotidien ! Merci pour m'avoir toujours soutenue, pour me donner de la force chaque jour. Un grand merci aussi pour me supporter au quotidien et surtout durant ces derniers mois. Merci pour tous ce que tu fais pour moi ! Merci de faire de moi une personne meilleure chaque jour !

Un immense merci à **mes parents** sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Merci pour m'avoir donné le goût de la biologie dès petite. Merci pour m'avoir toujours encouragée, soutenue, pour m'avoir toujours donnée les moyens de faire les études qui me plaisait. Merci pour avoir été là dans les moments de doute. Je pense que je ne vous remercierai jamais assez pour tous ce que vous avez fait et qui m'ont permis d'en être là aujourd'hui.

Enfin, une pensée toute particulière à ma grand-mère. Merci **Mamie** pour tous ce que tu as fait pour moi. Tu vois, moi aussi j'ai écrit un livre. Je sais que tu aurais voulu le lire et me voir docteure mais je sais aussi que de là où tu es, tu es fière de moi.

RESUME

Le neuropeptide 26RFa ainsi que son récepteur GPR103 constituent un système peptidergique impliqué dans la régulation de la glycémie. En effet, il a récemment été montré que le 26RFa exerce une activité de type incrétine. Le 26RFa est sécrété par le duodénum après une charge orale en glucose et active directement son récepteur pancréatique afin de stimuler la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Parallèlement, le 26RFa augmente la sensibilité à l'insuline. Enfin, les dernières études de notre laboratoire ont montré que le 26RFa était aussi impliqué dans la régulation centrale de la glycémie. En effet, il a été mis en évidence que ce peptide constituait un des relais de l'insuline centrale, il exerce un effet anti-hyperglycémiant associé à une augmentation de la sécrétion d'insuline. Alors que la régulation de la glycémie est fortement altérée dans certaines pathologies telles que l'obésité associée au diabète de type 2, aucune étude n'a évalué le fonctionnement du système 26RFa/GPR103 dans ces conditions.

Dans ce contexte, nous avons voulu déterminer l'impact d'un régime riche en graisse (régime high fat diet – HFD) sur les effets du 26RFa dans la régulation de la glycémie. La première étude de cette thèse décrit l'impact du régime HFD sur les effets périphériques du 26RFa en particulier son action incrétine. La seconde caractérise les effets centraux du 26RFa dans ce contexte physiopathologique. Enfin, la dernière étude précise les effets d'une infusion chronique centrale de 26RFa sur le phénotype obèse et hyperglycémique des souris HFD.

Dans un premier temps, nous avons soumis des souris à un régime HFD auxquelles nous avons injecté par voie intra-péritonéale du 26RFa durant différents tests métaboliques. L'ensemble des résultats obtenus nous a permis de mettre en évidence que les effets anti-hyperglycémiant du 26RFa sont totalement abolis chez les souris HFD. En effet, dans ce contexte, le 26RFa ne semble plus capable de stimuler la sécrétion d'insuline par le pancréas et l'effet insulino-sensibilisateur du peptide est fortement réduit. Ces résultats ont été confirmés dans un modèle de culture de cellules β pancréatiques humaines en condition de lipotoxicité, où nous avons pu montrer que le 26RFa ne stimule plus la sécrétion d'insuline. De plus, la perte de l'effet insulino-tropique du 26RFa peut être expliquée par une diminution de l'immunomarquage du GPR103 dans les îlots pancréatiques tandis que la diminution des effets insulino-sensibilisateurs du 26RFa peut être en partie liée à une réduction de l'expression du GPR103

dans les organes cibles de l'insuline : le muscle et le tissu adipeux. En conclusion de ce premier travail, les effets périphériques du 26RFa semblent totalement abolis chez la souris HFD.

Dans une seconde étude, nous avons effectué des injections intra-cérébro-ventriculaires (icv) de 26RFa chez la souris rendue obèse et hyperglycémique durant différents tests métaboliques. Cette étude nous a permis de mettre en évidence que les effets centraux du 26RFa ne sont pas impactés par le régime HFD. En effet, dans ces conditions, le 26RFa exerce toujours un effet anti-hyperglycémiant en stimulant la sécrétion d'insuline. Dans ce contexte où le 26RFa conserve ses effets centraux, nous avons souhaité déterminer les effets d'une infusion chronique icv de 26RFa sur le phénotype obèse et hyperglycémique des souris HFD. Ainsi, l'utilisation de mini-pompes osmotiques nous a permis d'injecter de façon continue durant 4 semaines du 26RFa dans le cerveau des souris HFD. Les résultats de cette étude ne nous ont pas permis de mettre évidence un effet bénéfique du 26RFa sur l'homéostasie du glucose chez les souris HFD. En effet, le 26RFa exerce un effet orexigène puissant qui pourrait masquer les effets du 26RFa sur la régulation de la glycémie observés lors d'injections aiguës.

Finalement l'ensemble des travaux de cette thèse nous révèle que le système 26RFa/GPR103 central et périphérique ne sont pas impactés de la même façon par un régime riche en graisse. En effet, tandis que le système périphérique perd totalement ses effets gluco-régulateurs, le système central quant à lui conserve ses effets anti-hyperglycémiant. Face à ce constat, il apparaît aujourd'hui nécessaire d'évaluer les possibles communications/interactions entre ces systèmes central et périphérique dans ce modèle HFD. Enfin, le traitement chronique central que nous avons effectué ne semble pas améliorer la régulation glycémique chez les souris traitées. Toutefois, s'agissant de la première étude à avoir évalué les effets chroniques du 26RFa dans un contexte d'obésité associée à l'hyperglycémie, d'autres protocoles d'expérimentation sont nécessaires pour poursuivre l'analyse du système 26RFA en situation physiopathologique.

Mots Clés : Neuropeptide, 26RFa, Homéostasie Glucidique, Obésité, Diabète de type 2

ABSTRACT

Recent studies revealed that the neuropeptide 26RFa and its receptor, GPR103, are involved in the regulation of glucose homeostasis. Indeed, it was shown that 26RFa exerts an incretin effect. 26RFa is mainly secreted by the duodenum after an oral glucose challenge and it acts directly on the pancreas to stimulate the glucose-induced insulin secretion. Moreover, 26RFa can improve insulin sensitivity. Finally, a recent study from our team provided evidence that 26RFa is also involved in the central regulation of glycemia and relays the central effect of insulin. Indeed, central 26RFa induces a robust anti-hyperglycemic effect associated with an increase of peripheral insulin secretion. It is well known that the regulation of glycemia is altered in obesity and diabetes but the effect of 26RFa in this pathology remains unknown.

The aim of this thesis was to evaluate the consequences of a high fat diet (HFD) on the glucoregulatory effect of 26RFa. The first study aimed to evaluate the impact of a HFD on the incretin effect of 26RFa. The second study aimed to characterize the central effect of 26RFa in those pathophysiological conditions. Finally, the third study aimed to determine the effect of a chronic central administration of 26RFa on the obese/hyperglycemic phenotype of the HFD mice.

Firstly, intraperitoneal injection of 26RFa in HFD mice revealed that the antihyperglycemic effect of 26RFa is totally lost in this model. Indeed, in the HFD mice, 26RFa is not able to increase the glucose-induced insulin secretion and the insulin sensitive effect of the peptide is dramatically impaired. These *in vivo* data were confirmed using beta cells cultured in lipotoxic conditions as, in this *in vitro* model, the insulinotropic effect of 26RFa is totally abolished. This loss of insulinotropic effect of 26RFa is probably due to a down regulation of GPR103 production in the beta cells whereas the loss of insulin sensitive effect may be caused by the down regulation of GPR103 expression in the insulin sensitive tissues such as the muscle and the adipose tissue.

Secondly, we carried out intracerebroventricular (icv) injection of 26RFa in high fat mice while performing metabolic tests. This experiment revealed that the HFD does not alter the central effect of 26RFa as the neuropeptide is still able to induce an antihyperglycemic effect and to enhance glucose-induced insulin secretion. In this context in which 26RFa retains its central

effects, we determined the effects of a chronic icv infusion of 26RFa in the obese/hyperglycemic mice. Using osmotic mini pumps, we found that chronic administration of 26RFa is unable to improve glucose homeostasis of the HFD mice. We hypothesize that the orexigenic effect of 26RFa is stronger than its antihyperglycemic effect and that, consequently, the gluco-regulatory effect of 26RFa may be masked by the increase of food intake and body weight.

Altogether, these results support the view that the central and peripheral effects on glucose homeostasis of the 26RFa/GPR103 peptidergic system are differentially impacted by the HFD. Indeed, the peripheral effects of 26RFa are totally abolished in HFD conditions whereas the central effects are maintained. It appears now necessary to strengthen our knowledge on the communication between those two systems (peripheral and central). Finally, the chronic central treatment of the HFD mice seems ineffective to improve glucose homeostasis in this pathophysiological context.

Key words: Neuropeptide, 26RFa, Glucose Homeostasis, Obesity, Type 2 Diabetes

TABLE DES MATIERES

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES	1
TABLE DES ABRÉVIATIONS.....	4
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	5
INTRODUCTION.....	7
CHAPITRE 1 : La régulation physiologique de la glycémie	7
1. La régulation périphérique de la glycémie.....	8
1.1. L'insuline.....	8
1.1.1. La régulation de la sécrétion d'insuline.....	8
1.1.2. Les modes d'action de l'insuline.....	10
1.1.2.1. Les voies de signalisation de l'insuline	10
1.1.2.2. L'action de l'insuline sur le muscle.....	11
1.1.2.3. L'action de l'insuline sur le tissu adipeux	11
1.1.2.4. L'action de l'insuline sur le foie.....	12
1.2. Le glucagon	14
1.2.1. La régulation de la sécrétion de glucagon	14
1.2.2. Le mode d'action du glucagon	15
1.3. Les incrétines	16
1.3.1. L'effet incrétine.....	16
1.3.2. La sécrétion des incrétines.....	16
1.3.3. L'effet insulino-trope des incrétines	17
1.3.4. Autres actions des incrétines dans la régulation périphérique de la glycémie.....	18
1.3.4.1. Effet du GIP sur le tissu adipeux.....	18
1.3.4.2. Effet de GLP-1 sur la production hépatique de glucose.....	19
2. La régulation centrale de la glycémie.....	20
2.1. L'hypothalamus, le centre de régulation de l'homéostasie énergétique	20
2.1.1. Les mécanismes moléculaires du « <i>glucose-sensing</i> ».....	21
2.1.2. Implication des cellules non neuronales.....	22
2.1.3. L'importance des afférences nerveuses dans l'intégration des signaux métaboliques par le SNC	23
2.2. Le cerveau contrôle la sécrétion périphérique des hormones pancréatiques	24
2.2.1. Implication du système nerveux sympathique et parasympathique	24
2.2.2. La régulation de la sécrétion d'insuline par les neurones gluco-sensibles.	25
2.3. La régulation centrale de la glycémie par l'insuline	25
2.3.1. La distribution du récepteur de l'insuline et la source de l'insuline dans le SNC.	26
2.3.2. Les actions centrales de l'insuline sur le métabolisme glucidique	27
2.3.2.1. Le contrôle de la PHG par l'action centrale de l'insuline	27
2.3.2.2. Implication de l'action centrale de l'insuline dans la lipolyse	28
2.4. Rôle de la leptine centrale.....	29

2.4.1.	Effet de la leptine sur la prise alimentaire et la dépense énergétique	29
2.4.2.	La leptine augmente la sensibilité centrale à l'insuline	29
2.5.	Rôle des incrétines dans la régulation centrale de la glycémie	30
2.5.1.	Rôle du GLP-1 dans la régulation centrale de la glycémie	30
2.5.1.1.	L'effet neuroincrétine.....	30
2.5.1.2.	Les effets centraux du GLP-1.....	31
2.5.2.	Les effets du GIP central sur l'homéostasie énergétique.....	33
CHAPITRE 2 : Le 26RFa, un nouvel acteur dans l'homéostasie du glucose.....		34
1.	Caractéristiques du système peptidergique 26RFa/GPR103	34
1.1.	Le neuropeptide 26RFa.....	34
1.2.	Le récepteur du 26RFa : Le GPR103	35
1.3.	La bio-distribution du système 26RFa/GPR103	36
1.3.1.	Dans les organes périphériques	36
1.3.2.	Dans le système nerveux central	37
2.	Le rôle orexigène du 26RFa.....	38
3.	Rôle dans la régulation de la glycémie	40
3.1.	Activité périphérique du 26RFa.....	40
3.1.1.	Le 26RFa stimule la sécrétion d'insuline	40
3.1.2.	Le 26RFa, une nouvelle incrétine.....	41
3.1.3.	Le 26RFa augmente la sensibilité à l'insuline.....	42
3.2.	Activité centrale du 26RFa	42
4.	Rôle du 26RFa dans le comportement.....	44
4.1.	Rôle du 26RFa dans la locomotion.....	44
4.2.	Rôle du 26RFa dans le comportement anxieux.....	45
4.3.	Rôle du 26RFa dans la nociception.....	45
CHAPITRE 3 : L'obésité associée au diabète de type 2.....		47
1.	Les caractéristiques de l'obésité et du diabète de type 2	47
1.1.	Les facteurs de risques	48
1.1.1.	Les facteurs génétiques.....	48
1.1.2.	Les facteurs environnementaux.....	48
1.2.	De l'obésité au diabète de type 2	49
2.	Le développement de l'insulino-résistance.....	50
2.1.	De l'excès de gras à l'insulino-résistance.....	50
2.1.1.	Le rôle déterminant du tissu adipeux dans l'insulino-résistance	50
2.1.2.	L'insulino-résistance musculaire.....	51
2.1.3.	L'insulino-résistance hépatique.....	52
2.1.4.	Rôle de l'inflammation du SNC	54
2.1.5.	Rôle de la leptino-résistance.....	55

2.1.6. Rôle et mécanismes de l'insulino-résistance centrale	56
3. Rôle des incrétines dans l'obésité et le diabète de type 2	57
4. Le dysfonctionnement de la cellule β.....	58
4.1. Les mécanismes compensatoires de la cellule β	58
4.2. La défaillance des cellules β au cours du diabète.....	59
5. Les traitements actuels du diabète.....	61
OBJECTIFS.....	63
RESULTATS	65
Article 1 : Le 26RFa est un régulateur clé dans la régulation de l'homéostasie énergétique et son activité est altérée chez la souris obèse et hyperglycémique	65
Etude de l'effet de l'inactivation du 26RFa sur le phénotype obèse et diabétique	78
Article 2 : L'administration icv aiguë de 26RFa contrairement à l'administration chronique améliore l'homéostasie du glucose chez la souris obèse et diabétique	83
DISCUSSION GENERALE	107
1. Caractérisation de l'effet du 26RFa endogène par l'utilisation d'un antagoniste du GPR103	107
2. Les dysfonctionnements du système 26RFa/GPR103 périphérique chez la souris HFD	109
2.1. Mise en évidence d'un dysfonctionnement du système 26RFa/GPR103 endogène	109
2.2. Perte de l'effet incrétine et insulino-sensibilisateur du 26RFa chez la souris HFD	110
2.3. La diminution de l'expression du GPR103 est potentiellement responsable de la perte de l'effet du 26RFa chez la souris HFD	111
2.4. Les effets du 26RFa central sur la régulation de la glycémie chez la souris HFD	113
2.5. Effet de l'insulino-résistance centrale sur le 26RFa chez la souris HFD	113
3. Le 26RFa central : un acteur dans le traitement du diabète de type 2.....	114
3.1. Effet du traitement chronique sur l'obésité des souris HFD	114
3.2. Effet du traitement chronique sur l'homéostasie du glucose	115
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	117
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	120

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

Articles de la thèse

Juillet 2019 – *American Journal of Physiology* – Neuropeptide 26RFa (QRFP) is a key regulator of glucose homeostasis and its activity is markedly altered in obese/hyperglycemic mice

Gaëtan Prévost, Arnaud Arabo, **Marie-Anne Le Sollic**, Justine Bons, Marie Picot, Julie Maucotel, Hind Berrahmoune, Mouna El Mehdi, Saloua Cherifi, Alexandre Benani, Emmanuelle Nédélec, Moïse Coëffier, Jérôme Leprince, Anneli Nordqvist, Valéry Brunel, Pierre Déchelotte, Hervé Lefebvre, Youssef Anouar, and Nicolas Chartrel

Juillet 2019 – *Endocrine Connections* – The neuropeptide 26RFa in the human gut and pancreas: potential involvement in glucose homeostasis

Gaëtan Prévost, Marie Picot, **Marie-Anne Le Sollic**, Arnaud Arabo, Hind Berrahmoune, Mouna El Mehdi, Saloua Cherifi, Alexandre Benani, Emmanuelle Nédélec, Françoise Gobet, Valéry Brunel, Jérôme Leprince, Hervé Lefebvre, Youssef Anouar and Nicolas Chartrel

Septembre 2021 – Identification of a discrete neuronal circuit that relays insulin signaling into the brain to regulate glucose homeostasis

Mouna El Mehdi, Saloua Takhlidjt, Mélodie Devère, Arnaud Arabo, **Marie-Anne Le Sollic**, Julie Maucotel, Alexandre Bénani, Emmanuelle Nedelec, Céline Duparc, Benjamin Lefranc, Jérôme Leprince, Youssef Anouar, Gaëtan Prévost, Nicolas Chartrel, Marie Picot

Mars 2021 – Médecine des maladies métaboliques – Actualité sur l'implication du système peptidergique 26RFa/GPR103 dans la régulation de la glycémie

Marie-Anne Le Sollic, Arnaud Arabo, Marie Picot, Jérôme Leprince, Nicolas Chartrel, Gaëtan Prévost

(En revision) – *Neuroendocrinology* – Acute but not chronic central administration of the neuropeptide 26RFa (QRFP) improves glucose homeostasis in obese/diabetic mice

Marie-Anne Le Sollic, Arnaud Arabo, Saloua Takhlidjt, Julie Maucotel, Mélodie Devère, Julien Riancho, Hind Berrahmoune, Jean-Luc do Rego, Jean-Claude do Rego, Alexandre Bénani, Emmanuelle Nedelec, Benjamin Lefranc, Jérôme Leprince, Youssef Anouar, Marie Picot, Nicolas Chartrel, Gaëtan Prévost

Autres Articles

Décembre 2019 – *Microorganisms* – Hafnia alvei HA4597 Strain Reduces Food Intake and Body Weight Gain and Improves Body Composition, Glucose, and Lipid Metabolism in a Mouse Model of Hyperphagic Obesity

Nicolas Lucas, Romain Legrand, Camille Deroissart, Manon Dominique, Saïda Azhar, **Marie-Anne Le Solliec**, Fatima Léon, Jean-Claude do Rego, Pierre Déchelott, Sergueï O. Fetissov and Grégory Lambert

Février 2020 – *Nutrients* – Plasma Peptide Concentrations and Peptide-Reactive Immunoglobulins in Patients with Eating Disorders at Inclusion in the French EDILS Cohort (Eating Disorders Inventory and Longitudinal Survey)

Marie Galmiche, Nicolas Lucas, Pierre Déchelotte, Camille Deroissart, **Marie-Anne Le Solliec**, Julie Rondeaux, Saida Azhar, Sébastien Grigioni, Guillaume Colange, Julie Delay, Najate Achamrah, Vanessa Folope, Liliana Belmonte, Adèle Lamarre, Agnès Rimbert, Tiphaine Saillard, André Petit, Muriel Quillard, Moïse Coeffier, André Gillibert, Grégory Lambert, Romain Legrand and Marie-Pierre Tavalacci

Mai 2020 – *International Journal of Obesity* – Commensal Hafnia alvei strain reduces food intake and fat mass in obese mice—a new potential probiotic for appetite and body weight management

Romain Legrand, Nicolas Lucas, Manon Dominique, **Marie-Anne Le Solliec**, Jean-Claude do Rego, Pierre Déchelotte, Julie Rondeaux, Nicolas Pons, Saïda Azhar, Séverine Nobis, Camille Deroissart, Charlène Guérin, Emmanuelle Le Chatelier, Sergueï O. Fetissov

Participation à des congrès

43^{ème} Colloque de la Société de Neuroendocrinologie – Octobre 2019 : Présentation affichée et communication flash (3 minutes)

Acute central administration of 26RFa has antihyperglycemic effect in obese and hyperglycemic mice

Le Sollic, M.A., Maucotel, J., Arabo, A., Riancho, J., Berrahmoune, H., Picot, M., El Mehdi, M., Cherifi, S., Benani, A., Nedelec, E., Anouar, Y., Chartrel, N. & Prevost, G.

44^{ème} Colloque de la Société de Neuroendocrinologie et congrès annuel de la *British Society for Neuroendocrinology* (BSN) – Septembre 2021 : Communication affichée

Acute (but not chronic) central administration of the neuropeptide 26RFa (QRFP) improves glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) in obese/diabetic mice

Marie-Anne Le Sollic, Julie Maucotel, Saloua Takhlidjt, Arnaud Arabo, Melodie Devere, Julien Riancho, Hind Berrahmoune, Jean Luc Do Rego, Jean Claude Do Rego, Alexandre Benani, Emmanuelle Nédélec, Benjamin Lefranc, Jérôme Leprince, Youssef Anouar, Marie Picot, Nicolas Chartrel, Gaétan Prévost

57^{ème} congrès annuel de la société européenne pour l'étude du diabète (EASD) – Octobre 2021 : Présentation Flash (4min)

Evaluation of the 26RFa/GPR103 peptidergic system in a mouse model of insulinopenia.

M.-A. Le Sollic, J. Maucotel, A. Arabo, M. Picot, S. Takhlidjt, A. Benani, E. Nedelec, A. Nordqvist, Y. Anouar, N. Chartrel, G. Prévost

37^{ème} congrès de la Société Française d'Endocrinologie (SFE) – Octobre 2021 : Communication orale

Evaluation des effets centraux du neuropeptide 26RFa sur la régulation de la glycémie chez la souris high fat diet.

MA. Le Sollic, J. Maucotel, A. Arabo, S. Takhlidjt, M. Picot, J. Riancho, B. Lefranc, J. Leprince, J.L. Do Rego, J.C. Do Rego, E. Nedelec, A. Benani, A. Youssef, N. Chartrel, G. Prévost

TABLE DES ABRÉVIATIONS

α -MSH : α -melanocyte stimulating hormone

AMPC : adénosine monophosphate cyclique

AMPK : AMP kinase

ARC : noyau arqué

BHE : barrière hémato-encéphalique

CRH : *corticotropin releasing hormone*

DAG : diacylglycérol

DMH : hypothalamus dorso-médian

DMNX : noyau moteur du nerf vague

DPP4 : dipeptidyl peptidase-4

DT2 : diabète de type 2

EM : éminence médiane

ERK : *extracellular signal regulated kinase*

FOXO1 : *Forkhead box protein O1*

GE : Neurones excité par le glucose

GI : Neurones inhibé pas le glucose

GIP : *glucose-dependent insulintropic polypeptide*

GCK : glucokinase

GLP-1 : *glucagon like peptide-1*

GSIS : *Glucose-Stimulated Insulin Secretion*

HFD : *High Fat Diet* (régime riche en graisse)

HIF-1 α : *Hypoxia-Inducible Factor-1 α*

HSL : *hormone-sensitive lipase*

icv : intra-cérébro-ventriculaire

ip : intra-péritonéale

IFN γ : interféron γ

IL1 β : interleukine 1 β

IL6 : interleukine-6

IRS : *insulin-receptor substrate*

JNK : c-Jun N-terminal kinase

LCR : liquide céphalo-rachidien

LHA : aire hypothalamique latérale

LPL : lipoprotéine lipase

MAP-kinase : *Mitogen-activated protein kinases*

NEP : *neutral endopeptidase*

NF κ B : *nuclear factor-kappa B*

NPY : neuropeptide Y

NTS : noyaux du tractus solitaire

PACAP : *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*

PDE3B : phosphodiesterase-3B

PHG : Production Hépatique de Glucose

PI3K : *phosphoinositide 3-kinase*

PKA : protéine-kinase A

PKC : Protéine Kinase C

POMC : pro-opio-mélanocortine

PTP1B : Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1

PVN : noyau paraventriculaire

QRFP : *Pyroglutamylated RFamide Peptide*

SGLT : *sodium-glucose linked transporters symport*

SNC : système nerveux central

SREBP1c : *sterol regulatory element binding protein*

STAT3 : *Signal transducer and activator of transcription 3*

TLR4 : *Toll-like receptor 4*

TNF- α : *Tumor necrosis factor*

VIP : polypeptide vasoactif intestinal

VLDL : very low density lipoprotein

VMH : hypothalamus ventro médian

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Evolution de la glycémie chez l'homme pendant 24 heures.....	7
Figure 2. Le glucose stimule la sécrétion d'insuline par la cellule β pancréatique	9
Figure 3. Signalisation insulinique	10
Figure 4. Représentation simplifiée de la signalisation insulinique dans le muscle squelettique.....	11
Figure 5. Représentation simplifiée de l'action de l'insuline dans le tissu adipeux blanc.....	12
Figure 6. Représentation simplifiée de l'action de l'insuline dans le foie	13
Figure 7. Mécanisme de sécrétion des incrétines	17
Figure 8. Action directe et indirecte du GIP sur le tissu adipeux	19
Figure 9. Représentation schématique de l'interface sang-hypothalamus.....	20
Figure 10. Régions clés du système nerveux central impliquées dans la régulation de la glycémie....	20
Figure 11. Mécanisme de "glucose sensing" des neurones glucosensibles	22
Figure 12. Intégration des signaux périphériques métaboliques par l'hypothalamus.....	23
Figure 13. Action directe et indirecte de l'insuline sur la production hépatique de glucose	28
Figure 14. Actions de l'insuline centrale sur l'homéostasie du glucose.....	28
Figure 15. Signalisation de la leptine sur la cascade de signalisation de l'insuline	30
Figure 16. Effet neuroincrétine du GLP-1	31
Figure 17. Arbre phylogénétique des peptide RFamides chez les vertébrés	34
Figure 18. Alignement de séquences du 26RFa chez les mammifères.....	35
Figure 19. Représentation schématique des sites de clivages du prépro-26RFa chez l'homme.....	35
Figure 20. Voies de signalisation associées au GPR103 dans différents modèles cellulaires	36
Figure 21. Distribution anatomique du 26RFa (●), du GPR103A (●) et du GPR103B (●) dans le système nerveux central	37
Figure 22: Mécanisme d'action du 26RFa dans le contrôle de la prise alimentaire.....	39
Figure 23. Effet périphérique du 26RFa dans la régulation de la glycémie	42
Figure 24. Action centrale du 26RFa dans la régulation de la glycémie.....	44
Figure 25. Evolution du profil glycémique des patients durant les stades de prédiabète et de diabète avéré.	50
Figure 26. Installation de l'insulino-résistance dans le tissu adipeux	51
Figure 27. L'insulino résistance dans le muscle.....	52
Figure 28. L'insulino résistance dans le foie.....	53
Figure 29. L'inflammation induite par l'obésité et l'excès calorique.....	55
Figure 30. Insulino-résistance centrale et conséquences métabolique.	57
Figure 31. Mécanisme de la défaillance des cellules β pancréatiques en condition de lipotoxicité.	60
Figure 32. Mécanisme de compensation des cellules β dans le diabète de type 2.....	61

<u>Figure 33.</u> Ensemble des stratégies thérapeutiques pour le diabète de type 2.....	62
<u>Figure 34.</u> Stratégie d'inactivation du 26RFa chez la souris.....	80
<u>Figure 35.</u> Evolution du phénotype des souris 26RFa ^{+/+} , 26RFa ^{+/-} et 26RFa ^{-/-} soumises au régime HFD (n=7-8/groupes).....	81
<u>Figure 36.</u> Profil glycémique des souris 26RFa ^{+/+} , 26RFa ^{+/-} et 26RFa ^{-/-} soumises au régime HFD (n=7-8/groupes) durant (A) un test de tolérance du glucose (IPGTT), (B) après une charge orale en glucose (OGTT), et (C) durant un test de tolérance à l'insuline.	81
<u>Figure 37.</u> Mesure de la sécrétion d'insuline induite par le glucose chez les souris 26RFa ^{+/+} , 26RFa ^{+/-} et 26RFa ^{-/-} soumises au régime HFD (n=7-8/groupes) durant un test de tolérance au glucose.....	81
<u>Figure 38.</u> Dysfonctionnement du système 26RFa/GPR103 périphérique chez la souris HFD.....	112
<u>Figure 39.</u> Impact du régime HFD sur le système 26RFa/GPR103 central.....	114
<u>Figure 40.</u> Perspectives de recherche	117

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : La régulation physiologique de la glycémie

La régulation de l'homéostasie énergétique regroupe l'ensemble des processus régulant la dépense énergétique, le stockage ainsi que l'utilisation des substrats énergétiques. Ces processus permettent alors d'établir des réserves d'énergie lors des épisodes d'apport énergétique (prise alimentaire) et de faciliter l'accès aux substrats énergétiques lors des périodes de jeûne ou d'exercice. Le glucose, en tant que substrat énergétique essentiel, fait partie intégrante de l'homéostasie énergétique. A ce titre, il est soumis à un ensemble de processus de régulation permettant son stockage et sa biodisponibilité, c'est ce que l'on appelle l'homéostasie glucidique.

Le glucose constitue un substrat métabolique majeur au sein de l'organisme. Le cerveau par exemple utilise exclusivement le glucose comme substrat énergétique. De ce fait, une hypoglycémie, qui se caractérise par une concentration plasmatique de glucose inférieure à 0.6 g/L, peut entraîner de sévères conséquences sur les fonctions cérébrales telles que des convulsions, le coma ou même la mort (Mitrakou *et al.* 1991). Par opposition, le diabète se définit par une hyperglycémie chronique avec des concentrations plasmatiques de glucose à jeun supérieures à 1.26 g/L pouvant entraîner des complications vasculaires (infarctus, accident vasculaire cérébral...), et des complications micro-angiopathiques telles que rétinopathie, néphropathie ou neuropathie (Zheng *et al.* 2018).

Il apparaît donc primordial pour l'organisme de maintenir les niveaux de glycémie dans un intervalle très strict. Cependant, au cours de la journée, les apports en glucose varient fortement. La glycémie augmente après le repas pour revenir ensuite aux concentrations basales (Zhou *et al.* 2009; Shah *et al.* 2019) **Figure 1**. C'est une régulation fine à la fois hormonale et neuronale qui permet de contrôler la glycémie malgré les périodes de jeûne et de prise alimentaire.

Ainsi, nous verrons dans ce premier chapitre comment s'effectue la régulation de la glycémie chez le sujet sain. Nous développerons d'abord le rôle des principaux effecteurs périphériques tels que les deux hormones pancréatiques : l'insuline et le glucagon ainsi que le rôle des incrélines. Nous verrons par la suite comment l'intégration du système nerveux central (SNC)

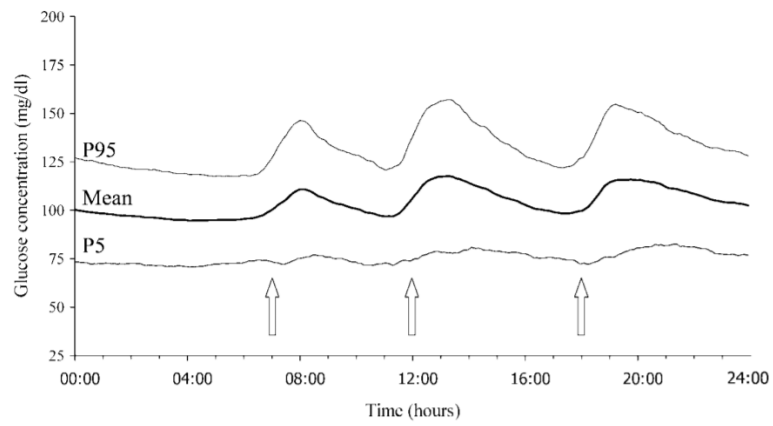


Figure 1. Evolution de la glycémie chez l'homme pendant 24 heures
Flèches blanches : épisodes de prise alimentaire
D'après Zhou *et al.*, 2009

dans la régulation de la glycémie est venue bouleverser les premiers modèles qui présentaient jusqu'alors le pancréas en tant que coordinateur principal de cette régulation.

1. La régulation périphérique de la glycémie

Pendant longtemps le modèle de régulation de la glycémie était centré sur le pancréas car responsable de la sécrétion de nombreuses hormones et enzymes digestives dont les rôles sont déterminants dans l'homéostasie énergétique. Le pancréas peut être divisé en deux parties distinctes : le pancréas exocrine qui secrète des enzymes digestives et le pancréas endocrine. Le pancréas endocrine constitue 1 à 2% du pancréas total (Röder *et al.* 2016). Son rôle consiste à sécréter les hormones pancréatiques principalement l'insuline, le glucagon, la somatostatine et le polypeptide pancréatique. Les cellules endocrines sont regroupées et constituent les îlots de Langerhans. Chacune de ces hormones joue un rôle spécifique et complexe aussi pour les besoins de cette thèse, nous allons principalement nous concentrer sur les rôles de l'insuline et du glucagon.

1.1. L'insuline

L'insuline a été découverte il y a 100 ans par Banting et ses collaborateurs. L'insuline, sécrétée par les cellules β pancréatiques, permet de diminuer la production hépatique du glucose (PHG) et de favoriser la captation de celui-ci par le muscle et le tissu adipeux. L'ensemble de ses différentes actions permet ainsi à l'insuline de faire baisser le taux de glucose circulant.

1.1.1. La régulation de la sécrétion d'insuline

Afin de pouvoir diminuer la glycémie lors des épisodes de prise alimentaire sans pour autant induire des hypoglycémies lors des périodes de jeûne, il est important que la sécrétion de l'insuline soit finement régulée et qu'elle réponde à des stimuli bien précis.

La cellule β pancréatique produit et stocke l'insuline dans des vésicules de sécrétion afin de pouvoir rapidement libérer l'hormone en cas d'hyperglycémie. La cellule β doit donc être capable de capter le glucose plasmatique afin de libérer l'insuline lorsque la glycémie

augmente. Ce phénomène est communément appelé GSIS pour *Glucose-Stimulated Insulin Secretion*.

Après une prise alimentaire, le glucose contenu dans le bol alimentaire est transporté progressivement dans la circulation sanguine et capté par les cellules β à l'aide de transporteurs. Il existe différents transporteurs de glucose : les transporteurs SGLT (pour *sodium-glucose linked transporters symport*) qui sont principalement impliqués dans la captation du glucose par l'intestin et par le rein, ainsi que les transporteurs GLUT qui permettent un transport facilité de glucose (Navale & Paranjape 2016). Ces derniers permettent le transport du glucose dans les tissus utilisateurs et dans les cellules impliquées dans la détection des variations de glycémie. Il existe 13 isoformes de transporteurs GLUT qui varient en fonction de leur bio-distribution, de leur affinité pour le glucose et de leur mécanisme d'activation.

Ce sont les transporteurs GLUT1 et GLUT3 chez l'Homme ou GLUT2 chez la souris qui sont principalement impliqués dans le transport du glucose dans la cellule β pancréatique (De Vos *et al.* 1995; McCulloch *et al.* 2011). Le glucose intracellulaire est ensuite phosphorylé par l'enzyme glucokinase (GCK). Cette première étape semble être essentielle à la GSIS puisque des mutations délétères sur le gène de la GCK chez l'Homme sont associées à une diminution importante de la sécrétion d'insuline induite par le glucose alors que des mutations activatrices entraînent un hyperinsulinisme (Stoffel *et al.* 1992; Glaser *et al.* 1998; Rorsman & Braun 2013).

Le glucose-6-phosphate est ensuite métabolisé par les mitochondries pour produire de l'ATP. L'augmentation de l'ATP intracellulaire induit une fermeture des canaux potassiques ATP dépendants ce qui entraîne une dépolarisation membranaire ainsi qu'une ouverture de canaux calciques. L'entrée massive d'ions calcium dans la cellule permet l'exocytose des vésicules contenant l'insuline **Figure 2** (Röder *et al.* 2016).

Parallèlement au glucose, la cellule β peut aussi répondre aux autres nutriments tels que les acides aminés et les acides gras afin de sécréter l'insuline (Rushakoff *et al.* 1987; Itoh *et al.* 2003). Par ailleurs, comme nous le verrons par la suite, la sécrétion d'insuline est fortement stimulée par l'action d'hormones intestinales appelées incrétines (*CF Chapitre 1-1.3.31.3.3*).

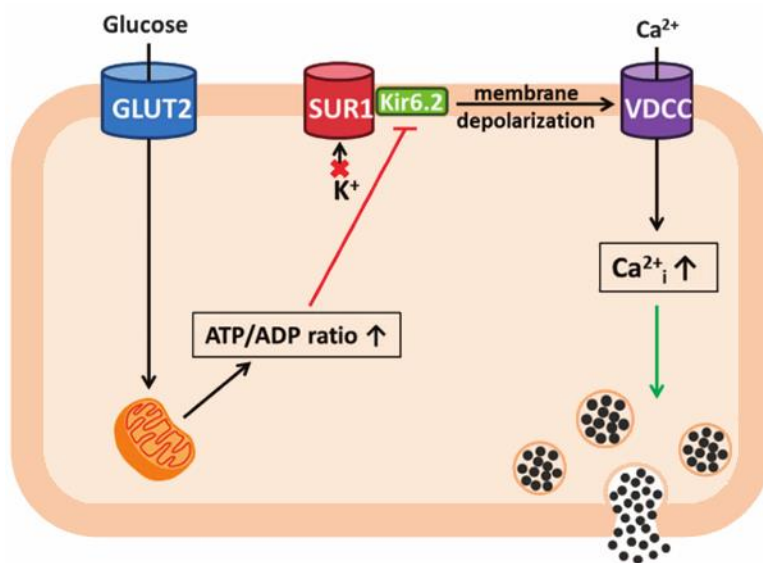


Figure 2. Le glucose stimule la sécrétion d'insuline par la cellule β pancréatique

Le glucose pénètre dans la cellule β par le transporteur GLUT2. Le glucose est ensuite transformé en ATP par les mitochondries ce qui entraîne une augmentation du ratio ATP/ADP. L'augmentation des concentrations intracellulaire d'ATP entraîne une fermeture des canaux potassiques ATP dépendants ainsi qu'une fermeture des canaux calciques. *In fine*, ce mécanisme entraîne une dépolarisation membranaire et donc une libération des vésicules de sécrétion contenant l'insuline.

Modifié d'après Röder et al. 2016

1.1.2. Les modes d'action de l'insuline

1.1.2.1. Les voies de signalisation de l'insuline

La fixation de l'insuline sur son récepteur présent dans différents tissus engendre de nombreuses réponses métaboliques. La cascade de signalisation alors mobilisée est très semblable dans ces différents tissus. Cependant, afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires conduisant au développement de l'insulino-résistance dans le diabète de type 2 (DT2), nous allons présenter principalement les différents effecteurs intracellulaires permettant à l'insuline d'exercer son activité anti hyperglycémiant.

La fixation de l'insuline sur son récepteur permet l'activation de deux grandes voies de signalisation : la voie MAP-kinase/ERK (pour *Mitogen-activated protein kinases/ extracellular signal regulated kinase*), qui permet de relayer les effets de l'insuline sur la prolifération cellulaire et la voie phosphoinositide 3-kinase (PI3K) /AKT qui relaie les effets de l'insuline sur le métabolisme que nous allons décrire.

Le récepteur de l'insuline fait partie de la grande famille des récepteurs avec une activité tyrosine kinase. Le récepteur comporte plusieurs sous unités : une sous-unité α qui permet la liaison avec le ligand et une sous-unité β qui possède l'activité tyrosine kinase. Les sous-unités α et β s'associent afin de former des dimères puis des tétramères représentant la forme active du récepteur (2 sous-unités α et 2 sous-unités β). A l'état basal, les sous-unités α inhibent l'activité tyrosine kinase des sous-unités β , cependant, la fixation de l'insuline sur les sous-unités α entraîne une autophosphorylation des sous-unités β sur des résidus tyrosine permettant d'activer le récepteur (Siddle 2011; Saltiel 2016).

La phosphorylation du récepteur de l'insuline sur les résidus tyrosine permet le recrutement des protéines IRS (pour *insulin-receptor substrate*) dont il existe 4 isoformes principales (IRS 1 à 4), les isoformes IRS-1 et IRS-2 sont fortement impliquées dans le métabolisme du glucose et des lipides (Bouzakri *et al.* 2006; Thirone *et al.* 2006; Siddle 2011). Activé, le récepteur de l'insuline phosphoryle les protéines IRS sur de nombreux résidus tyrosine conduisant à un changement de conformation et à l'activation notamment de la voie PI3K/AKT. La phosphorylation d'AKT dans le signal insulinique conduit à un recrutement de facteurs de transcription qui régulent les gènes impliqués dans la régulation du métabolisme glucidique (Haeusler *et al.* 2018) **Figure 3.**

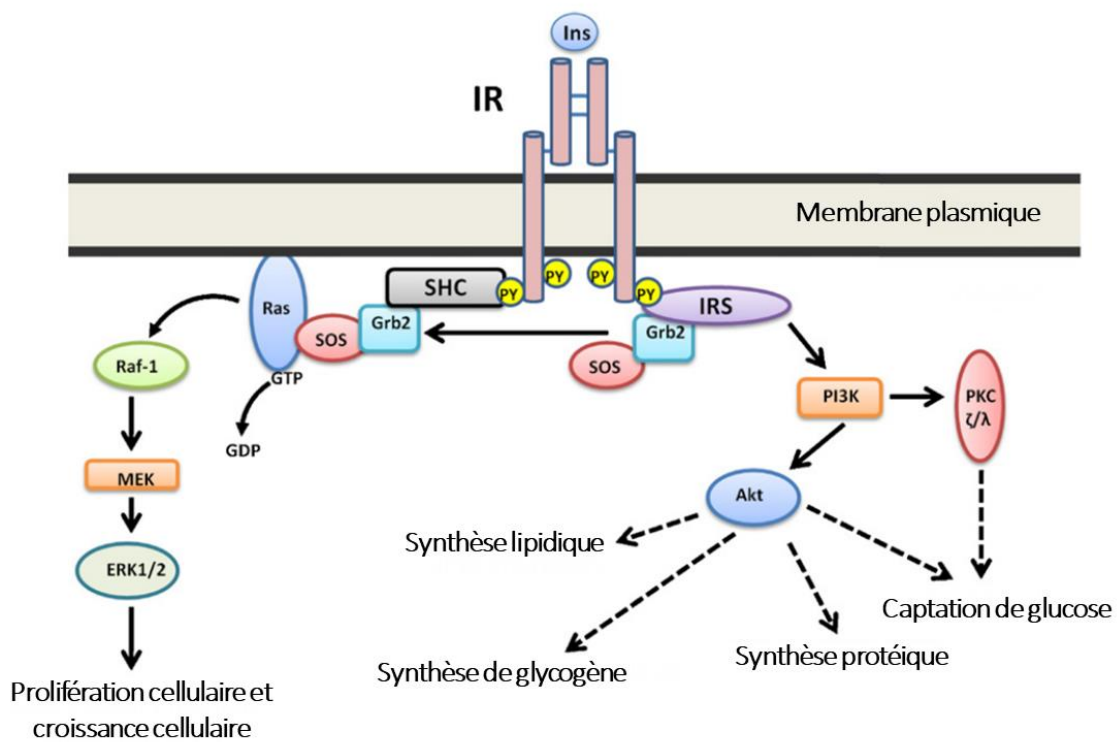


Figure 3. Signalisation insulinique

La fixation de l'insuline (Ins) sur son récepteur (IR) entraîne une autophosphorylation de la sous-unités β ainsi que la phosphorylation des protéines IRS sur des résidus tyrosine. La phosphorylation des protéine IRS permet le recrutement de PI3K et de Grb2 ce qui entraîne l'activation des voies de signalisation médiées par AKT ou ERK.

D'après Olivares-Reyes *et al.* 2009

1.1.2.2. L'action de l'insuline sur le muscle

Le glucose et les acides gras constituent les principaux substrats énergétiques du muscle. (Rahman *et al.* 2021). Durant l'effort, le substrat énergétique est issu de la glycolyse alors qu'au repos l'énergie est stockée dans les myocytes sous forme de glycogène. Le glycogène est synthétisé à partir du glucose plasmatique par la voie de glycogénogenèse. 70% du glucose plasmatique est ainsi utilisé par le muscle (Baron *et al.* 1988) et relève de la captation de glucose par les myocytes sous le contrôle de l'insuline.

La captation du glucose dans le muscle s'effectue grâce au transporteur de glucose GLUT4. En condition basale, ce récepteur est localisé dans des vésicules de stockage. En condition d'hyperglycémie, l'insuline favorise la translocation de GLUT4 à la membrane permettant ainsi la captation cellulaire du glucose plasmatique (Samuel & Shulman 2016). En effet, la fixation de l'insuline sur son récepteur entraîne la phosphorylation de IRS1 puis l'activation de la voie médiée par PI3K, ceci permet à la fois de remodeler les filaments d'actine et de recruter les protéines impliquées dans le trafic vésiculaire (Bouzakri *et al.* 2006; Sylow *et al.* 2021). Ainsi, les vésicules intracellulaires contenant le transporteur GLUT4 sont transloquées à la membrane favorisant l'entrée du glucose dans les myocytes.

L'insuline permet donc d'augmenter la captation du glucose par les myocytes mais elle permet également d'augmenter le stockage du glucose sous forme de glycogène. En effet, l'activation de la voie PI3K par l'insuline stimule l'enzyme glycogène synthase et inhibe inversement l'enzyme glycogène phosphorylase (Petersen & Shulman 2018; Sylow *et al.* 2021) **Figure 4.**

1.1.2.3. L'action de l'insuline sur le tissu adipeux

Par opposition au muscle, le tissu adipeux n'est pas grand consommateur de glucose puisque la captation du glucose par le tissu adipeux représente 5 à 10% de la captation totale de glucose (Virtanen *et al.* 2002). En revanche, l'action de l'insuline sur le tissu adipeux blanc permet de réguler fortement les taux circulants d'acides gras et de glycérol, éléments essentiels au maintien de l'homéostasie glucidique.

L'action de l'insuline sur le tissu adipeux s'effectue principalement par une diminution de la lipolyse. En effet, l'insuline, via la stimulation de l'enzyme phosphodiesterase-3B (PDE3B), inhibe l'activité de la protéine-kinase A (PKA) (Kitamura *et al.* 1999; Rondinone *et al.* 2000). Or, dans

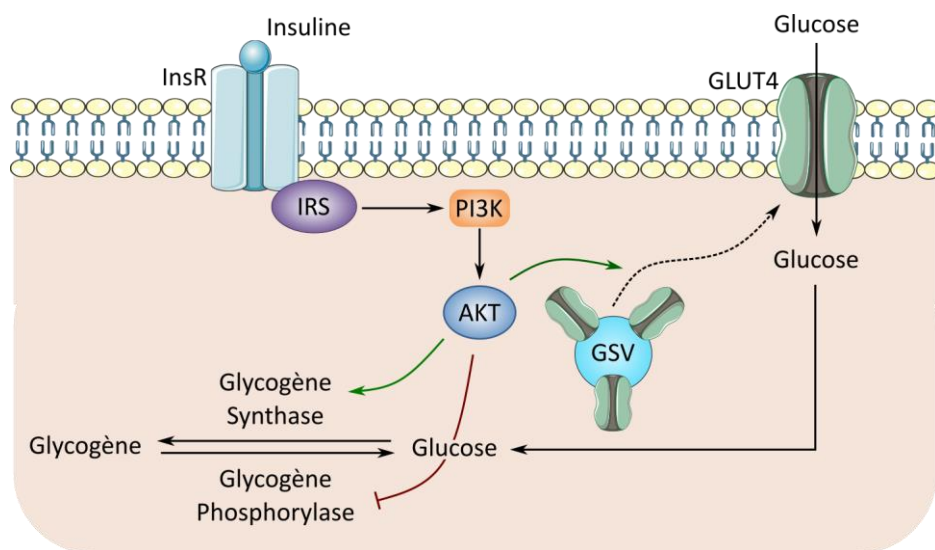


Figure 4. Représentation simplifiée de la signalisation insulinaire dans le muscle squelettique

La fixation de l'insuline sur son récepteur entraîne le recrutement de la protéine IRS ce qui entraîne l'activation de la voie de signalisation médiée par PI3K/AKT. L'activation de AKT permet (i) de favoriser la translocation membranaire du transporteur de glucose GLUT4 et (ii) d'activer les enzymes responsables de la synthèse de glycogène (glycogène synthase).

GSV : Vésicule contenant GLUT4 ; InsR : Récepteur de l'insuline

Modifié d'après Pertersen et Shulman 2018

le tissu adipeux, la PKA favorise la lipolyse en phosphorylant l'hormone-sensible lipase (HSL) (Petersen & Shulman 2018) ce qui conduit à l'hydrolyse des triglycérides contenus dans les gouttelettes lipidiques en acides gras et en glycérol (Holm 2003). Ainsi, la diminution de l'activité de la PKA par l'insuline permet de diminuer le taux de phospho-HSL dans les adipocytes et par conséquent la libération plasmatique d'acides gras et de glycérol.

Conjointement à la diminution de la lipolyse, l'insuline favorise aussi la captation des acides gras et des triglycérides circulants. En effet, l'insuline augmente l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) (Farese *et al.* 1991). Cette enzyme permet l'hydrolyse des triglycérides contenus dans les VLDL (pour *very low density lipoprotein*). La transformation de ces triglycérides en acides gras est nécessaire pour que ces derniers soient pris en charge par des transporteurs spécifiques et puissent pénétrer dans les adipocytes. A l'instar de GLUT4 dans le muscle, l'insuline permet aussi la translocation de ces transporteurs à la membrane favorisant ainsi la captation d'acides gras par les adipocytes (Stahl *et al.* 2002).

Les acides gras captés par les adipocytes sont ensuite estérifiés pour être stockés sous forme de triglycérides. Cependant, l'estérification des acides gras est dépendante de la disponibilité du glycérol-3-phosphate. L'insuline, qui permet la captation du glucose dans les adipocytes, favorise la disponibilité du glycérol-3-phosphate et stimule donc la lipogenèse. En outre, l'insuline active le facteur de transcription SREBP1c (pour *sterol regulatory element binding protein-1C*) qui régule positivement l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse (*e.g.*, l'acetyl-CoA carboxylase ou l'acide gras synthase) (Petersen & Shulman 2018). **Figure 5**

Par l'inhibition de la lipolyse et la stimulation de la lipogenèse dans le tissu adipeux, l'insuline diminue la concentration plasmatique des acides gras et du glycérol, substrats de la néoglucogenèse hépatique. L'action de l'insuline permet, par conséquent, de limiter la biodisponibilité des substrats nécessaires à la PHG et participe donc au maintien de l'homéostasie du glucose (Lewis *et al.* 2021).

1.1.2.4. L'action de l'insuline sur le foie

Le foie joue un rôle central dans le métabolisme énergétique puisqu'il constitue l'organe principal pour la synthèse, le stockage et la redistribution du glucose, des protéines et des lipides. En effet, le foie est impliqué dans de nombreuses voies métaboliques qui sont finement

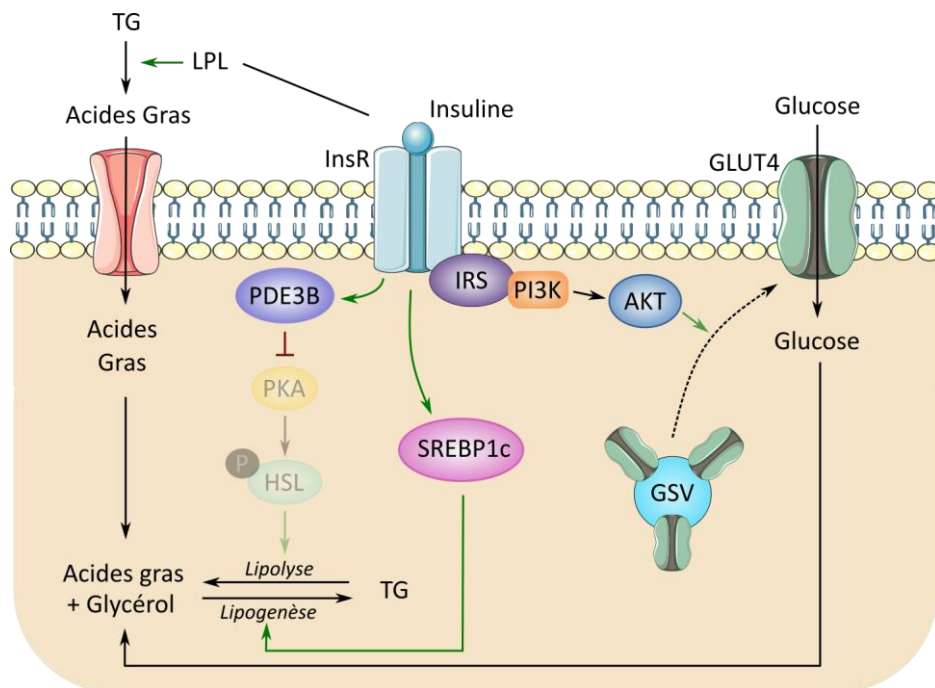


Figure 5. Représentation simplifiée de l'action de l'insuline dans le tissu adipeux blanc. Dans le tissu adipeux, l'insuline permet (i) de favoriser la captation d'acides gras en activant la LPL, (ii) d'inhiber la lipolyse en activant la phospho-di-estérase-3B (PDE3B), (iii) d'activer la lipogenèse en activant le facteur de transcription SREBP1c (*sterol regulatory element binding protein*) et en favorisant la translocation de GLUT4 à la membrane.

GSV : Vésicules contenant GLUT4 ; HSL : Hormone sensitive lipase ; InsR : Récepteur de l'insuline ; LPL : lipoprotéine lipase ; PDE3B : phospho-di-estérase 3B ; TG : Triglycérides
Modifié d'après Pertersen et Shulman 2018

régulées par les hormones pancréatiques dont l'insuline. Or, le foie est le premier organe cible de l'insuline qui lui arrive directement via la veine porte. La fixation de l'insuline sur son récepteur hépatique induit de nombreux changements métaboliques. Schématiquement, il est admis que l'insuline stimule les voies anaboliques permettant le stockage de macromolécules (glycogène, lipides et protéines) et inhibe la synthèse de glucose et d'acide gras.

- Action de l'insuline sur la production hépatique du glucose

L'équilibre du métabolisme glucidique dans le foie est maintenu par une balance entre stockage de glucose sous forme de glycogène via la glycogénogenèse et production de glucose. En période de jeûne, le foie est capable de produire du glucose par deux mécanismes : la glycogénolyse et la néoglucogenèse. La glycogénolyse correspond à la production de glucose à partir des stocks de glycogène tandis que la néoglucogenèse permet la synthèse de glucose à partir d'autres substrats tels que le lactate, les acides aminés ou le glycérol. Ces deux mécanismes sont regroupés sous le même terme : la production hépatique de glucose.

Contrairement au muscle et au tissu adipeux, l'insuline n'agit pas directement sur le transport de glucose dans le foie. Cependant, elle est impliquée dans la régulation hépatique de l'homéostasie du glucose en diminuant fortement la PHG et en augmentant la synthèse de glycogène. (Petersen & Shulman 2018). En effet, la fixation de l'insuline sur son récepteur hépatique permet l'activation de la voie de signalisation médiée par PI3K/AKT et la phosphorylation du facteur de transcription FOXO1 (*Forkhead box protein O1*) (Brunet *et al.* 1999). Or, la phosphorylation de FOXO1 bloque sa translocation nucléaire inhibant ainsi la transcription de ces gènes cibles (Brunet *et al.* 1999). L'activation de FOXO1 est associée à (i) une augmentation de la transcription des enzymes impliquées dans la néoglucogenèse (*e.g.*, Glucose-6-phosphatase) ; et (ii) une diminution de l'expression de GCK impliquées dans la synthèse de glycogène. Ainsi, l'inactivation de FOXO1 par l'insuline permet une diminution de la PHG et une activation des voies de la glycogénogenèse. **Figure 6**

L'insuline peut alors agir directement via son récepteur pour réguler le métabolisme hépatique cependant d'autres études suggèrent que cet effet peut être aussi médié par une action indirecte de l'insuline (Lewis *et al.* 2021; Rahman *et al.* 2021). Effectivement, comme nous l'avons déjà vu, l'insuline diminue la lipolyse dans le tissu adipeux ainsi que la synthèse de glucagon entraînant

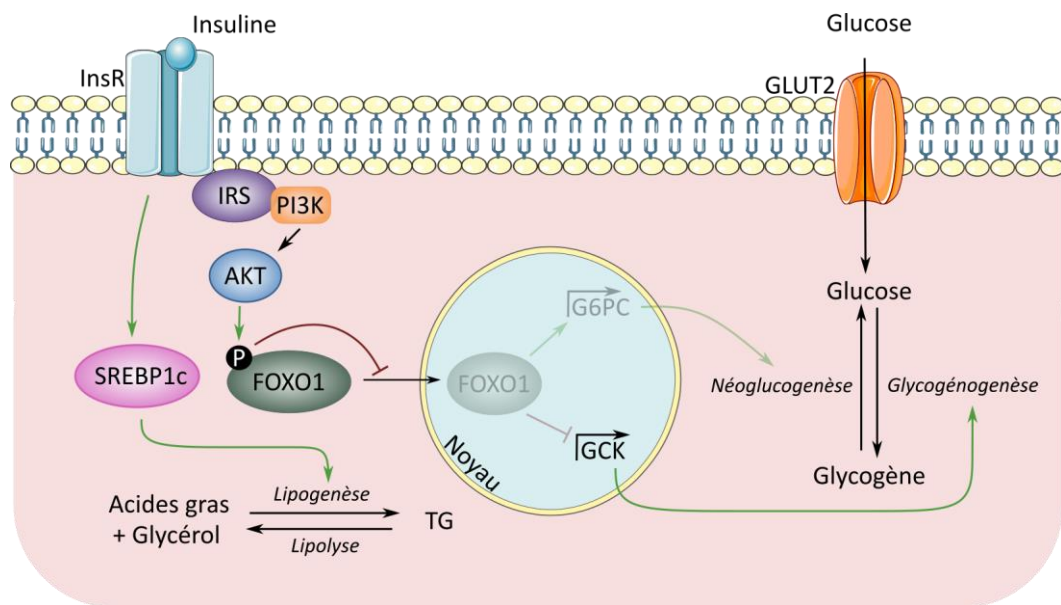


Figure 6. Représentation simplifiée de l'action de l'insuline dans le foie

La fixation de l'insuline sur son récepteur permet le recrutement des protéines IRS ce qui entraîne l'activation de la voie de signalisation médiée par PI3K/AKT. La phosphorylation de FOXO1 (*Forkhead box protein O1*) par AKT inhibe sa translocation dans le noyau, permettant d'inactiver la transcription des enzymes responsables de la néoglucogenèse (Glucose-6-phosphatase, G6PC) et d'activer la transcription des enzymes de la glycogénogenèse (Glucokinase, GCK). De plus, l'insuline permet l'activation de SREBP1c ce qui favorise la lipogenèse hépatique.

Modifier d'après Pertersen et Shulman 2018

indirectement une diminution de la PHG. De plus, le métabolisme hépatique est aussi modulé par l'action centrale de l'insuline que nous détaillerons par la suite.

- Action de l'insuline sur la lipogenèse hépatique

Parallèlement à son action dans le métabolisme du glucose, l'insuline participe également au métabolisme lipidique hépatique. Ce dernier peut se résumer en 3 grands processus : (i) la récupération des acides gras libres plasmatiques ainsi que la production d'acide gras ; (ii) la production d'énergie via la β oxydation des acide gras ; et (iii) le stockage de lipides sous forme de triglycérides par la lipogenèse. Même s'il ne s'agit pas de son rôle principal, cette capacité du foie à stocker des triglycérides est un mécanisme extrêmement important dans la physiopathologie du DT2 notamment via la stéatose hépatique.

L'action de l'insuline sur le foie permet de réguler le stockage de lipides à partir de glucose en augmentant la transcription des gènes impliqués dans la lipogenèse hépatique. Cette régulation s'opère grâce à l'action stimulante de l'insuline sur le facteur de transcription SREBP-1c qui comme nous l'avons mentionné dans le tissu adipeux, permet d'augmenter la transcription des enzymes impliquées dans la lipogenèse (Jelenik *et al.* 2017).

1.2. Le glucagon

Le glucagon représente la deuxième principale hormone pancréatique impliquée dans l'homéostasie du glucose. Le glucagon (pour *GLUC*ose-*AGON*ist) est sécrété par les cellules α des îlots pancréatiques en condition d'hypoglycémie. Son action sur ses tissus cibles (le foie principalement) induit une augmentation de la production endogène de glucose et par conséquent une augmentation de la glycémie.

1.2.1. La régulation de la sécrétion de glucagon

La sécrétion du glucagon est fortement impactée par les variations des concentrations plasmatiques du glucose (Janah *et al.* 2019). Comme pour l'insuline, via l'implication de canaux ioniques, la sécrétion du glucagon par les cellules α requiert un changement de potentiel

membranaire (Müller *et al.* 2017). Cette stimulation est glucose-dépendante mais, contrairement à l'insuline, le glucagon est sécrété en condition d'hypoglycémie. En effet, les canaux potassiques de la cellule α pancréatique sont beaucoup plus sensibles aux variations d'ATP intracellulaire induites par l'entrée cellulaire du glucose. Par conséquent, les canaux potassiques se ferment lorsque les concentrations de glucose plasmatiques sont plus basses que pour la cellule β . La fermeture de ces canaux K^+ ATP-dépendants induit l'ouverture des canaux sodiques et calciques permettant alors l'exocytose des granules de sécrétion de glucagon. Cependant, lors d'une forte concentration en glucose, les niveaux d'ATP intracellulaires sont tels qu'ils conduisent à une fermeture des canaux sodiques et calciques inhibant alors la sécrétion du glucagon dans la circulation (Quesada *et al.* 2008).

D'autres effecteurs sont capables de réguler la libération du glucagon. C'est le cas par exemple de la somatostatine, des acides aminés, ou encore de l'insuline. En effet, la fixation de l'insuline sur son récepteur à la membrane des cellule α module les canaux K^+ favorisant une hyperpolarisation membranaire et donc l'inhibition de la sécrétion de glucagon (Franklin *et al.* 2005). Par ailleurs, la capacité des incrétines à moduler la sécrétion d'insuline en cas d'hyperglycémie participe aussi, indirectement, à la régulation de la sécrétion de glucagon.

1.2.2. Le mode d'action du glucagon

Le glucagon agit principalement sur le foie afin d'inhiber les voies de la glycogénèse et de la glycolyse et de stimuler les voies de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse. Finalement, le glucagon permet une augmentation de la glycémie en augmentant la PHG.

La fixation du glucagon sur son récepteur hépatique induit une activation de la voie de signalisation médiée par l'adénylate cyclase et la PKA. L'activation de la PKA stimule la phosphorylation de plusieurs enzymes impliquées dans la glycogénolyse telles que la glycogène phosphorylase. Or l'activation de la glycogène phosphorylase contribue à la production de glucose-6-phosphate à partir de glycogène puis du glucose par l'action de la glucose-6-phosphatase (Müller *et al.* 2017). Parallèlement à son action sur la glycogénolyse, il a été montré que le glucagon inhibait la glycogénogénèse par la diminution de l'activité de la glycogène synthase (Müller *et al.* 2017). Via son action sur la PKA, le glucagon inhibe aussi les enzymes impliquées dans la glycolyse et stimule celles impliquées dans la néoglucogénèse. Ainsi, par l'ensemble de ces actions, le glucagon stimule fortement la PHG.

1.3. Les incrétines

La détection du glucose sanguin par les cellules β n'est pas le seul élément déclencheur de la sécrétion d'insuline. En effet, l'arrivée dans l'intestin du glucose mais aussi des autres macronutriments activent fortement la sécrétion d'hormones intestinales insulinothropes. Ces hormones sont responsables de l'effet incrétine.

1.3.1. L'effet incrétine

L'effet incrétine renvoie à un phénomène qui a été pour la première fois mesuré en 1967 par Perley et Kipnis qui ont démontré que la stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose est moins importante lorsque le glucose est injecté par voie intraveineuse comparativement à l'administration du glucose par voie orale. Ces résultats mettent donc en exergue que des signaux émis par le tractus gastro-intestinal en réponse à l'arrivée du glucose favorise la sécrétion d'insuline (Perley & Kipnis 1967). Aujourd'hui, des études ont montré que l'effet incrétine était responsable de près de 70% de la GSIS chez le sujet sain et que les deux principales hormones responsables de ce phénomène étaient le GIP (pour *glucose-dependent insulintropic polypeptide*) et le GLP-1 (pour *glucagon like peptide-1*) (Parker *et al.* 2010; Ahrén *et al.* 2020).

1.3.2. La sécrétion des incrétines

Le GIP et le GLP-1 sont deux hormones intestinales produites par les cellules entéro-endocrines K et L respectivement (Pais *et al.* 2016). La sécrétion de ces deux hormones est détectée très précocement après une prise alimentaire. En effet, les concentrations de GIP mais aussi de GLP-1 augmentent quelques minutes après une charge orale en glucose jusqu'à atteindre une concentration maximale à 1h de l'ingestion. Ensuite, les concentrations diminuent progressivement durant quelques heures jusqu'à leur niveau basal (Meier *et al.* 2007; Bagger *et al.* 2011; Nauck & Meier 2018). Cette cinétique de sécrétion correspond au passage des nutriments dans le duodénum. En effet, l'arrivée du glucose dans l'intestin permet de stimuler la sécrétion des deux incrétines (Schirra *et al.* 1996; Parker *et al.* 2010). Le mécanisme moléculaire permettant la sécrétion du GIP et du GLP-1 par les cellules entéro-endocrines est encore mal connu,

cependant, un mécanisme semblable à celui de l'insuline par la cellule β est actuellement envisagé.

Ce mécanisme requiert le cotransporteur sodium/glucose SGLT1 puisque les souris déficientes pour ce dernier présentent un défaut de sécrétion de GIP et de GLP-1 après une charge orale en glucose (Gorboulev *et al.* 2012). Ce transporteur favorise l'entrée cellulaire simultanée de sodium et de glucose qui conduit à une modification du potentiel membranaire et l'exocytose des incrétines. En outre, la transformation du glucose en ATP par les glucokinases et les mitochondries active la fermeture des canaux potassiques favorisant également l'exocytose et la sécrétion du GLP-1 et du GIP **Figure 7**.

Comme nous l'avons vu, ces deux hormones ne sont pas sécrétées par le même type cellulaire. Les cellules L intestinales synthétisent le GLP-1 et sont principalement situées dans l'iléon et le colon tandis que les cellules K, qui produisent le GIP, sont situées principalement dans le duodénum. Le glucose atteint donc dans un premier temps les cellules L proximales puis les cellules K qui sont plus distales. Si le glucose constitue le stimulus principal de la sécrétion des deux incrétines, nous devrions observer une sécrétion différée des deux hormones. Or, la sécrétion des deux hormones s'effectue simultanément ce qui suggère un second mécanisme facilitant la sécrétion du GLP-1. Aujourd'hui ce mécanisme n'est pas encore connu, certaines études suggèrent une implication du système nerveux entérique ou encore une régulation directe par le peptide GIP (Nauck & Meier 2018). La mise en évidence de cellules entéro-endocrines co-exprimant à la fois GIP et le GLP-1 dans le duodénum soutient également cette hypothèse (Mortensen *et al.* 2000, 2003).

1.3.3. L'effet insulino-trope des incrétines

Le GIP et le GLP-1 ainsi sécrétés en réponse au passage des nutriments dans l'intestin vont ensuite atteindre leur cible principale : la cellule β pancréatique. Ces deux incrétines possèdent chacune un récepteur qui leur est spécifique et fortement exprimé par les cellules β (Holst 2019). Ces deux récepteurs sont couplés à une protéine G et activent la voie de l'adénylate cyclase et de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc)/PKA. L'augmentation de l'AMPc favorise la libération de calcium par le réticulum endoplasmique (Müller *et al.* 2017). Or, comme nous l'avons vu, l'augmentation du calcium intracellulaire permet l'exocytose des granules de sécrétion contenant l'insuline. Cependant, ce mécanisme d'action ne permet pas à lui seul d'activer la

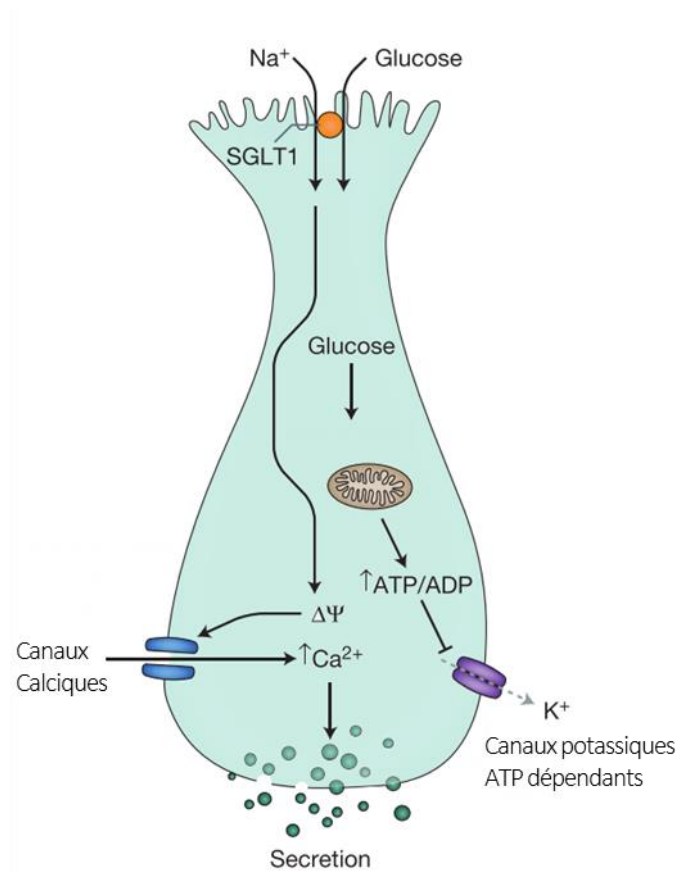


Figure 7. Mécanisme de sécrétion des incrétines

Le transporteur SGLT1 permet une entrée simultanée de glucose et de sodium dans les cellules intestinale. L'entrée de sodium associée à une ouverture des canaux potassique ATP dépendants entrainent un changement de potentiel membranaire ce qui permet la sécrétion des vésicules contenant les incrétines.

$\Delta\psi$: Changement de potentiel membranaire

D'après Parker *et al.* 2010

sécrétion d'insuline car l'exocytose nécessite la fermeture des canaux potassiques afin d'induire une dépolarisation membranaire, mécanisme déclenché par l'augmentation des taux de glucose et donc par l'hyperglycémie (Nauck & Meier 2018). Le GLP-1 est également capable d'augmenter l'expression de la GCK et de GLUT2, favorisant ainsi l'entrée du glucose dans la cellule β ainsi que son métabolisme (Buteau *et al.* 1999). GLP-1 et GIP permettent donc de potentialiser l'effet du glucose sur la sécrétion d'insuline et d'induire une sécrétion insulino-dépendante

Bien qu'il soit difficile de déterminer la contribution propre de ces deux hormones dans l'effet incrétine global, l'utilisation d'inhibiteur des récepteurs du GIP et du GLP-1 a mis en évidence que le GIP était plus efficace pour stimuler la GSIS que le GLP-1 (Gasbjerg *et al.* 2019). De plus, l'utilisation de modèles de souris déficientes pour le récepteur du GLP-1, du GIP ou pour les deux récepteurs a mis en évidence un effet additif des deux incrétones. En effet, les souris déficientes pour l'un ou l'autre des récepteurs présentaient un défaut de la GSIS moins prononcé que les souris invalidées pour les deux récepteurs (Preitner *et al.* 2004; Hansotia & Drucker 2005). Enfin, parallèlement à leur effet insulino-trope, les incrétones, et particulièrement le GLP-1, pourraient augmenter la prolifération et inhiber l'apoptose des cellules β pancréatiques (Fehmann & Habener 1992; Stoffers *et al.* 2000; Egan *et al.* 2003; Maida *et al.* 2009).

1.3.4. Autres actions des incrétones dans la régulation périphérique de la glycémie

En activant fortement la sécrétion d'insuline, les incrétones agissent indirectement sur le foie, le muscle et le tissu adipeux pour réguler la glycémie. Bien qu'il soit difficile expérimentalement de les distinguer des effets indirects via l'insuline, quelques études rapportent des effets directs et spécifiques des incrétones sur le foie et le tissu adipeux.

1.3.4.1. Effet du GIP sur le tissu adipeux

Le GIP contribue à la régulation lipidique. En effet, il faut souligner tout d'abord que le récepteur du GIP est exprimé par les adipocytes chez l'Homme (Yip *et al.* 1998; Weaver *et al.* 2008). Dans les modèles génétiques et pharmacologiques murins inhibant la signalisation du GIP, l'accumulation lipidique dans les adipocytes ainsi que leur taille sont fortement diminuées ; une réduction de l'accumulation des triglycérides dans le foie et le muscle est également observée. (Miyawaki *et al.* 2002).

Dans les modèles de culture de pré-adipocytes traités par GIP, une augmentation de l'activité de la LPL ainsi qu'une augmentation du stockage de lipides intracellulaires sont décrits. (Eckel *et al.* 1979; Miyawaki *et al.* 2002; Getty-Kaushik *et al.* 2006; Kim *et al.* 2007). Ainsi, l'action du GIP sur le tissu adipeux s'apparente à celle de l'insuline et plusieurs travaux rendent compte d'un effet synergique de ces deux hormones sur la LPL. (Knapper *et al.* 1995).

Parallèlement, d'autres études rapportent que le GIP stimule aussi la lipolyse lorsque l'insulinémie est basse via notamment la production de cytokines pro-inflammatoires (Timper *et al.* 2013) et l'augmentation de la phosphorylation de HSL (McIntosh *et al.* 1999). Ceci a également été rapporté chez des patients déficients en insuline (Heimbürger *et al.* 2021). Cet effet lipolytique du GIP est cependant aboli en présence d'insuline de sorte que cette dernière semble finalement être un facteur déclenchant dans le basculement de l'effet lipolytique de GIP vers un effet stimulateur de la lipogénèse **Figure 8**.

1.3.4.2. Effet de GLP-1 sur la production hépatique de glucose

Parallèlement aux effets sur la cellule β , d'autres actions du GLP-1 sont relayées par le système nerveux (CF Chapitre 1- 2.5.1.1) et directement sur l'hépatocyte. En effet, le récepteur du GLP-1 est exprimé dans ce type cellulaire (Gupta *et al.* 2010; Panjwani *et al.* 2013). Comme pour le GIP, il est difficile de distinguer l'effet direct du GLP-1 sur le foie de l'effet indirect via son effet insulinothrompe. Cependant, Seghieri et coll ont effectué, chez le sujet sain, des infusions de GLP-1 conjointement à un inhibiteur de la sécrétion d'insuline et de glucagon. Dans ces conditions expérimentales, la PHG était réduite de 27% (Seghieri *et al.* 2013), les déterminants de cet effet ne sont pas clairs, le rôle des métabolites du GLP-1 n'étant pas exclu. En effet, produit par l'intestin, le GLP-1 est très rapidement dégradé par la peptidase DPP4 (pour *dipeptidyl peptidase-4*) et les endopeptidases NEP (pour *neutral endopeptidase*) en différents métabolites tels que le GLP-1₉₋₃₆ et le GLP-1₂₈₋₃₆. Bien qu'initialement considérés comme métabolites inactifs, des études plus récentes ont montré que l'injection de ces composés était responsable d'une diminution importante de la PHG (Elahi *et al.* 2008; Tomas *et al.* 2010, 2011b; a; Ip *et al.* 2013).

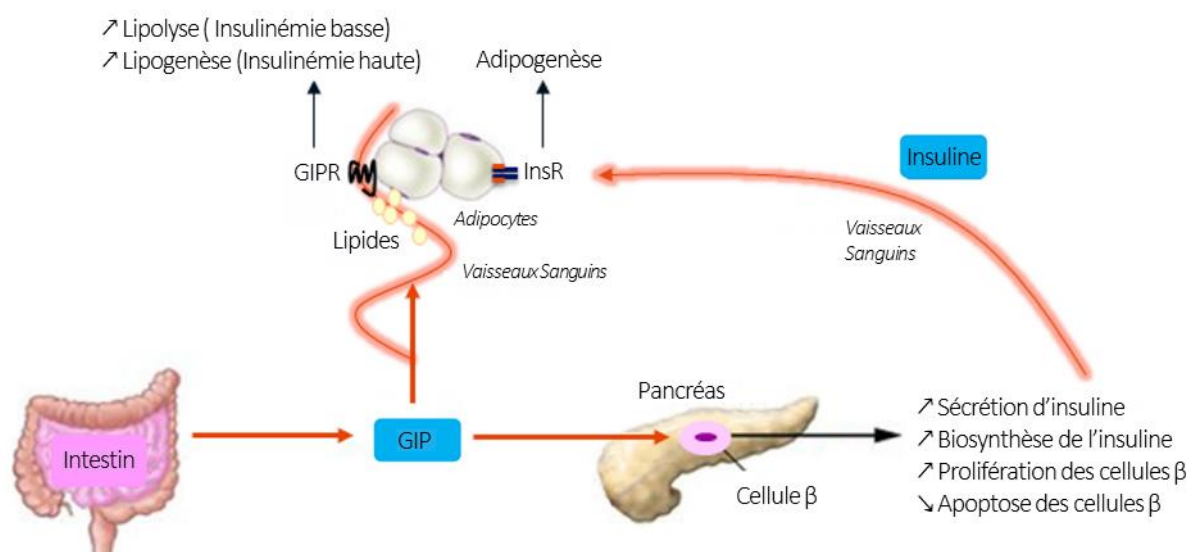


Figure 8. Action directe et indirecte du GIP sur le tissu adipeux

L'action du GIP sur le pancréas entraîne une augmentation de la synthèse et de la sécrétion d'insuline ainsi qu'une augmentation de la prolifération et de la survie des cellules β . De plus, l'action de GIP sur les adipocytes peut entraîner à la fois une augmentation de la lipolyse et de la lipogénèse en fonction des concentrations plasmatiques d'insuline.

GIPR : récepteur du GIP ; InsR : récepteur de l'insuline

D'après Møller et al. 2016

2. La régulation centrale de la glycémie

L'hypothèse d'une régulation centrale de la glycémie a été proposée pour la première fois par Claude Bernard en 1855 par la description de l'effet hyperglycémiant de la lésion du plancher du 4^e ventricule chez le lapin. Malgré ces premières observations, la découverte de l'insuline en 1921 a plutôt focalisé la recherche scientifique concernant la régulation de la glycémie autour du pancréas. La régulation de la glycémie était alors considérée comme exclusivement périphérique et centrée sur les hormones pancréatiques et sur leurs tissus cibles. Cependant, aujourd'hui de nombreuses études rendent compte d'une coopération étroite entre le cerveau et les organes périphériques.

2.1. L'hypothalamus, le centre de régulation de l'homéostasie énergétique

Du fait de sa localisation anatomique, l'hypothalamus, particulièrement le noyau arqué (ARC), joue un rôle déterminant dans la détection des signaux métaboliques et hormonaux périphériques. En effet, l'ARC borde le 3^e ventricule ainsi que l'éminence médiane (EM). Cet organe, localisé au niveau du plancher du 3^e ventricule, présente la particularité d'avoir une barrière hémato-encéphalique (BHE) fenestrée autorisant ainsi le passage sélectif de signaux périphériques tels que les nutriments (glucose, acides gras, acides aminés) et certaines protéines ou hormones **Figure 9**. Ainsi l'EM permet d'informer en permanence le noyau arqué de l'état nutritionnel et hormonal de l'organisme (Martínez *et al.* 2019).

Cent ans après la découverte de Claude Bernard, des neurones sensibles au glucose furent identifiés (Anand *et al.* 1964; Oomura *et al.* 1969; Lundqvist *et al.* 2019). L'étude de ces neurones permet aujourd'hui de distinguer précisément deux populations neuronales : les neurones excités (GE) par le glucose dont l'activité augmente avec la glycémie et ceux inhibés par le glucose (GI) dont l'activité diminue avec l'augmentation de la glycémie (Yoon & Diano 2021). Ces neurones sont largement distribués dans le SNC mais principalement dans les différents noyaux de l'hypothalamus tels que l'hypothalamus ventro médian (VMH), l'ARC, le noyau paraventriculaire (PVN) et l'aire hypothalamique latérale (LHA) (Ruud *et al.* 2017) **Figure 10**. Ces neurones sont aussi présents dans des noyaux extra-hypothalamiques tels que le noyau du tractus solitaire (NTS) et le noyau moteur du nerf vague (DMNX) leur permettant ainsi de capter différents signaux périphériques et de les retransmettre à l'hypothalamus (Geerling *et al.* 2010).

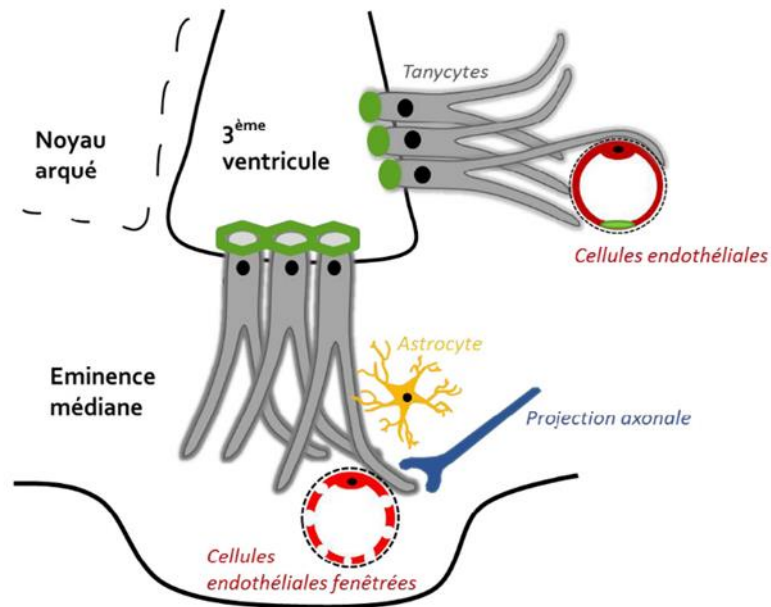


Figure 9. Représentation schématique de l'interface sang-hypothalamus.

Le noyau arqué est situé à proximité du 3^e ventricule et de l'éminence médiane. Les tanycytes, les astrocytes, et les projections axonales captent les signaux périphériques grâce à l'épithélium fenêtré de l'éminence médiane ce qui permet aux neurones du noyau arqué d'être informé des besoins énergétiques de l'organisme.

D'après Langlet *et al.* 2014

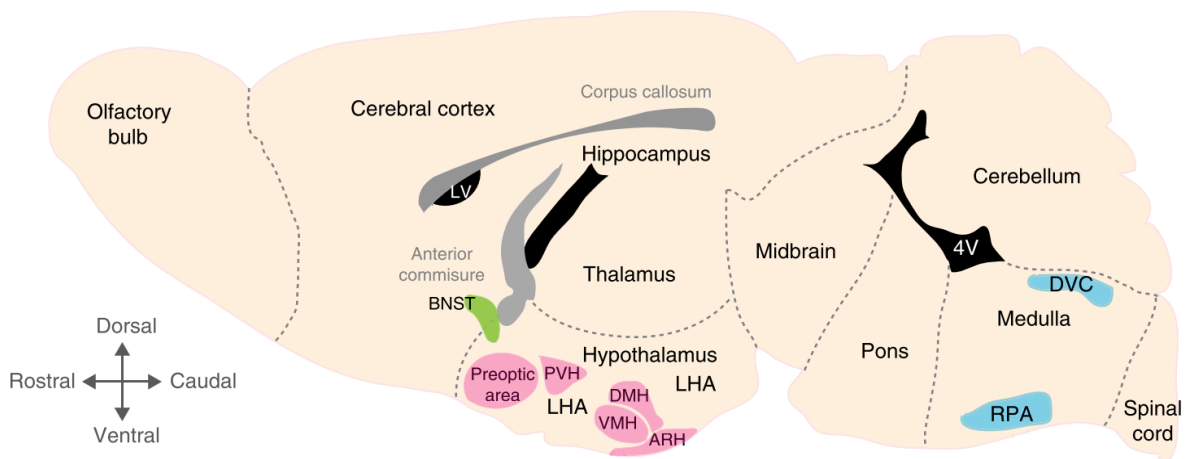


Figure 10. Régions clés du système nerveux central impliquées dans la régulation de la glycémie

Hypothalamus (Rose), BNST : noyau du lit de la strie terminale (Vert) et Bulbe rachidien (Bleu).

4V : 4e ventricule ; ARH : noyau arqué ; DMH : hypothalamus dorso-médian ; DVC : complexe vagal dorsal ; LHA : aire hypothalamique latérale ; LV : ventricule latéral ; PVH : noyau paraventriculaire ; RPA : noyaux raphé ; VMH : hypothalamus ventro-médian

D'après Ruud *et al.* 2017

L'ARC comporte deux populations neuronales gluco-sensibles distinctes : les neurones sécrétant le neuropeptide Y (NPY) et l'*agouti-related protein* (AgRP) et les neurones sécrétant la pro-opio-mélanocortine (POMC). Ces deux populations neuronales présentent la particularité de réguler l'homéostasie énergétique de façon opposée (Timper & Brüning 2017; Yoon & Diano 2021). En effet, les épisodes de prise alimentaire associés à l'augmentation de la glycémie activent les neurones POMC responsables de la sécrétion d'*α-melanocyte stimulating hormone* (α -MSH). L' α -MSH, en se fixant sur son récepteur présent dans les neurones de l'ARC, du PVN, de la LHA et du VMH, diminue alors la prise alimentaire et augmente la dépense énergétique. *A contrario*, lors des épisodes de jeûne ou lorsque la glycémie est basse, les neurones NPY/AgRP sont activés. Ces neurones stimulent la prise alimentaire et diminuent la dépense énergétique par l'action de NPY et d'AgRP sur leur récepteur spécifique dans la LHA et dans le PVN principalement (Timper & Brüning 2017; Yoon & Diano 2021).

L'activité de ces deux populations neuronales impliquée dans la régulation de la balance énergétique est modulée par la détection des signaux périphériques métaboliques et hormonaux. En effet, des études d'électrophysiologie ont montré qu'une augmentation des niveaux de glucose extra-cellulaire dans l'ARC inhibe l'activité des neurones NPY/AgRP et excite les neurones POMC (Muroya *et al.* 1999; Ibrahim *et al.* 2003; Mountjoy *et al.* 2007). Les neurones NPY/AgRP constituent alors des neurones de type GI alors que les neurones POMC sont plutôt des neurones de type GE (Pozo & Claret 2018).

Les neurones POMC et NPY/AgRP de l'ARC ne sont pas seuls à détecter les modifications de glucose extracellulaire. En effet, une sous population neuronale du VMH et de la LHA (dans lesquels les neurones de l'ARC projettent), est gluco-sensible et comporte à la fois des neurones GE et GI. L'activité des neurones GI est essentielle à la contre régulation de l'hypoglycémie alors que les neurones GE du VMH sont impliqués dans la régulation de la sécrétion périphérique des hormones pancréatiques par le SNC (*CF Chapitre 1-2.2*).

2.1.1. Les mécanismes moléculaires du « *glucose-sensing* »

Les mécanismes moléculaires qui permettent aux neurones GE de s'activer lorsque la glycémie augmente ressemblent fortement aux mécanismes de sécrétion de l'insuline par la cellule β . En effet, comme pour la cellule β , les neurones GE expriment le transporteur de glucose GLUT 2 ainsi que la glucokinase (Leloup *et al.* 1994; Lynch *et al.* 2000; Dunn-Meynell *et al.* 2002; Arluison *et al.*

2004; Kang *et al.* 2004). Incorporé dans les neurones, le glucose est ensuite phosphorylé par la GCK ce qui augmente les concentrations d'ATP intra-cellulaire. Cette augmentation d'ATP entraîne alors la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants et la dépolarisation membranaire et enfin la sécrétion des neurotransmetteurs (Ashford *et al.* 1990; Kang *et al.* 2004) **Figure 11A**.

En revanche, les mécanismes qui permettent aux neurones GI d'être activés en condition d'hypoglycémie et inhibés en condition d'hyperglycémie sont moins bien connus. Les neurones GI expriment également le transporteur GLUT2 et la GCK (Kang *et al.* 2004, 2006). L'activation des neurones GI nécessiterait aussi la mobilisation de l'AMP kinase (AMPK) (Mountjoy *et al.* 2007). En effet, l'activité de l'AMPK est fortement dépendante des concentrations intracellulaires d'AMP. Or, les concentrations d'AMP augmentent en condition de déficit énergétique (Hardie & Carling 1997; Kahn *et al.* 2005; Hardie *et al.* 2006). Ainsi l'AMPK est activée lorsque les concentrations de glucose sont basses entraînant la fermeture des canaux chlorures, la dépolarisation membranaire et la sécrétion des neurotransmetteurs (Song & Routh 2005). *A contrario*, lorsque les concentrations de glucose augmentent, l'AMPK est inactive et les canaux chlorures restent ouverts, aboutissant à une hyperpolarisation membranaire et donc l'inactivation des neurones GI **Figure 11B**.

2.1.2. Implication des cellules non neuronales

Les astrocytes et les tanocytes jouent un rôle important dans la communication entre les cellules en favorisant les échanges de nutriments et de signaux métaboliques avec les neurones (Fuente-Martín E *et al.* 2019).

Les tanocytes bordent la paroi du 3^e ventricule ainsi leurs corps cellulaires sont en contact direct avec le liquide céphalo-rachidien (LCR) alors que leurs projections sont en contact avec les neurones hypothalamiques (Fuente-Martín *et al.* 2019). Les astrocytes sont localisés à proximité de la BHE et projettent, comme les tanocytes, jusqu'aux neurones hypothalamiques (Fuente-Martín *et al.* 2019). Comme pour les neurones, la détection des signaux métaboliques périphériques par les tanocytes et les astrocytes nécessite le transporteur GLUT2, la GCK et les canaux potassiques ATP-dépendants qui sont tous trois exprimés par ces deux populations cellulaires (Maekawa *et al.* 2000; García *et al.* 2003). En effet, l'inhibition de GLUT2 spécifiquement dans les tanocytes réduit la capacité de l'hypothalamus à réguler la glycémie (Barahona *et al.* 2018). Par ailleurs, la réexpression de GLUT 2 dans les astrocytes spécifiquement chez des souris qui

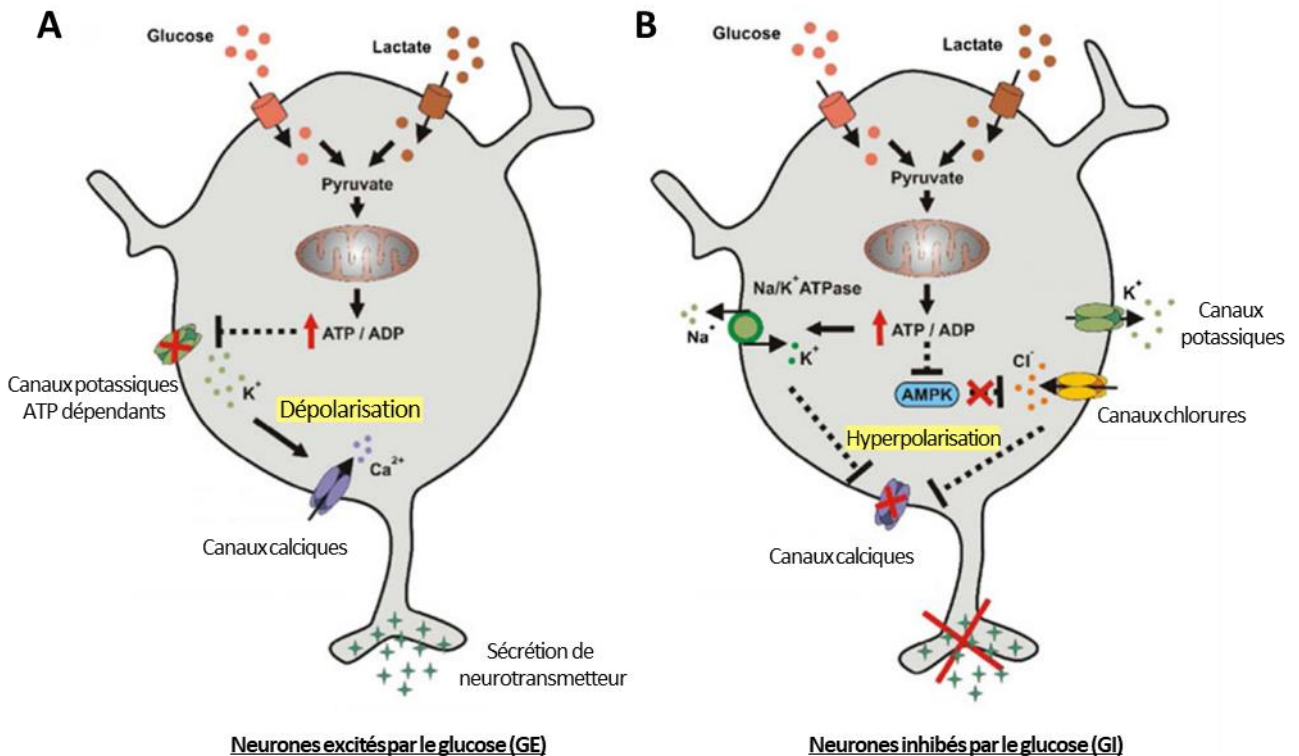


Figure 11. Mécanisme de "glucose sensing" des neurones glucosensibles

A : L'augmentation de la concentration intracellulaire de glucose induite par le transporteur GLUT 2 augmente le ratio ATP/ADP ce qui entraîne la fermeture des canaux potassiques ATP dépendants et la dépolarisation membranaire. Cette modification de potentiel membranaire provoque l'ouverture des canaux calciques et augmente l'activité neuronale ainsi que la sécrétion de neurotransmetteurs.

B : Dans les neurones GI, l'augmentation du ratio ATP/ADP inhibe l'activité de l'AMP Kinase (AMPK) ce qui maintient les canaux chlorures ouverts. La membrane plasmique est alors hyperpolarisée ce qui inhibe la sécrétion de neurotransmetteurs.

D'après Jordan *et al.* 2010

n'expriment pas ce transporteur permet de restaurer la réponse centrale à l'hypoglycémie (Marty *et al.* 2005). Ces résultats indiquent alors que les astrocytes et les tanocytes jouent un rôle dans le système gluco-régulateur central. Ainsi, les cellules gliales sont capables de détecter les variations de glycémie et jouent donc un rôle important dans la transmission de ces signaux aux neurones gluco-sensibles de l'hypothalamus.

2.1.3. L'importance des afférences nerveuses dans l'intégration des signaux métaboliques par le SNC

Renseigné grâce aux astrocytes, aux tanocytes et à l'épithélium fenestré de l'éminence médiane, l'hypothalamus reçoit aussi en permanence des signaux nerveux afférents provenant des neurones périphériques. Certains neurones qui innervent la veine hépatoportale et le tractus gastro-intestinal sont gluco-sensibles et transmettent des informations métaboliques à l'hypothalamus (Bentsen *et al.* 2019).

Le tractus gastro-intestinal est fortement innervé par des neurones gluco-sensibles. Dès la cavité buccale, l'ingestion de glucose induit une stimulation nerveuse qui projette jusque dans le NTS, le noyau parabrachial et le DMNX (Berthoud *et al.* 1981; Berthoud & Powley 1990). Dans l'intestin, l'arrivée du glucose ainsi que la libération des incrétines favorisent l'activation du système nerveux entérique qui projette jusque dans le NTS (Thorens & Larsen 2004).

Par ailleurs, les nutriments absorbés par le tractus gastro-intestinal ainsi que les incrétines (GLP-1, GIP...) sont transportés directement par la veine hépatoportale jusqu'au foie puis dans la circulation générale. Le gradient de glucose observé entre la veine hépatoportale et la circulation générale après un repas constitue un signal dit « portal » qui active les afférences vagales. Ces afférences du nerf vague observées dans la veine porte projettent jusque dans le SNC et notamment dans le NTS ; mais aussi dans l'hypothalamus (LHA, PVN) (Adachi *et al.* 1984; Shimizu *et al.* 2012).

L'intégration de ces signaux neuronaux par les différents noyaux de l'hypothalamus associée à la détection directe des variations de glucose par les neurones et les cellules gliales, permettent à l'hypothalamus de réguler la prise alimentaire mais aussi la glycémie en modulant d'une part l'utilisation du glucose par les organes périphériques et d'autre part la production des hormones pancréatiques **Figure 12.**

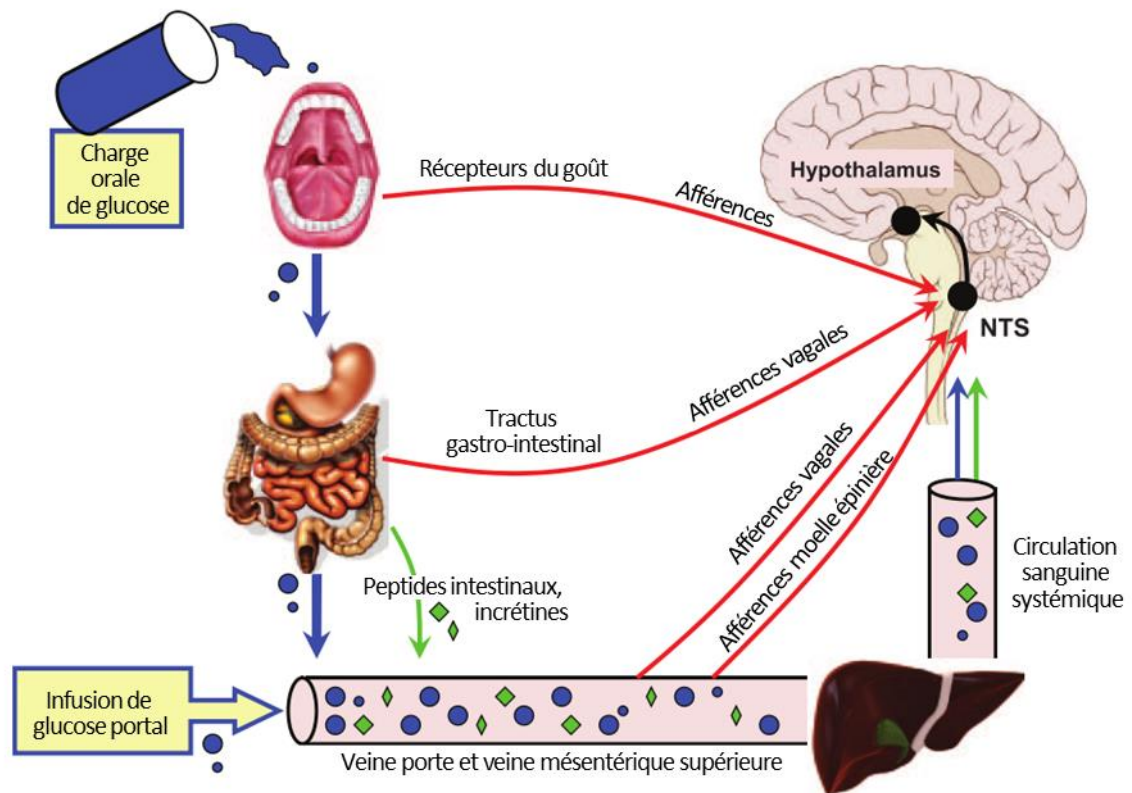


Figure 12. Intégration des signaux périphériques métaboliques par l'hypothalamus

L'arrivée du glucose dans la cavité buccale, le tractus intestinal et la veine porte entraîne une activation des afférences vagales. Par ailleurs, l'arrivée du glucose dans le duodénum entraîne la libération des peptides intestinaux dans la veine porte ce qui active les afférences vagales portales et de la moelle épinière. Ces influx nerveux sont alors transmis aux neurones du tractus solitaire puis dans l'hypothalamus.

Modifié d'après Donovan et al. 2009

2.2. Le cerveau contrôle la sécrétion périphérique des hormones pancréatiques

Les signaux métaboliques telle que l'arrivée de glucose dans le tractus gastro-intestinal ou dans la veine porte sont intégrés dans le SNC et sont retransmis au pancréas par l'intermédiaire de fibres nerveuses descendantes. En effet, le pancréas est fortement innervé par des fibres nerveuses sympathiques (nerf splanchnique) et parasympathiques (nerf vague) (Osundiji & Evans 2013). Les neurotransmetteurs et neuropeptides libérés par ces fibres nerveuses tels que l'acétylcholine, le polypeptide vasoactif intestinal (VIP) ou encore le PACAP (*Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) peuvent se lier à leurs récepteurs respectifs exprimés sur les cellules α et/ou β pancréatiques et contrôler la sécrétion d'insuline et de glucagon (Thorens 2011).

2.2.1. Implication du système nerveux sympathique et parasympathique

Il est admis que la stimulation du système nerveux sympathique conduit à un relargage de noradrénaline qui se fixe sur son récepteur α_2 présent à la fois sur les cellules β et α pancréatiques (Skoglund *et al.* 1988). Ainsi, l'activation du système nerveux sympathique entraîne une augmentation de la sécrétion de glucagon et une diminution de la sécrétion d'insuline (Bloom & Edwards 1984).

En revanche, la stimulation du système nerveux parasympathique conduit à une augmentation de la sécrétion d'insuline et de glucagon (Kaneto *et al.* 1975; Ahrén *et al.* 1986; Kiba 2004). Des études neuro-anatomiques montrent que les régions du SNC impliquées dans l'innervation du pancréas sont principalement représentées par le NTS, l'*area postrema* ainsi que des noyaux hypothalamiques tels que le PVN et l'hypothalamus dorso-médian (DMH) qui sont fortement impliqués dans le *glucose sensing* (Jansen *et al.* 1997; Osundiji & Evans 2013). L'action du nerf vague sur le pancréas s'effectue par la libération d'acétylcholine qui se fixe sur les récepteurs de type M_3 présents sur les cellules α et β (Duttaroy *et al.* 2004; Gautam *et al.* 2006). D'autres neurotransmetteurs tels que le VIP et le PACAP activés par le nerf vague pourraient également être impliqués dans la sécrétion d'insuline (Straub & Sharp 1996).

2.2.2. La régulation de la sécrétion d'insuline par les neurones gluco-sensibles.

Comme nous l'avons vu, les neurones et les cellules gliales sont gluco-sensibles et donc capables de moduler leur activité en fonction des concentrations de glucose extra-cellulaire. L'implication des neurones gluco-sensibles hypothalamiques dans la sécrétion d'insuline a fait l'objet de plusieurs travaux. Tout d'abord, une injection de glucose intra-carotidienne stimule la sécrétion d'insuline sans modification significative de la glycémie (Guillod-Maximin *et al.* 2004). Cet effet insulino-trope est médié par l'activation des neurones du PVN et de l'ARC ainsi que par l'activation des astrocytes (Guillod-Maximin *et al.* 2004). Par ailleurs, l'injection intra-cérébro-ventriculaire (icv) de NPY entraîne une augmentation rapide de la sécrétion d'insuline qui est totalement abolie après vagotomie (Zarjevski *et al.* 1993; Sainsbury *et al.* 1997; Lin *et al.* 2006). *A contrario*, l'injection icv d'agonistes pour les récepteurs aux mélanocortines (MC3R et MC4R) réduit significativement la sécrétion d'insuline, de plus, les souris déficientes pour le MC4R expriment un hyperinsulinisme (Fan *et al.* 2000).

Concernant le glucagon, bien que les mécanismes soient moins bien connus, la régulation centrale de sa sécrétion s'effectuerait principalement au niveau du VMH. En effet, des lésions bilatérales du VMH ou l'inhibition des neurones du VMH diminuent la sécrétion du glucagon en réponse à une hypoglycémie induite (Borg *et al.* 1994; Meek *et al.* 2016). *A contrario*, une stimulation des neurones du VMH augmente la sécrétion de glucagon et une hyperglycémie chez la souris (Meek *et al.* 2016). De façon similaire, l'injection de glucose dans le VMH diminue la réponse à l'hypoglycémie alors que l'induction d'une glucopénie dans ce même noyau la stimule (Borg *et al.* 1995, 1997).

Ainsi, la perception de la glycémie par le SNC permet de réguler finement la sécrétion des hormones pancréatiques. L'insuline et le glucagon agissent ensuite sur leurs différents tissus cibles afin de normaliser la glycémie. Cependant, le passage direct de certaines hormones périphériques et leurs actions dans le SNC permettraient aussi au système nerveux central de réguler l'homéostasie du glucose.

2.3. La régulation centrale de la glycémie par l'insuline

C'est vers les années 70 que fut démontré pour la première fois que l'insuline pouvait réguler la glycémie grâce à son action centrale. En effet des injections par voie intracisternale d'insuline

chez le chien entraînent une diminution significative de la glycémie (Chowers *et al.* 1966; Woods & Porte 1975). Ces premières études démontrent que finalement le cerveau apparaît lui aussi comme un organe insulino-sensible.

2.3.1. La distribution du récepteur de l'insuline et la source de l'insuline dans le SNC

La distribution du récepteur de l'insuline au sein du SNC a été largement étudiée dans les années 90. Ces études ont démontré que le récepteur de l'insuline était amplement distribué dans le SNC tout particulièrement au sein du bulbe olfactif, du cervelet, de l'amygdale mais surtout de l'hypothalamus (Werther *et al.* 1987; Marks *et al.* 1990). Il semble, plus précisément, que le récepteur de l'insuline soit coexprimé avec POMC, NPY et AgRP (Benoit *et al.* 2002) au niveau hypothalamique renforçant ainsi l'hypothèse d'un rôle de l'insuline dans la régulation centrale du métabolisme énergétique. Pour activer son récepteur, l'insuline doit être présente au sein du SNC. L'insuline pourrait alors être produite localement dans le cerveau ou bien être produite par le pancréas et traverser la BHE pour rejoindre le SNC.

Plusieurs études ont confirmé que l'insuline était effectivement bien présente dans le compartiment central. Tout d'abord, des radio-marquages effectués dans des cerveaux de rats objectivent une présence importante d'insuline dans l'hypothalamus (Corp *et al.* 1986). De plus, chez l'Homme, les concentrations d'insuline dans le LCR s'élèvent en moyenne à la hauteur des 10% des insulinémies et elles sont corrélées entre-elles (Heni *et al.* 2014b; Gray & Barrett 2018). Enfin, des infusions intra-veineuses d'insuline sont associées à une augmentation des concentrations d'insuline dans le LCR chez l'Homme et dans les modèles animaux (Wallum *et al.* 1987; Schwartz *et al.* 1990, 1991). Ces données suggèrent donc que l'insuline plasmatique est capable de traverser la BHE pour rejoindre le SNC.

Les mécanismes impliqués dans le passage de l'insuline plasmatique vers le compartiment central sont encore mal définis. Initialement, certaines études avaient montré que le franchissement de la BHE relevait d'un mécanisme dépendant du récepteur de l'insuline. En effet, l'utilisation d'un antagoniste du récepteur de l'insuline chez le rat diminue fortement le passage de l'insuline vers le cerveau (Meijer *et al.* 2016) et réduit l'internalisation de l'insuline dans les cellules endothéliales centrales (Gray *et al.* 2017). Ce mécanisme permettrait alors à l'insuline de rejoindre le compartiment central à l'aide d'un mécanisme

d'endocytose/transcytose. Cependant, d'autres études suggèrent que ce mécanisme serait totalement indépendant du récepteur de l'insuline mais plutôt médié par un transporteur spécifique saturable encore inconnu (Hersom *et al.* 2018; Rhea *et al.* 2018).

Par ailleurs, une production centrale d'insuline n'est pas à exclure. En effet, quelques études ont montré que des lignées cellulaires neuronales avaient la capacité de produire de l'insuline *in vitro* (Mazucanti *et al.* 2019; Scherer *et al.* 2021), ce résultat n'est cependant pas confirmé à ce jour *in vivo* dans le SNC.

2.3.2. Les actions centrales de l'insuline sur le métabolisme glucidique

2.3.2.1. Le contrôle de la PHG par l'action centrale de l'insuline

Plusieurs travaux ont caractérisé l'action centrale directe de l'insuline sur la production hépatique de glucose. Tout d'abord, l'injection dans le troisième ventricule d'oligonucléotides antisens dirigés contre l'ARNm du récepteur de l'insuline induit une augmentation de la production hépatique de glucose ainsi qu'une insulino-résistance hépatique (Obici *et al.* 2002a). Ces résultats ont été reproduits en neutralisant la voie de signalisation insulinique par des anticorps dirigés contre la voie des MAPK ou la voie PI3K (Obici *et al.* 2002b). Par ailleurs, l'effet de l'insuline sur la PHG est relayé par les neurones AgRP. En effet, les souris KO pour le récepteur à l'insuline spécifiquement dans les neurones AgRP présentent une résistance à l'insuline hépatique. L'insuline n'est alors plus capable de réguler la PHG dans ce modèle (Könner *et al.* 2007; Shin *et al.* 2017). Cependant certaines études suggèrent aussi un rôle non négligeable des neurones à POMC dans la régulation centrale de la PHG. Ce rôle des neurones à POMC semble être associé à une action simultanée de l'insuline et de la leptine puisque la délétion des deux récepteurs dans les neurones POMC est nécessaire pour induire un dysfonctionnement de la production endogène de glucose (German *et al.* 2009; Hill *et al.* 2010).

L'action centrale de l'insuline sur la PHG s'opère principalement par une diminution de l'activité du nerf vague hépatique qui induit une augmentation de la sécrétion d'interleukine-6 (IL6) par les cellules de Kupffer (macrophages hépatiques) (Kimura *et al.* 2016). Or, la fixation de l'IL6 sur son récepteur hépatique favorise la phosphorylation de STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) dans les hépatocytes (Inoue *et al.* 2006; Lewis *et al.* 2021). Cette phosphorylation a pour effet d'inactiver STAT3 et *in fine* de diminuer l'expression des enzymes

de la néoglucogénèse (Inoue *et al.* 2004). Ainsi, l'insuline, de par son action hypothalamique, est capable d'inhiber la production hépatique de glucose (Inoue 2016). **Figure 13**

2.3.2.2. Implication de l'action centrale de l'insuline dans la lipolyse

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1-1.1.2.3, l'insuline périphérique permet une inhibition de la lipolyse et active fortement le stockage de lipides dans les adipocytes. Antérieurement, l'action de l'insuline sur le tissu adipeux blanc était limitée à l'action directe de l'insuline sur son récepteur adipocytaire. Cependant, les modèles actuels intègrent les effets centraux de l'insuline dans la régulation du métabolisme lipidique.

Tout d'abord, chez l'Homme, il a été montré que des injections intranasales d'insuline permettent de diminuer les concentrations d'acides gras libres circulants et de réduire fortement la lipolyse (Iwen *et al.* 2014). L'utilisation de modèles animaux a permis, de préciser le mode d'action de l'insuline sur le tissu adipeux. En effet, l'injection icv d'insuline chez le rongeur augmente l'expression de la LpL et diminue l'expression de l'HSL. La régulation du métabolisme lipidique par l'insuline centrale s'opère à la fois par une diminution de la lipolyse et par une augmentation de la lipogénèse (Koch *et al.* 2008; Coomans *et al.* 2011; Scherer *et al.* 2011). Cette action est médiée par les neurones POMC puisque une invalidation du récepteur de l'insuline spécifiquement dans ces neurones induit une insulino-résistance dans le tissu adipeux blanc tandis que cette même délétion dans les neurones AgRP n'a pas d'effet métabolique significatif (Shin *et al.* 2017).

Ainsi, la diminution de la lipolyse et l'augmentation de la lipogénèse induites par l'insuline conduisent à une diminution de la synthèse du glycérol et d'acide gras, substrats indispensables à la néoglucogénèse hépatique et *in fine* engendre une réduction indirecte de la production endogène de glucose (Scherer *et al.* 2021).

En conclusion, l'insuline produite par le pancréas est capable de rejoindre le cerveau en traversant la BHE. Elle pourrait ensuite agir à la fois sur les neurones à POMC et à AgRP afin de réguler négativement la PHG. Parallèlement, l'insuline centrale stimule sa propre sécrétion périphérique notamment en activant son récepteur présent sur les neurones du VMH (Chen *et al.* 1975; Woods & Porte 1975; Yavropoulou *et al.* 2009; Paranjape *et al.* 2011). Enfin, l'insuline ainsi produite peut atteindre ses organes cibles pour réguler l'homéostasie du glucose. **Figure 14**

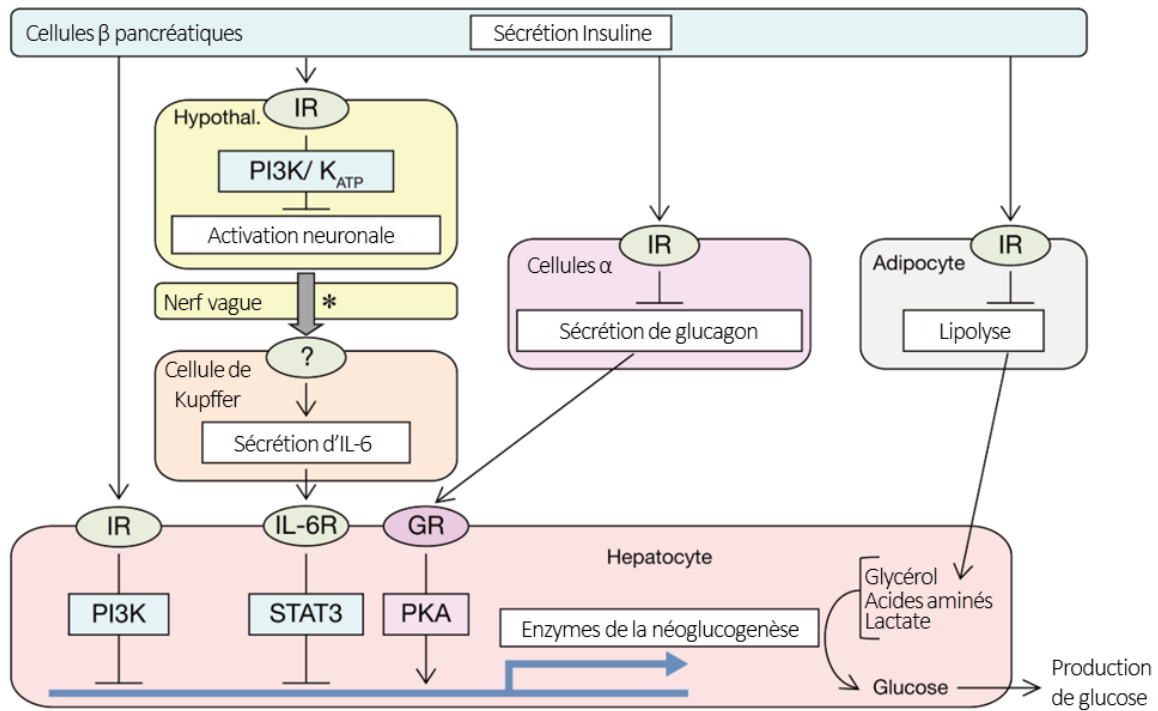


Figure 13. Action directe et indirecte de l'insuline sur la production hépatique de glucose

La sécrétion d'insuline par la cellule β pancréatiques entraîne (i) l'inhibition de la sécrétion de glucagon par son action sur la cellule α pancréatique, (ii) l'inhibition de la lipolyse par son action sur les adipocytes et (iii) l'inhibition de l'expression des enzymes de la néoglucogénèse par son action hépatique. De plus, l'insuline active son récepteur hypothalamique ce qui inhibe l'activité du nerf vague *via* la voie de signalisation PI3K/AKT. La diminution de l'activité du nerf vague stimule la sécrétion d'IL6 par les cellules de Kupffer. L'IL6 active alors son récepteur hépatique inhibant ainsi l'expression des enzymes de la néoglucogénèse et donc la production hépatique de glucose. IR : récepteur de l'insuline ; IL-6R : récepteur de l'IL6 ; GR : Récepteur du glucagon

D'après Inoue *et al.* 2016

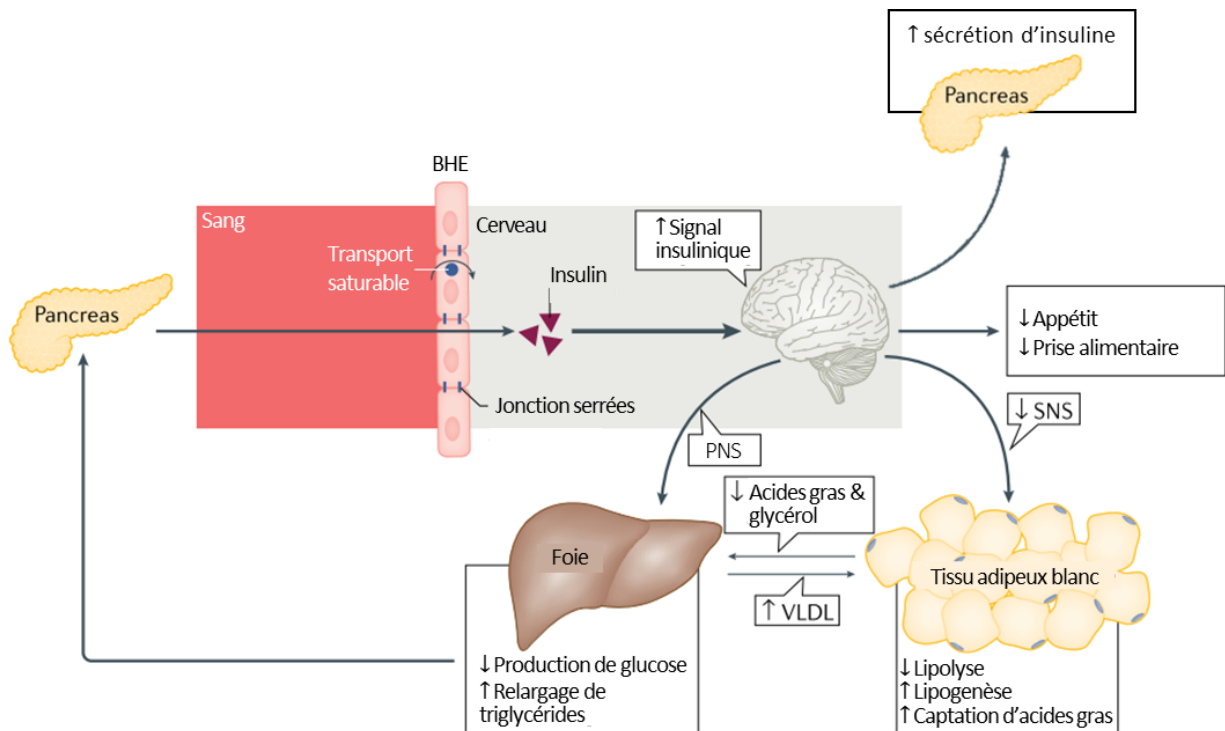


Figure 14. Actions de l'insuline centrale sur l'homéostasie du glucose

L'insuline rejoint le compartiment central à l'aide d'un transporteur saturable. L'action centrale de l'insuline entraîne une diminution de l'appétit et de la prise alimentaire. De plus, l'insuline centrale entraîne une diminution de l'activité de système nerveux sympathique ce qui favorise la captation d'acides gras et augmente la lipogénèse tout en diminuant la lipolyse ainsi qu'une diminution de la production hépatique de glucose. Enfin, l'insuline centrale stimule sa propre sécrétion périphérique. PNS : Système nerveux périphérique ; BHE : Barrière hémato-encéphalique ; SNS : Système nerveux sympathique.

Modifié d'après Scherer *et al.* 2021

2.4. Rôle de la leptine centrale

Parallèlement à son rôle dans la réserve énergétique, le tissu adipeux constitue aussi un organe endocrinien non négligeable. En effet, les adipocytes, les cellules immunitaires et les fibroblastes qui le composent sont capables de sécréter de nombreuses molécules telles que des hormones et des interleukines (Fasshauer & Blüher 2015; Luo & Liu 2016). De plus, de nombreuses études d'analyse protéomique ont essayé d'identifier le sécrétome du tissu adipeux chez l'Homme (Lehr *et al.* 2012). Il comporterait aujourd'hui plus de 600 protéines (Fasshauer & Blüher 2015). Ces dernières, dénommées adipokines, sont impliquées dans de multiples processus biologiques tels que le comportement alimentaire, la sécrétion et la sensibilité à l'insuline, la dépense énergétique et l'inflammation (Fasshauer & Blüher 2015). En 1994, Zhang *et al.* décrivent pour la première fois la leptine (Zhang *et al.* 1994). Cette adipokine joue un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie énergétique puisque l'absence de leptine chez la souris ob/ob conduit à une obésité sévère compliquée d'une hyperglycémie en lien avec une augmentation de la prise alimentaire et une diminution de la dépense énergétique (Boucsein *et al.* 2021).

2.4.1. Effet de la leptine sur la prise alimentaire et la dépense énergétique

L'action centrale de la leptine s'effectue via le passage de la leptine périphérique vers le SNC (Münzberg & Morrison 2015). Comme pour l'insuline, la leptine peut traverser la BHE à l'aide d'un transporteur saturable (Banks *et al.* 1996) ou encore être prise en charge par les tanocytes de l'éminence médiane (Balland *et al.* 2014). Ainsi la leptine agit sur son récepteur (LepRb) fortement exprimé dans l'hypothalamus et notamment dans les neurones de l'ARC, VMH, DMH et LHA (Boucsein *et al.* 2021). L'injection icv de leptine induit une diminution de la prise alimentaire qui peut s'accompagner sur le long terme d'une diminution du poids corporel (Mistry *et al.* 1997). Comme pour l'insuline, la leptine inhibe les neurones NPY/AgRP et active les neurones POMC afin d'exercer son effet anorexigène (Mercer *et al.* 1996; Cheung *et al.* 1997; Cowley *et al.* 2001; Elmquist *et al.* 2005; Boucsein *et al.* 2021).

2.4.2. La leptine augmente la sensibilité centrale à l'insuline

Parallèlement à son effet anorexigène, la leptine semble aussi capable d'agir sur la régulation centrale de la glycémie. En effet, les souris déficientes pour le récepteur de la leptine (souris *db/db*) mais dont l'expression a été restaurée dans l'ARC présentent une diminution de la

glycémie ainsi qu'une augmentation de l'insulinémie sans modification pondérale ni anomalie du comportement alimentaire (Coppari *et al.* 2005).

Les mécanismes d'action de la leptine sur la glycémie dans le SNC ne sont pas encore complètement élucidés. Certaines études suggèrent qu'il existe une étroite collaboration entre la leptine et l'insuline. Pour rappel, après son activation par l'insuline, le récepteur de l'insuline s'autophosphoryle, ce qui permet le recrutement et la phosphorylation des protéines IRS pour enfin activer la voie de signalisation PI3K/AKT. Dans des modèles de souris invalidées pour le récepteur de la leptine dans le SNC, la capacité de l'insuline à activer la phosphorylation d'AKT est nettement diminuée (Koch *et al.* 2010) suggérant ainsi une interaction entre les voies de signalisation de la leptine et celle de l'insuline. En effet, dans cette même étude, la leptine augmente la phosphorylation d'IRS1 sur les résidus Ser307. Or, cette phosphorylation est associée à une augmentation de la sensibilité à l'insuline (Coppa *et al.* 2010). En outre, le traitement par la leptine est fortement associé à une diminution de la phosphorylation de IRS1 sur la serine 612 dans l'ARC qui est communément liée à un dysfonctionnement de la signalisation de l'insuline (Harrington *et al.* 2004; Koch *et al.* 2010).

Ainsi la leptine permet d'augmenter la sensibilité à l'insuline dans l'ARC en amplifiant sa voie de signalisation. Elle permet alors à l'insuline d'exercer ses activités anti-hyperglycémiantes en agissant sur le foie et le tissu adipeux blanc. **Figure 15**

2.5. Rôle des incrétines dans la régulation centrale de la glycémie

2.5.1. Rôle du GLP-1 dans la régulation centrale de la glycémie

2.5.1.1. L'effet neuroincrétine

Comme nous l'avons vu précédemment, les incrétines (GLP-1 et GIP) sont sécrétées par l'intestin en réponse à une charge orale en glucose. Ces peptides agissent directement sur leurs récepteurs pancréatiques afin de stimuler la sécrétion d'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans. Cependant, la présence du récepteur du GLP1 sur les afférences vagues du duodénum et de la veine hépatoportale indique que celui-ci pourrait interagir avec le système nerveux parasympathique afin de réguler la sécrétion d'insuline, c'est l'effet neuroincrétine (Burcelin *et al.* 2001; Krieger *et al.* 2015).

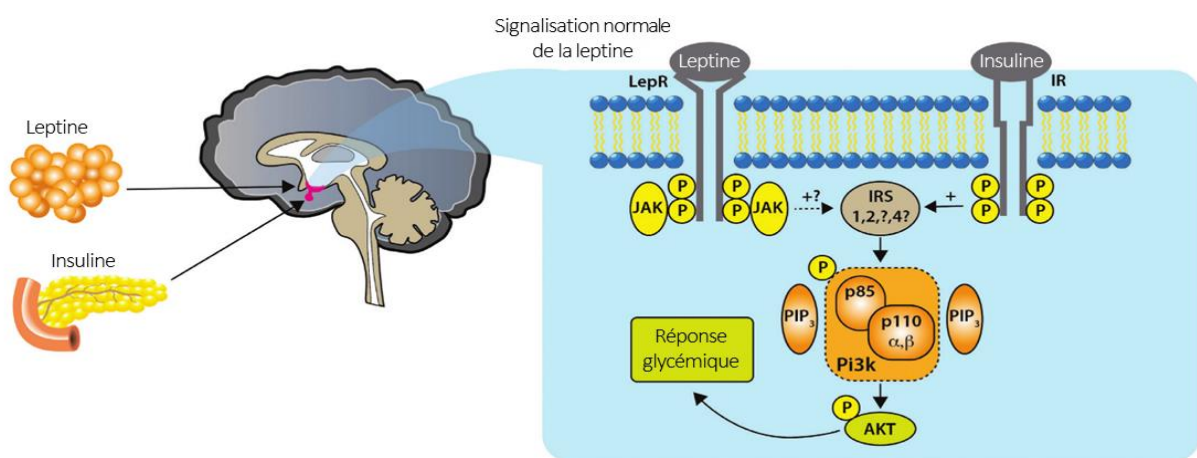


Figure 15. Signalisation de la leptine sur la cascade de signalisation de l'insuline

L'insuline sécrétée par le pancréas ainsi que la leptine sécrétée par le tissu adipeux rejoignent le compartiment central via un transporteur saturable spécifique. Les deux hormones activent leur récepteur spécifique neuronal. L'activation du récepteur de l'insuline permet le recrutement et la phosphorylation des protéines IRS ainsi que l'activation de la voie de signalisation médiée par PI3K/AKT. La leptine quant à elle, favorise la phosphorylation des protéines IRS ce qui facilite l'action centrale de l'insuline. Conjointement, ces deux hormones permettent un maintien de l'homéostasie glucidique.

LepR : récepteur de la leptine ; IR : récepteur de l'insuline

D'après Tups et al. 2017

De nombreuses études ont décrit cet effet neuroincrétine pour le GLP-1. Il a été montré que des injections de GLP-1 ou de ces analogues directement dans la veine hépatoportale induisent une diminution de la glycémie associée à une augmentation de la sécrétion d'insuline (Burcelin *et al.* 2001; Vahl *et al.* 2007; Nishizawa *et al.* 2013). En revanche, cet effet insulinothrope est fortement réduit en cas de vagotomie (Nishizawa *et al.* 2013). Des résultats similaires ont été obtenus dans un modèle de rats dans lequel l'expression du récepteur au GLP-1 a été éteinte sur les afférences vagales. Dans ce modèle, les rats présentent une hyperglycémie et une insuliniémie post-prandiale nettement diminuée (Krieger *et al.* 2016). Ces études suggèrent donc que le système nerveux vagal de la veine hépatoportale est nécessaire à l'effet insulinothrope du GLP-1. Cependant, il est important de noter que l'intestin, source de GLP-1, est aussi fortement innervé par des fibres nerveuses parasympathiques. En conséquence, et comme le rapportent certaines études, le GLP-1 active aussi fortement le système nerveux entérique afin de réguler la sécrétion d'insuline et donc la glycémie (Hayes *et al.* 2011; Borgmann *et al.* 2021).

Au total, l'ensemble de ces données suggère que l'effet insulinothrope du GLP-1 est médié à la fois par une action directe sur le pancréas mais aussi par l'activation des afférences vagales issues de la veine hépatoportale et de l'intestin **Figure 16**.

2.5.1.2. Les effets centraux du GLP-1

Le GLP-1 est fortement produit par l'intestin lors du passage du bol alimentaire. Bien qu'il soit très rapidement dégradé dans la circulation sanguine (en quelques minutes) (Baggio & Drucker 2007), des études rapportent un passage du GLP-1 au travers de la BHE (Hassan *et al.* 1999; Hunter & Hölscher 2012). De plus, le GLP-1 est produit par une sous population de neurones du NTS (Larsen *et al.* 1997a; Vrang & Larsen 2010) qui projettent dans de nombreuses structures telles que l'hypothalamus, le thalamus et le cortex (Llewellyn-Smith *et al.* 2011). Des injections icv de GLP-1 induisent une augmentation de l'expression de c-fos (*i.e.*, marqueur d'activité neuronale) dans le PVN, l'ARC, le NTS et l'*aera posterna* (Larsen *et al.* 1997b; Baggio & Drucker 2007) qui sont des structures qui expriment globalement le récepteur du GLP-1 (Richards *et al.* 2014). Par ailleurs, l'expression du récepteur au GLP-1 est plus particulièrement retrouvée dans les neurones POMC de l'ARC (Sandoval *et al.* 2008).

De nombreuses études ont mis en évidence un effet central du GLP-1 sur la régulation de la prise alimentaire. En effet, chez le rongeur, des injections icv de GLP-1 induisent une diminution de

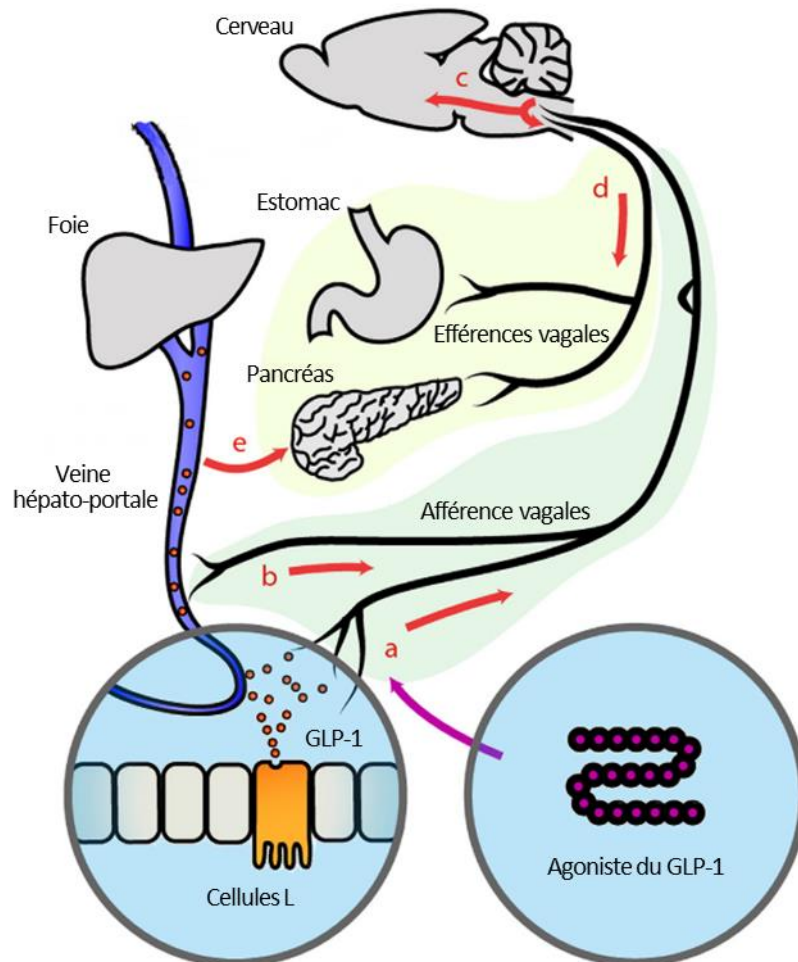


Figure 16. Effet neuroincrétine du GLP-1

L'arrivée du glucose dans le duodénum entraîne une libération de GLP-1 par les cellules L intestinales. Ainsi, le GLP-1 ainsi que ces agonistes activent le système nerveux entérique (a) et hépatoportal (b). Ces signaux nerveux sont ensuite intégrés dans le noyau du tractus solitaire et dans l'hypothalamus (c) pour enfin stimuler la production d'insuline et ralentir la vidange gastrique via les efférences vagues (d). En parallèle, le GLP-1 active directement son récepteur pancréatique afin de stimuler la production d'insuline (e).

Modifié d'après Krieger *et al.* 2015

la prise alimentaire de façon dose dépendante et cet effet peut être bloqué par l'injection d'un antagoniste du récepteur au GLP-1 (Turton *et al.* 1996; Müller *et al.* 2019). Cet effet anorexigène du GLP-1 est associé entre autre à une augmentation de l'expression c-fos des neurones du PVN, du NTS et de l'ARC (Turton *et al.* 1996; Larsen *et al.* 1997b; Müller *et al.* 2019).

Les effets centraux du GLP-1 sur la régulation de l'homéostasie glucidique demeurent controversés bien que plusieurs travaux aient rapporté un effet bénéfique du GLP-1 central sur la tolérance au glucose. Premièrement, l'injection icv de GLP-1 ou d'un analogue du récepteur du GLP-1, l'exendine-4, induit une augmentation de la tolérance au glucose associée à une augmentation de la sécrétion d'insuline (Sandoval *et al.* 2008; Sisley *et al.* 2014; Tudurí *et al.* 2015; Burmeister *et al.* 2017). De plus, une diminution de l'expression du récepteur au GLP-1 spécifiquement dans le SNC provoque une forte intolérance au glucose (Sisley *et al.* 2014; Burmeister *et al.* 2017; Liu *et al.* 2017). Inversement, la suractivation des neurones GLP-1 du NTS par une technique de chémogénétique augmente la tolérance au glucose ainsi que la sensibilité à l'insuline (Shi *et al.* 2017). L'ensemble de ces résultats soutient donc l'hypothèse d'un effet bénéfique du GLP-1 central sur l'homéostasie glucidique.

Cependant, certaines études rapportent des effets contradictoires hyperglycémiantes d'injections icv de GLP-1 (Pérez-Tilve *et al.* 2010; Jessen *et al.* 2017). Cette différence d'effet du GLP-1 sur la glycémie pourrait s'expliquer par une activation de l'axe corticotrope par le GLP-1 (Kinzig *et al.* 2003; Pérez-Tilve *et al.* 2010). Ce dernier est d'ailleurs fortement coexprimé avec la *corticotropin releasing hormone* (CRH) (Sarkar *et al.* 2003). L'administration d'exendin-4 chez l'Homme induit une élévation de la cortisolémie (i.e. l'hormone du stress chez l'homme) (Vella *et al.* 2001, 2002). Or, l'augmentation du cortisol (ou corticostérone chez le rongeur) et de l'adrénaline causée par l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien ou du système nerveux parasympathique respectivement augmente la glycémie et diminue la sécrétion d'insuline (Mifsud *et al.* 2018).

Le GLP-1 régule l'homéostasie énergétique en diminuant la prise alimentaire ainsi qu'en augmentant la tolérance au glucose par une augmentation de la sécrétion d'insuline. Cependant, il faut souligner que l'administration chronique icv de GLP-1 ne semble pas induire les mêmes effets métaboliques. En effet, l'infusion icv de GLP-1 durant 7 jours induit chez le rongeur une diminution de la prise alimentaire mais qui s'atténue au cours du traitement. En outre, dans ce modèle, le GLP-1 n'induit ni modification significative de la tolérance au glucose ni de l'insulinémie (Tudurí *et al.* 2015).

2.5.2. Les effets du GIP central sur l'homéostasie énergétique

De façon similaire au GLP-1, le récepteur du GIP est fortement exprimé dans le SNC et principalement dans l'hypothalamus (ARC, PVN) (Kaplan & Vigna 1994; Adriaenssens *et al.* 2020). Cependant, contrairement au GLP-1, la production du GIP dans le cerveau n'est pas clairement démontrée. En effet, bien que le GIP soit détecté dans le LCR (Kaneko *et al.* 2019; Fukuda 2021), les études rapportent des résultats contradictoires quant à l'évidence d'une production locale de GIP dans le SNC. En effet, deux études ont montré une expression de GIP dans les neurones de l'hypothalamus (Nyberg *et al.* 2007; Paratore *et al.* 2011) alors que d'autres études s'accordent à dire que le GIP n'est pas produit centralement (Thul *et al.* 2017; Papatheodorou *et al.* 2018; Adriaenssens *et al.* 2020; Fukuda 2021). En revanche, l'injection périphérique de GIP entraîne une augmentation de la concentration de GIP dans le LCR chez la souris ce qui suggère que le GIP est capable de traverser la BHE afin d'agir localement dans le SNC (Kaneko *et al.* 2019).

Le rôle du GIP dans le SNC est fortement controversé et non complètement élucidé. Tout d'abord, il a été montré que l'injection icv d'un antagoniste du récepteur du GIP réduit le poids corporel ainsi que la prise alimentaire (Killion *et al.* 2018; Kaneko *et al.* 2019). Cependant, les mêmes résultats sont observés lors de l'utilisation d'agonistes du récepteur au GIP et en particulier lors d'une co-injection avec un agoniste du récepteur au GLP-1 (Finan *et al.* 2013; Frias *et al.* 2017, 2018; Coskun *et al.* 2018; Nørregaard *et al.* 2018; Mroz *et al.* 2019). Ainsi, à notre connaissance, les effets centraux du GIP sur la prise alimentaire ne sont pas encore connus et aucune donnée concernant les effets du GIP dans la régulation centrale de la glycémie n'est rapportée.

CHAPITRE 2 : Le 26RFa, un nouvel acteur dans l'homéostasie du glucose

Les peptides RFamides sont des neuropeptides identifiés chez de nombreuses espèces. Ces peptides ont la particularité de posséder une séquence C-terminale spécifique qui constitue leur signature : Arg(R)-Phe(F)-NH₂(Amide). Ils sont impliqués dans les fonctions cardiovasculaire et musculaire mais aussi dans les processus de régulation neuronale et neuroendocrine (Bechtold & Luckman 2007). Aujourd'hui, il est possible de distinguer 5 sous-familles de peptides RFamides : la famille des neuropeptides FF (NPFF), la famille des *prolactine-releasing peptides* (PrRP), la famille des hormones inhibitrices de la gonadotropine (GnIH), la famille des metastatine/kisspeptines ainsi que la famille du 26RFa/QRFP (*Pyroglutamylated RFamide Peptide*) (Bechtold & Luckman 2007; Leprince *et al.* 2017) **Figure 17**.

Le système peptidergique composé du 26RFa et de son récepteur le GPR103 fait partie de cette dernière famille. Comme la majorité des peptides RFamides, le 26RFa ainsi que sa forme étendue en N-terminale, le 43RFa, sont impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques comme la régulation du système cardiovasculaire, de l'axe gonadotrope, de la locomotion, et de l'anxiété ainsi que la régulation de l'homéostasie énergétique.

1. Caractéristiques du système peptidergique 26RFa/GPR103

1.1. Le neuropeptide 26RFa

Le peptide 26RFa est un neuropeptide de 26 acides-aminés découvert en 2003 par plusieurs équipes simultanément dont celle du Dr. Nicolas Chartrel qui l'a purifié à partir d'extraits de cerveaux de grenouilles en utilisant des anticorps dirigés contre le neuropeptide FF (Chartrel *et al.* 2003; Fukusumi *et al.* 2003; Jiang *et al.* 2003). La présence du 26RFa et de son homologue, le 43RFa, ont été confirmées dans de nombreuses espèces invertébrées et vertébrées [Rongeurs (Chartrel *et al.* 2003; Fukusumi *et al.* 2003; Jiang *et al.* 2003; Takayasu *et al.* 2006) ; Homme (Chartrel *et al.* 2003; Bruzzone *et al.* 2006) ; Poule (Ukena *et al.* 2010) ; Nématodes (Husson *et al.* 2007) ; mollusques (Bigot *et al.* 2014)]. La comparaison des séquences du 26RFa chez ces différentes espèces a permis de mettre en évidence que ce peptide était fortement conservé au cours de l'évolution. Cela est notamment

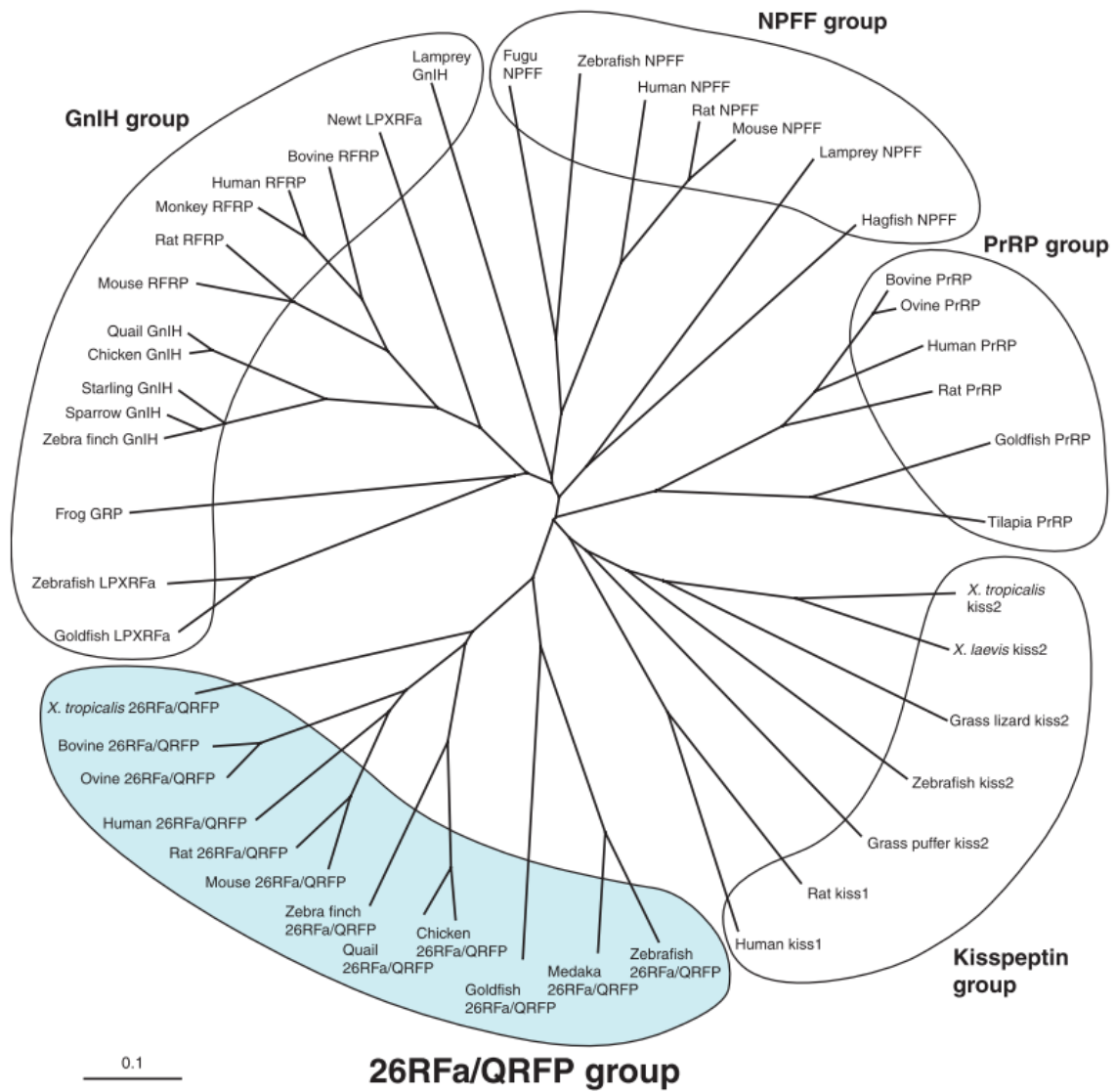


Figure 17. Arbre phylogénétique des peptide RFamides chez les vertébrés
Aujourd'hui, 5 groupes de peptides RFamide ont été découverts chez les vertébrés.
D'après Ukena *et al.* 2014

le cas pour son extrémité carboxy-terminale. En effet, outre la signature RF-NH₂, il est important de noter que les 8 derniers acides aminés du 26RFa (KGGFXFRF-NH₂) ainsi que le motif LAEEL sont fortement conservés suggérant que ces domaines sont essentiels à l'activité du peptide (Chartrel *et al.* 2011) **Figure 18**. En revanche, l'extrémité N-terminal du peptide est soumise à plus de variations et semble donc moins préservée.

Le 26RFa, comme de nombreuses autres hormones, est produit à partir d'un précurseur, le prépro26RFa. Le gène codant pour ce précurseur est le gène *farf-5*. Ce gène est composé de deux exons dont un seul n'est codant et permettant de produire une protéine de 136 acides aminés chez l'Homme (Leprince *et al.* 2017). Le prépro26RFa est constitué d'un peptide signal en N-terminal de 18 acides aminés hydrophobes ainsi que d'un motif en C-terminal de 5 acides aminés (RFGRR) caractéristique des précurseurs de peptides RFamides (Leprince *et al.* 2017). Le clivage du prépro26RFa sur les résidus lysines par des pro-hormones convertases permet de générer deux peptides biologiquement actifs : le 26RFa ainsi que le 43RFa **Figure 19**. Par ailleurs, l'analyse de la séquence du prépro26RFa humain montre aussi la présence de deux sites de clivages supplémentaires permettant de produire un peptide de 9 acides aminés (9-RFa) (Chartrel *et al.* 2003; Jiang *et al.* 2003). Cependant, à ce jour, aucune étude n'a montré que ce peptide était produit chez l'Homme.

1.2. Le récepteur du 26RFa : Le GPR103

Le 26RFa est le ligand endogène de l'ancien récepteur orphelin GPR103 initialement découvert en 2001 (Lee *et al.* 2001; Fukusumi *et al.* 2003; Jiang *et al.* 2003). Ce récepteur fait partie de la grande famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G.

Chez l'Homme une seule isoforme du GPR103 a été mise en évidence. Cependant, deux isoformes sont décrites chez le rongeur : le GPR103A et le GPR103B (Kampe *et al.* 2006; Takayasu *et al.* 2006). Ces deux isoformes possèdent de forts taux de similarité avec le GPR103 humain. En effet, ce dernier montre 83% et 79% d'acides aminés en commun avec le GPR103A et le GPR103B respectivement qui eux, partagent 75% d'acides aminés en commun (Takayasu *et al.* 2006). Le 26RFa ainsi que le 43RFa se lient au GPR103 avec une forte affinité (Fukusumi *et al.* 2003; Jiang *et al.* 2003). De plus, le 26RFa se lie avec la même affinité aux deux isoformes du GPR103 chez les rongeurs (Kampe *et al.* 2006). Bien que ces peptides activent fortement le



Figure 18. Alignement de séquences du 26RFa chez les mammifères. L'alignement de séquence permet la mise en exergue deux motifs fortement conservés : le motif C-terminal KGGFXFRF-NH₂ et le motif central LAEEL. D'après Leprince *et al.* 2017

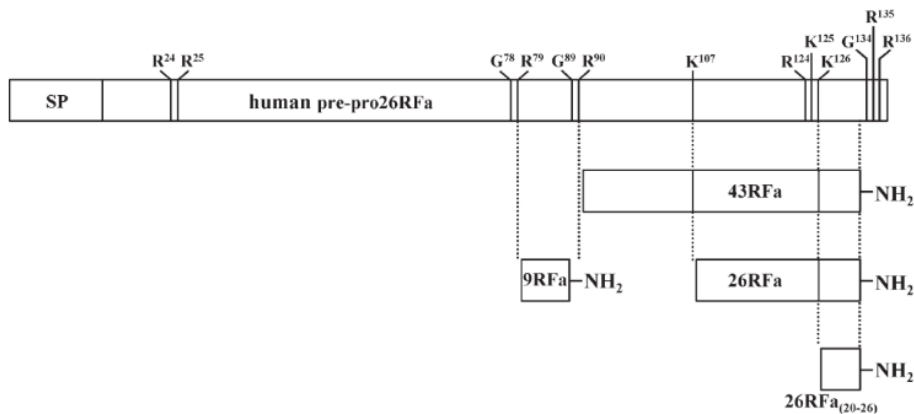


Figure 19. Représentation schématique des sites de clivages du prépro-26RFa chez l'homme.

Le prépro-26RFa subit différents clivages successifs permettant de produire le 43RFa et le 26RFa. De plus, l'analyse des sites de clivages potentiels permettent de prédire la formation de deux autre peptides le 9RFa et le 26RFa₍₂₀₋₂₆₎.

D'après Le Marec *et al.* 2011

GPR103, ils se lient aussi avec une faible affinité au récepteur du peptide RFamide NPF2 (Gouardères *et al.* 2007).

L'extrémité C-terminale du 26RFa semble être nécessaire à la fois à sa fonction biologique et à sa liaison avec le GPR103 (Fukusumi *et al.* 2003; Le Marec *et al.* 2011). En effet, le 26RFa₍₁₋₁₈₎ et le 26RFa₍₁₋₁₆₎ qui sont donc déplétés dans leurs séquences C-terminales, ne sont plus capables d'activer le GPR103 (Le Marec *et al.* 2011). La fixation du 26RFa sur son récepteur entraîne une augmentation dose dépendante de l'AMPc dans des cellules hypophysaires en culture ce qui suggère que le GPR103 est couplé à une protéine $G\alpha_s$ et à la voie de l'adénylate cyclase (Chartrel *et al.* 2003). L'implication de l'adénylate cyclase dans la signalisation du GPR103 a ensuite été confirmée dans d'autres lignées cellulaires telles que les cellules β pancréatiques INS-1E et humaines (Granata *et al.* 2014). De façon surprenante, dans ces deux derniers modèles cellulaires, le 43RFa et le 26RFa ont des effets opposés sur la sécrétion d'insuline suggérant que le GPR103 pourrait se coupler alternativement avec une protéine $G\alpha_s$ ou $G\alpha_i$ et cela afin de médier différents effets (Granata *et al.* 2014). Enfin, il a été montré que le GPR103 pouvait activer également de nombreuses cascades de signalisation telles que celle de la voie des MAP-kinases, de la voie AKT, ou encore des voies médiées par la PKC ou la PKA (Ramanjaneya *et al.* 2013; Leprince *et al.* 2017) **Figure 20**.

1.3. La bio-distribution du système 26RFa/GPR103

1.3.1. Dans les organes périphériques

Le 26RFa est largement distribué dans les organes périphériques. Chez l'Homme, le 26RFa est également exprimé dans de nombreuses glandes endocrines telles que les glandes surrénales, la thyroïde mais aussi la prostate ou encore les testicules (Jiang *et al.* 2003). Chez le rongeur, il est exprimé dans l'œil, la trachée, les glandes mammaires, les testicules et l'utérus (Fukusumi *et al.* 2003; Jiang *et al.* 2003; Takayasu *et al.* 2006). Enfin, chez l'Homme et le rongeur, le 26RFa est fortement exprimé tout au long du tractus gastro-intestinal. Il est ainsi retrouvé dans les cellules épithéliales de l'estomac, du duodénum, et dans une moindre mesure, dans celles de l'iléon et du colon (Prévost *et al.* 2015, 2019b).

Par ailleurs, le 26RFa et le GPR103 sont fortement coexprimés dans les îlots de Langerhans du pancréas endocrine. Leur expression est colocalisée avec l'insuline ce qui suggère que le

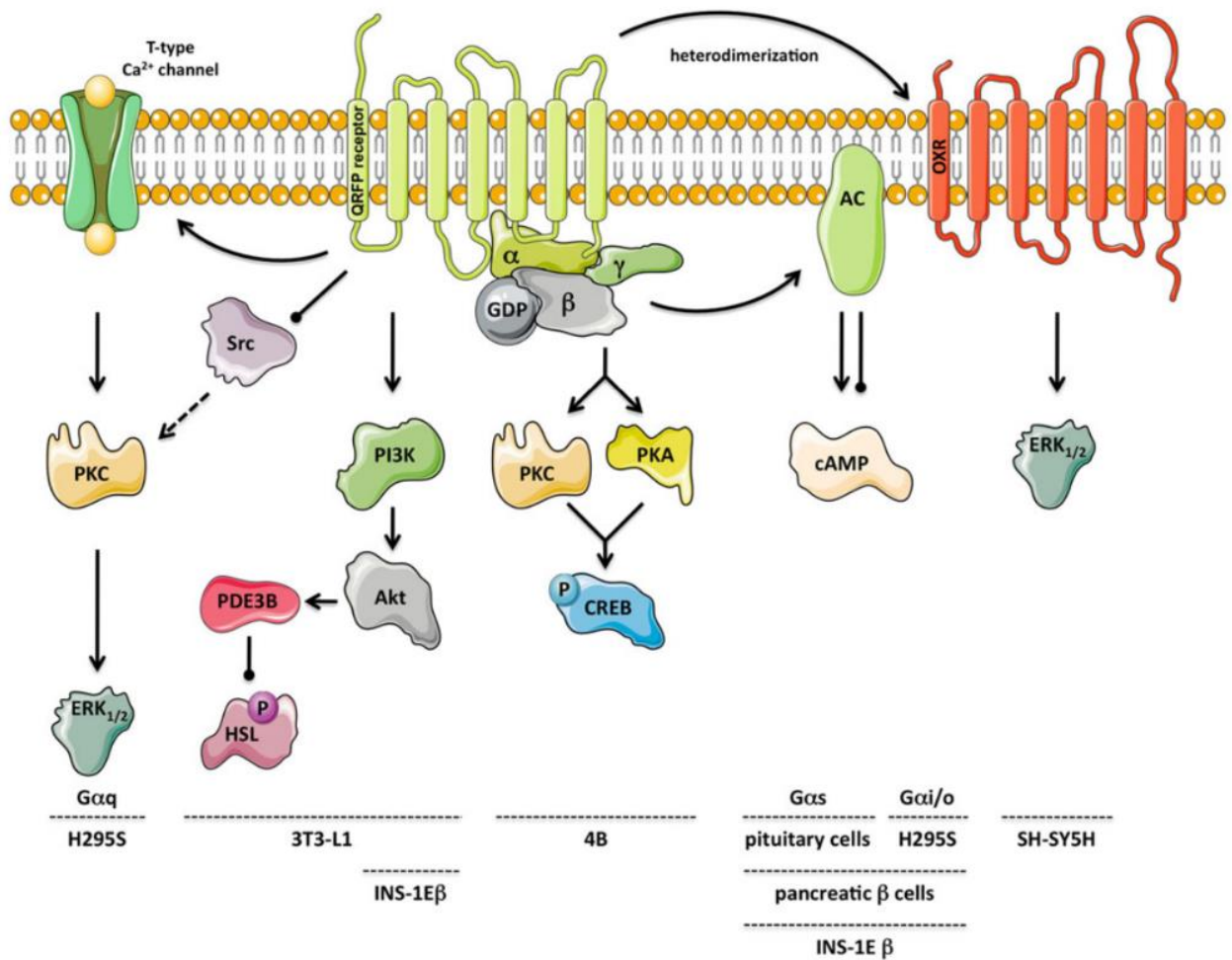


Figure 20. Voies de signalisation associées au GPR103 dans différents modèles cellulaires
D'après Leprince *et al.* 2017

système 26RFa/GPR103 est particulièrement exprimé par la cellule β pancréatique (Granata *et al.* 2014; Prévost *et al.* 2015). Le 26RFa ainsi que le GPR103 sont aussi exprimés dans des cellules pancréatiques non insulino-sécrétrices suggérant que ce système pourrait aussi être coexprimé avec la somatostatine ou le glucagon (Prévost *et al.* 2019b). Enfin, le système peptidergique 26RFa/GPR103 est aussi exprimé dans les organes cibles de l'insuline tels que le muscle et le tissu adipeux (Mulumba *et al.* 2010; Allerton & Primeaux 2015).

1.3.2. Dans le système nerveux central

La découverte du 26RFa dans le cerveau de grenouille ainsi que l'étude de la bio-distribution par RT-qPCR ont permis de montrer que le 26RFa est exprimé dans le système nerveux central chez de nombreuses espèces telles que la souris, le rat et l'Homme (Chartrel *et al.* 2003; Fukusumi *et al.* 2003; Jiang *et al.* 2003; Kampe *et al.* 2006; Takayasu *et al.* 2006). Les études d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie dans le cerveau de rongeurs ont permis d'apporter plus de précisions quant à la distribution du système 26RFa/GPR103 dans les différentes structures cérébrales. Ces études ont montré que le 26RFa était fortement exprimé dans l'hypothalamus et particulièrement dans l'ARC, le VMH, la LHA et la PVN (Chartrel *et al.* 2003; Fukusumi *et al.* 2003; Bruzzone *et al.* 2006; Kampe *et al.* 2006; Takayasu *et al.* 2006) **Figure 21**.

Le GPR103 est plus largement distribué dans le SNC. Les études par RT-PCR, hybridation *in situ* et par *northern blot* effectuées chez le rongeur ont permis de déterminer que le GPR103 est fortement exprimé dans le SNC mais que la bio-distribution des deux isoformes du GPR103 diffère légèrement (Chartrel *et al.* 2003; Fukusumi *et al.* 2003; Jiang *et al.* 2003; Kampe *et al.* 2006; Takayasu *et al.* 2006). En effet le GPR103A est majoritairement exprimé dans l'hypothalamus (ARC, VMH), dans les noyaux du tractus solitaire ainsi que dans le bulbe olfactif (Fukusumi *et al.* 2003; Bruzzone *et al.* 2007) tandis que le GPR103B se retrouve surtout dans l'hippocampe, l'hypothalamus (aire préoptique, aire hypothalamique antérieure) ainsi que dans l'amygdale (Kampe *et al.* 2006). Chez l'Homme, le GPR103 est fortement exprimé dans le cortex, le thalamus, l'hypothalamus, et plus modérément dans l'hippocampe et l'amygdale (Lee *et al.* 2001; Jiang *et al.* 2003). **Figure 21**

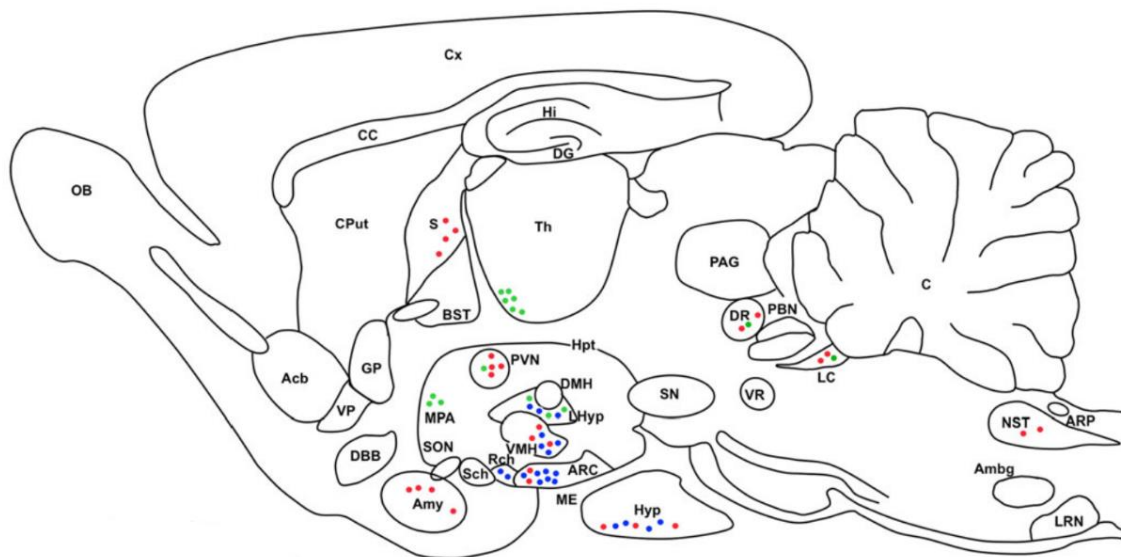


Figure 21. Distribution anatomique du 26RFa (●), du GPR103A (●) et du GPR103B (●) dans le système nerveux central

Acb, noyau accumbens; Ambg, noyau ambigu; Amy, amygdale; ARC, noyau arqué de l'hypothalamus; ARP, aera postrema; BST, noyau du lit de la strie terminale; C, cervelet; CC, corps calleux; CPut, putamen; Cx, cortex cérébral; DBB, bande diagonale de Broca; DG, gyrus denté; DMH, hypothalamus dorso-médian; DR, noyau du raphé dorsal; GP, globus palidus; Hi, hippocampe; Hpt, hypothalamus; Hyp, hypophyse ; LC, locus coeruleus; LHyp, hypothalamus latéral; LRN, noyau réticulaire latéral; ME, éminence médiane; MPA, aire préoptique médiane; NST, noyau du tractus solitaire; OB, bulbe olfactif; PAG, substance grise péri-épendymaire; PBN, noyau parabrachial; PVN, noyau paraventriculaire de l'hypothalamus; Rch, aire rétrochiasmatique; S, septum; Sch, noyau suprachiasmatique; SN, substance noire ;SON, noyau supraoptique; Th, thalamus; VMH, hypothalamus ventro-médian; VP, globus pallidus ventral; VR, noyau du raphé ventral.

D'après Leprince *et al.* 2017

2. Le rôle orexigène du 26RFa

Les études de bio-distribution montrent donc que le système peptidergique 26RFa/GPR103 est majoritairement exprimé dans l'hypothalamus, centre de régulation de la prise alimentaire et de l'homéostasie énergétique en général. Notre équipe s'est alors intéressé au rôle du 26RFa dans cette fonction.

Il a ainsi été montré qu'une injection icv de 26RFa chez la souris induit une augmentation dose-dépendante de la prise alimentaire chez la souris (Chartrel *et al.* 2003; Do Rego *et al.* 2006; Takayasu *et al.* 2006). L'implication du 26RFa mais aussi du 43RFa dans la régulation de la prise alimentaire a été mise en évidence dans de nombreuses espèces [Rongeur : (Chartrel *et al.* 2003; Moriya *et al.* 2006; Takayasu *et al.* 2006; Lectez *et al.* 2009) ; Oiseaux (Ukena *et al.* 2010) ; Poisson (Liu *et al.* 2009)]. Le 43RFa semble exercer un effet orexigène 2.5 fois plus important que le 26RFa (Do Rego *et al.* 2006; Moriya *et al.* 2006; Takayasu *et al.* 2006). Les effets orexigènes du 26RFa ont été confirmés par l'utilisation de souris déficientes en 26RFa qui présentent un phénotype hypophagique (Okamoto *et al.* 2016). Cependant, un second modèle de souris déficientes pour le 26RFa ne présente pas de modification du comportement alimentaire suggérant la mise en place de comportements compensatoires lors du développement (El-Mehdi *et al.* 2020).

L'équilibre alimentaire semble aussi interférer avec le système 26RFa/GPR103. En effet, chez la souris, l'injection icv de 26RFa ou du 43RFa induit une augmentation de la prise alimentaire que les souris soit soumises à un régime riche ou pauvre en graisses (Moriya *et al.* 2006). En revanche, l'injection icv chronique de 43RFa chez la souris soumise à un régime standard (10% de lipides) induit une augmentation de la prise alimentaire uniquement durant les 4 premiers jours de traitement (Moriya *et al.* 2006). Dans cette même étude, chez les souris soumises à un régime riche en graisses (ou High Fat Diet, HFD) le traitement par le 43RFa entraîne une augmentation de la prise alimentaire durant la totalité du traitement (14 jours) (Moriya *et al.* 2006). Cet effet est notamment associé à une augmentation du poids corporel, de la masse grasse, de la glycémie ainsi que du cholestérol chez les souris traitées (Moriya *et al.* 2006). L'effet orexigène du 43RFa semble donc plus important lorsque les souris sont soumises à un régime HFD plutôt qu'à un régime standard. Chez le rat, cette différence d'effet orexigène en fonction de l'équilibre alimentaire est encore plus fortement marquée puisque l'injection icv de 26RFa ou de 43RFa ne modifie pas le comportement alimentaire lorsque les rats sont soumis à un régime standard (10% de lipides) alors qu'un effet orexigène est observé chez les animaux exposés à un régime HFD (55% de lipides) (Kampe *et al.* 2006; Patel *et al.* 2008; Primeaux *et al.* 2008).

L'hypothèse que l'alimentation influence le système 26RFa/GPR103 est soutenue par l'idée que la consommation d'un régime HFD augmente significativement l'expression du prépro26RFa dans l'ARC alors qu'elle diminue dans le VHM (Primeaux *et al.* 2008; Beck & Richy 2009; Schreiber *et al.* 2016). Par ailleurs, une mise à jeun de 48h augmente significativement l'expression du prépro-26RFa (Takayasu *et al.* 2006). L'impact de la sous-nutrition sur le système 26RFa/GPR103 a aussi été observé chez l'Homme. En effet, à l'instar d'autres peptides orexigènes telle que la ghréline, les concentrations plasmatiques de 26RFa sont significativement plus hautes chez les sujets souffrants d'anorexie mentale en comparaison avec des sujets contrôles de même poids corporel (Galusca *et al.* 2012). L'ensemble de ces données suggère donc que l'état nutritionnel et l'équilibre alimentaire influencent à la fois l'expression et l'effet orexigène des peptides QRFP.

Les mécanismes d'action permettant au 26RFa d'exercer son activité orexigène ont été largement étudiés. La fixation du 26RFa sur le GPR103 dans l'ARC entraîne la libération de NPY ainsi qu'une diminution de la libération de POMC (Lectez *et al.* 2009). Cependant, les études d'hybridation *in situ* ont montré que le GPR103 n'est pas exprimé par les neurones à POMC. L'inhibition de la libération de POMC par le 26RFa est donc indirecte et serait probablement médiée par la libération de NPY qui, dans un second temps, inhibe l'activité des neurones à POMC. Cette hypothèse a été confirmée par l'utilisation d'antagonistes dirigés contre les récepteurs Y1 et Y5 du NPY **Figure 22**.

Par ailleurs, il a été montré que le GPR103 peut se dimériser avec le récepteur des orexines et que cet hétérodimère active alors la voie de signalisation médiée par la voie des MAP kinases/ERK (Davies *et al.* 2015). Le système peptidergique des orexines ressemble fortement au système 26RFa/GPR103. En effet, comme pour le 26RFa, les orexines sont fortement exprimées par les neurones de la LHA et ces neurones projettent jusqu'aux neurones NPY de l'ARC (Sakurai *et al.* 1998; Ciriello *et al.* 2003). Afin d'exercer leur effet orexigène, les orexines stimulent l'activité des neurones NPY et comme pour le 26RFa, leur activité est diminuée lorsque les animaux sont traités par des antagonistes des récepteur Y1 et Y5 du NPY (Dube *et al.* 2000; Yamanaka *et al.* 2000). Cependant, chez les souris invalidées pour l'orexine A, le 26RFa conserve son effet orexigène ce qui démontre que les orexines ne sont pas un relai dans l'effet du 26RFa sur la prise alimentaire (Takayasu *et al.* 2006). Aujourd'hui l'activité biologique de l'hétérodimère GPR103/Récepteur aux orexines n'est pas connu et d'autres études sont

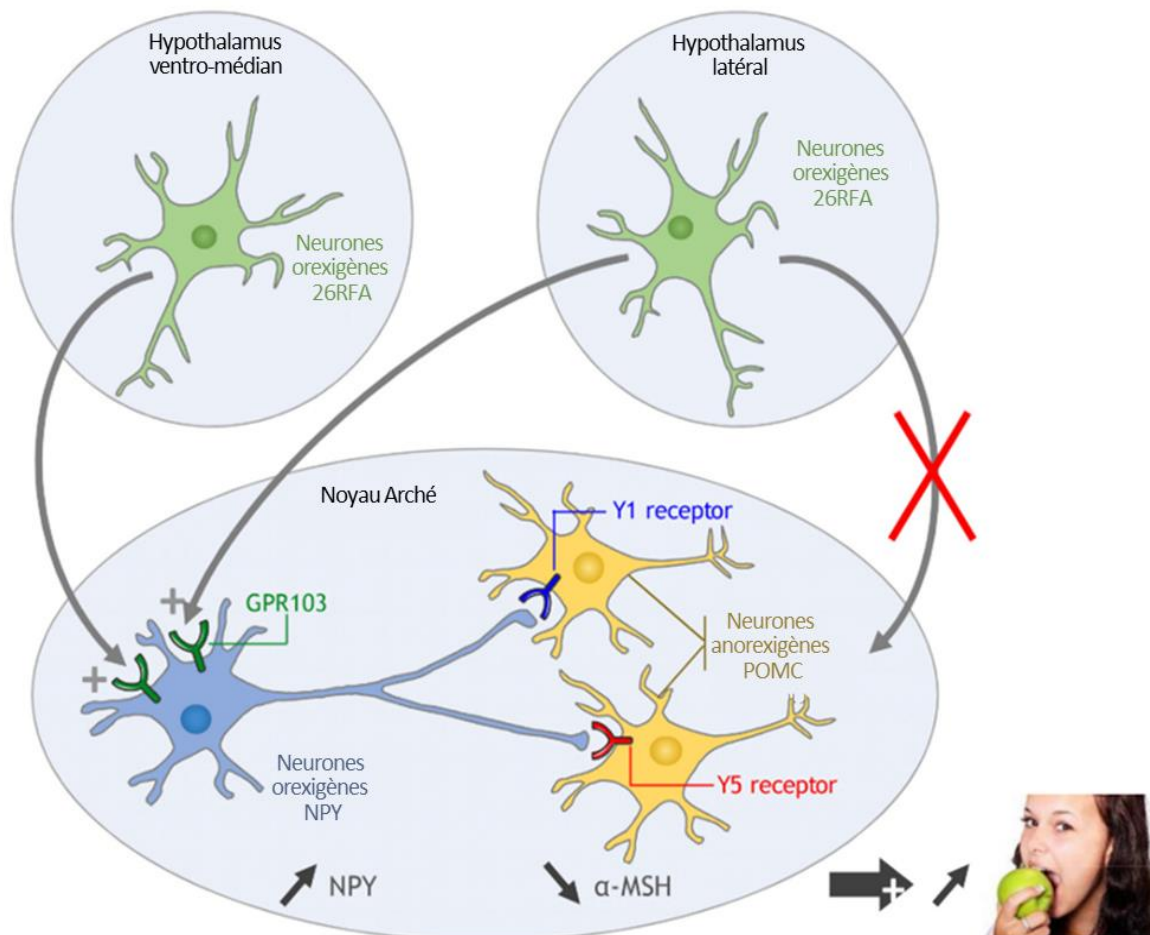


Figure 22: Mécanisme d'action du 26RFA dans le contrôle de la prise alimentaire

Le 26RFA produit par les neurones de l'hypothalamus ventro-médian et de l'aire hypothalamique latérale stimule les neurones NPY du noyau arqué en se fixant sur le GPR103. La sécrétion de NPY inhibe l'activité des neurones POMC en activant les récepteurs Y1 et Y5 ce qui entraîne une augmentation de l'appétit.

D'après Chartrel *et al.* 2016

nécessaires afin de déterminer les interactions potentielles entre ces deux systèmes peptidergiques.

3. Rôle dans la régulation de la glycémie

3.1. Activité périphérique du 26RFa

Outre son implication dans le comportement alimentaire, l'expression du 26RFa et du GPR103 dans le pancréas, l'intestin ou encore le muscle et le tissu adipeux suggèrent que ce système peptidergique pourrait être impliqué dans la régulation périphérique de la glycémie.

3.1.1. Le 26RFa stimule la sécrétion d'insuline

Comme nous l'avons vu précédemment, le système 26RFa/GPR103 est fortement exprimé par le pancréas endocrine et notamment par la cellule β pancréatique (Granata *et al.* 2014; Prévost *et al.* 2015). Le rôle du 26RFa dans cet organe a fait l'objet de plusieurs études ces dernières années.

Tout d'abord, il a été montré que le 26RFa ainsi que le 43RFa stimulent la survie et inhibent l'apoptose des cellules β d'îlots pancréatiques humains en condition de lipotoxicité (Granata *et al.* 2014). Parallèlement à cet effet anti-apoptotique, le 26RFa est capable de réguler la sécrétion d'insuline bien que deux études se contredisent sur ce point. Tout d'abord, dans une lignée cellulaire de cellules β , la lignée INS-1E, le 26RFa est décrit comme inhibant la production d'insuline tandis que le 43RFa semble la stimuler (Granata *et al.* 2014). Cet effet du 26RFa est indépendant de sa liaison au GPR103 puisque l'utilisation de siRNA dirigés l'ARNm du GPR103 n'affecte pas l'effet insulino-statique observé dans cette étude. Les effets ainsi observés sont décrits comme médiés par le récepteur NPFF2 (Granata *et al.* 2014). Une seconde étude réalisée dans la lignée cellulaire MIN6 montre que le 26RFa stimule la sécrétion d'insuline en activant spécifiquement le GPR103 (Prévost *et al.* 2015). L'absence d'expression du récepteur NPFF2 dans la lignée MIN6 pourrait alors expliquer les différences de résultats observés dans ces deux études (Prévost *et al.* 2015).

Afin de compléter les résultats obtenus à partir des modèles *in vitro*, notre laboratoire a étudié l'effet du 26RFa sur la sécrétion d'insuline dans un modèle murin. Ainsi, lors d'un test de

tolérance au glucose, l'injection intra-péritonéale (ip) de 26RFa a un effet anti-hyperglycémiant significatif associé à une augmentation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Prévoist *et al.* 2015). L'ensemble de ces données suggère que le 26RFa possède une activité insulinothropique en agissant directement via son récepteur le GPR103 présent sur les cellules β pancréatiques. Ces résultats sont soutenus par ceux obtenus dans le cadre d'une étude clinique. En effet, il ressort de ce travail que les concentrations plasmatiques en insuline sont fortement corrélées avec les concentrations plasmatiques de 26RFa (Prévoist *et al.* 2015). De plus, au cours d'une charge orale en glucose (OGTT), la sécrétion de 26RFa est corrélée avec l'index insulinothropique reflétant la sécrétion d'insuline (Prévoist *et al.* 2019b). Ces résultats soutiennent donc l'idée d'une interaction étroite entre le 26RFa et la sécrétion d'insuline.

3.1.2. Le 26RFa, une nouvelle incrétine.

Le 26RFa et le GPR103 sont principalement retrouvés dans l'estomac et le duodénum (Prévoist *et al.* 2015, 2019b). La présence du 26RFa dans les cellules duodénales suggère que sa sécrétion pourrait être liée au passage du bol alimentaire. Les taux plasmatiques de 26RFa sont drastiquement augmentés 30 minutes après une charge orale en glucose chez la souris là où une injection intra-veineuse de glucose chez le rongeur n'entraîne aucune modification des concentrations plasmatiques de 26RFa (Prévoist *et al.* 2015). De plus, il a été mis en évidence que l'incubation d'un milieu riche en glucose au pôle apical de fragments de duodénum de souris induit une large sécrétion de 26RFa au pôle basolatéral. Cette sécrétion est nettement moins importante lors de l'utilisation de fragments de jéjunum ou d'iléon. Chez l'Homme, des résultats concordants ont été retrouvés dans la mesure où l'ingestion de glucose par des sujets sains entraîne, après 120 minutes, une augmentation de la concentration plasmatique de 26RFa (Prévoist *et al.* 2019b).

Ainsi, comme pour le GIP et le GLP1, le 26RFa apparaît être sécrété par l'intestin et particulièrement par le duodénum lors de l'absorption du glucose. Capable de stimuler la sécrétion d'insuline via une liaison directe sur son récepteur exprimé par les cellules β pancréatiques, le 26RFa peut être considéré comme une nouvelle incrétine.

3.1.3. Le 26RFa augmente la sensibilité à l'insuline

Le 26RFa, comme vu précédemment, peut agir directement sur la cellule β pancréatique. Cependant, la présence du GPR103 dans les tissus cibles de l'insuline tels que le muscle ou le tissu adipeux suggère que le 26RFa pourrait aussi agir sur la sensibilité à l'insuline. L'injection de 26RFa synchronisée à l'insuline lors d'un test de tolérance à l'insuline accentue l'hypoglycémie suggérant que le 26RFa accroît la sensibilité à l'insuline (Prévost *et al.* 2015). La présence du GPR103 sur les tissus cibles de l'insuline suggère une action directe du 26RFa sur ces organes. En effet, il a été montré qu'un traitement simultané par le 26RFa et l'insuline sur des myocytes en culture augmentait la captation de glucose et la formation de glycogène en comparaison aux cellules traitées par l'insuline seule (Allerton & Primeaux 2015). Par ailleurs, le système 26RFa/GPR103 est fortement exprimé par les adipocytes (Mulumba *et al.* 2010). L'activation du GPR103 dans une lignée de cellules adipocytaires murines augmente la concentration en triglycérides intra-cellulaires (lignée 3T3-L1) (Mulumba *et al.* 2010). Le 26RFa stimule la captation de lipides en augmentant l'expression et l'activité de la LPL mais aussi l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse (Mulumba *et al.* 2010). Dans cette même étude, l'utilisation d'un shRNA dirigé contre l'ARNm du GPR103 afin de diminuer son expression a permis de mettre en évidence que l'action du 26RFa sur la captation de lipides était dépendante de sa fixation à son récepteur. L'effet du 26RFa est donc comparable à celui de l'insuline sur le tissu adipeux.

L'ensemble de ces données présente donc le 26RFa comme un nouvel agent anti-hyperglycémiant. Ce peptide sécrété par l'intestin en période post prandiale exerce son activité insulinothrompique en activant directement le GPR103 présent à la surface des cellules β . Parallèlement, le 26RFa est capable d'agir sur les tissus cibles de l'insuline tels que le muscle ou le tissu adipeux afin de favoriser la captation du glucose et des lipides participant ainsi à la normalisation de la glycémie. **Figure 23**

3.2. Activité centrale du 26RFa

Comme nous l'avons vu précédemment, la régulation de la glycémie s'effectue en étroite coordination entre les organes périphériques et le SNC. En outre, les neurones NPY/AgRP ainsi que les neurones POMC de l'hypothalamus jouent un rôle crucial dans la régulation centrale de la glycémie. Le système peptidergique 26RFa/GPR103 est fortement exprimé dans

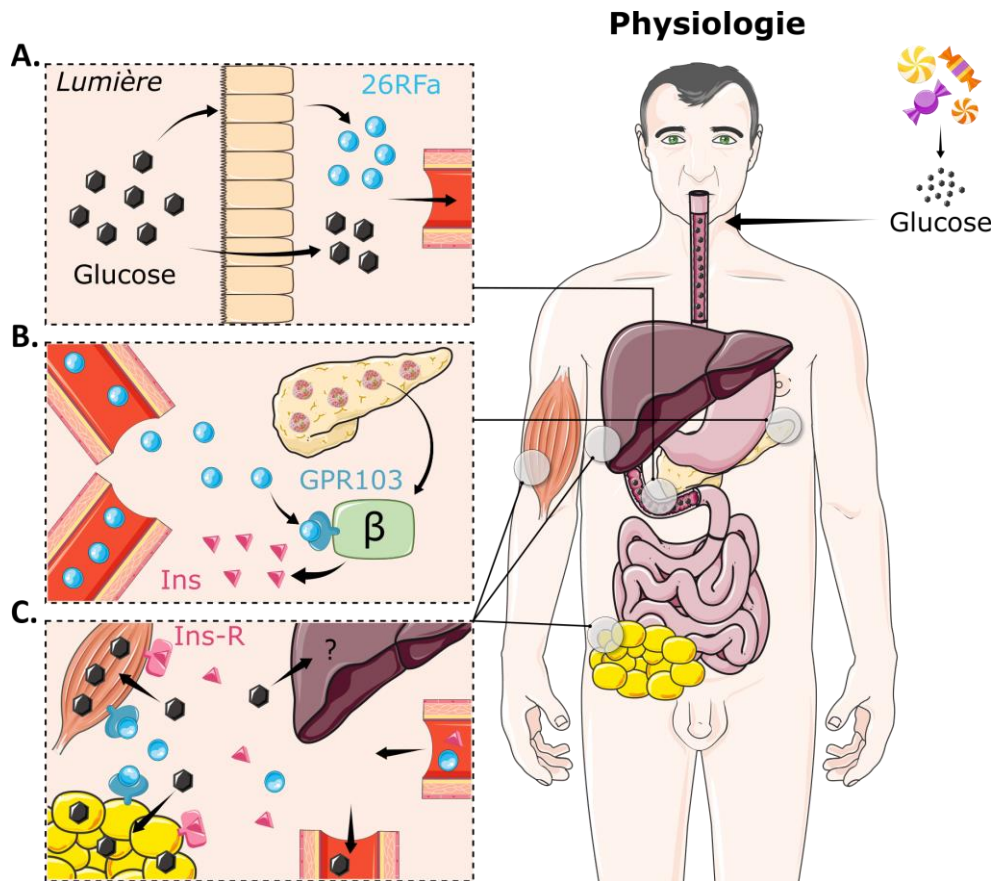


Figure 23. Effet périphérique du 26RFa dans la régulation de la glycémie

Le glucose induit une sécrétion de 26RFa par l'intestin **(A)** Le 26RFa ainsi libéré dans le sang active le GPR103 pancréatique et stimule la sécrétion d'insuline (Ins) par les cellules β **(B)** Enfin, le 26RFa et l'insuline activent leurs récepteurs (GPR103, Ins-R, respectivement) spécifiques sur leurs tissus cibles (muscle, tissu adipeux, et foie) entraînant une diminution de la glycémie **(C)**.

D'après Le Solliec *et al.* 2021

l'hypothalamus et ce système est impliqué dans la régulation de l'homéostasie énergétique notamment en régulant le comportement alimentaire. Les effets périphériques du 26RFa permettent de réguler la glycémie en augmentant la sécrétion et la sensibilité à l'insuline. Dans ce contexte, notre équipe a émis l'hypothèse que le 26RFa pouvait faire partie du système gluco-régulateur central.

Cette hypothèse est soutenue par le fait que l'injection icv de 26RFa entraîne une diminution de l'hyperglycémie induite par le glucose et que cet effet est associé à une augmentation de la sécrétion d'insuline. De plus, cet effet anti hyperglycémiant du 26RFa est totalement aboli lors d'une co-administration icv du 26RFa avec un antagoniste du GPR103. Le 26RFa apparaît donc impliqué dans la régulation centrale de la glycémie (El Mehdi *et al.* 2021).

La régulation centrale de la glycémie s'effectue en partie par une action directe de l'insuline sur les neurones hypothalamiques. Des études de *RNA-scope* ont mis en évidence que le 26RFa est fortement coexprimé avec le récepteur de l'insuline dans le VMH et la LHA. Dans ce contexte, notre équipe a émis l'hypothèse que les neurones à 26RFa pouvaient être impliqués dans le système gluco-régulateur médié par l'insuline. Ainsi, nous avons cherché à étudier les interactions entre l'insuline et le système GPR103. Les résultats montrent que l'administration centrale d'insuline entraîne d'une part une augmentation de l'expression du marqueur d'activité neuronale *c-fos* dans les neurones exprimant le 26RFa et d'autre part, une augmentation de l'expression de 26RFa par l'hypothalamus. Enfin, l'exposition d'explants hypothalamiques à l'insuline entraîne une forte augmentation dose-dépendante de la sécrétion de 26RFa (El Mehdi *et al.* 2021). Ces résultats témoignent d'un effet important de l'insuline sur les neurones à 26RFa soutenant alors l'hypothèse que le 26RFa est effectivement une cible de l'insuline dans l'hypothalamus. L'injection icv d'insuline en association avec un antagoniste du GPR103 entraîne une perte quasi-totale de l'effet de l'insuline centrale sur la glycémie. Le 26RFa apparaît alors finalement plutôt comme étant un relai de l'insuline centrale (El Mehdi *et al.* 2021).

Comme nous l'avons décrit précédemment, les effets centraux de l'insuline sur la glycémie se caractérisent principalement par une diminution de la production hépatique de glucose. Or, notre équipe a pu mettre en évidence que l'injection centrale de 26RFa n'avait pas d'effet sur la PHG. De plus, les effets centraux de l'insuline sur la PHG ne sont pas affectés par l'injection d'un antagoniste du GPR103. Ces résultats suggèrent donc que le 26RFa n'est pas le médiateur de l'effet central de l'insuline sur la PHG.

Cependant, il a aussi été montré que l'un des effets centraux de l'insuline centrale serait de stimuler sa propre sécrétion par les cellules β pancréatiques (Chen *et al.* 1975; Woods & Porte 1975; Yavropoulou *et al.* 2009; El Mehdi *et al.* 2021). Dans le contexte où l'injection icv de 26RFa entraîne une production accrue d'insuline par le pancréas, notre équipe a proposé que le 26RFa pourrait médier cette action de l'insuline. Cette hypothèse a été confirmée par le fait que la co-injection d'insuline avec l'antagoniste du GPR103 bloque complètement l'effet de l'insuline sur sa propre sécrétion (El Mehdi *et al.* 2021).

Ainsi, ces résultats suggèrent que les effets centraux de l'insuline seraient médiés par deux populations neuronales distinctes. D'une part, l'insuline ciblerait les neurones AgRP afin de relayer ses effets sur la production hépatique de glucose et d'autre part, elle ciblerait les neurones à 26RFa afin de stimuler sa propre sécrétion périphérique. Le 26RFa apparaît alors comme faisant partie intégrante du système gluco-régulateur central. **Figure 24**

4. Rôle du 26RFa dans le comportement

4.1. Rôle du 26RFa dans la locomotion

Il est connu que de nombreux peptides RFamides sont capables de diminuer la locomotion chez le rongeur (Kavaliers & Hirst 1986; Quelven *et al.* 2004). Les peptides 26RFa et 43RFa ne semblent pas faire exception bien que leur rôle dans cette régulation reste controversé. En effet, chez la souris, des injections icv aiguës de 26RFa mais aussi de 43RFa induisent une augmentation de la locomotion de façon dose-dépendante (Do Rego *et al.* 2006; Takayasu *et al.* 2006). L'utilisation d'un modèle de souris KO pour le 26RFa confirme ces résultats puisque les souris *qrffp*^{-/-} présentent un phénotype hypoactif (Okamoto *et al.* 2016). En revanche, l'injection chronique icv de 43RFa n'induit pas de modification du comportement locomoteur chez la souris (Moriya *et al.* 2006).

L'effet du 26RFa sur la locomotion est hétérogène selon le modèle utilisé. En effet, Kampe et coll ont montré en 2006, que l'administration icv aiguë de 26RFa chez le rat n'entraînait pas de modification de la locomotion (Kampe *et al.* 2006). Chez le poisson-zèbre, la surexpression du prépro26RFa est associée à une diminution de l'activité locomotrice et la déplétion du gène codant pour le prépro26RFa à une augmentation de la locomotion (Chen *et al.* 2016). Ces résultats contradictoires peuvent néanmoins s'expliquer par la différence d'expression des deux

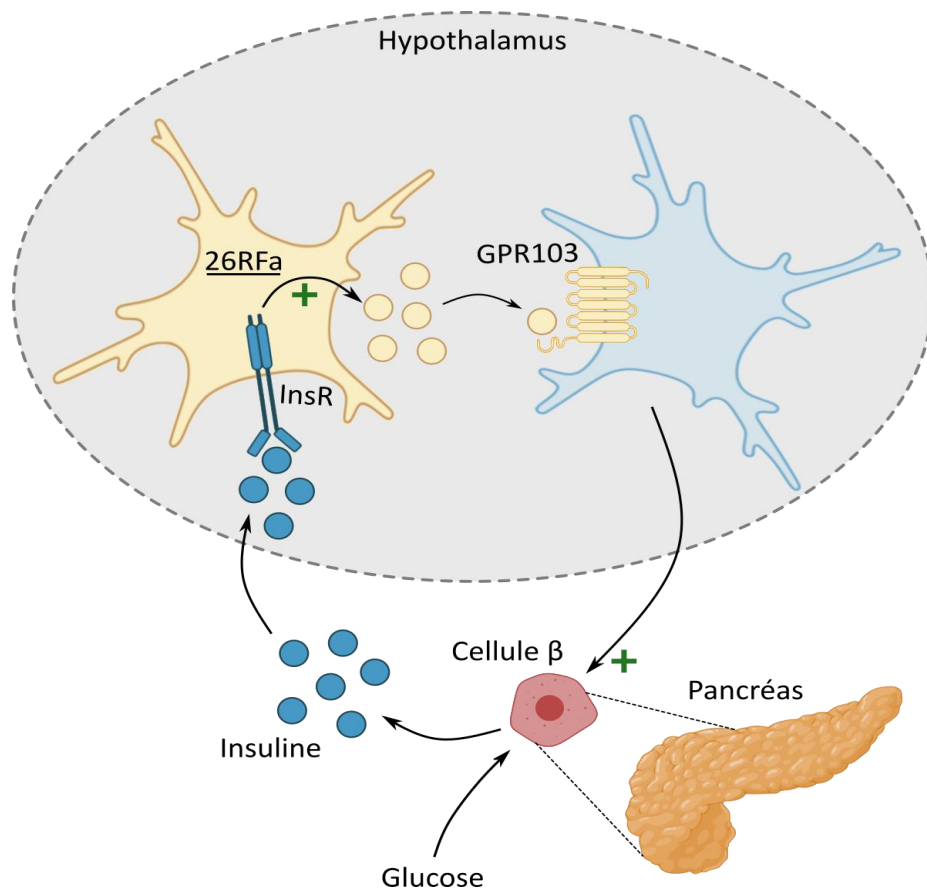


Figure 24. Action centrale du 26RFa dans la régulation de la glycémie

Le glucose stimule la sécrétion d'insuline par la cellule β pancréatique. L'insuline rejoint le compartiment central à l'aide d'un transporteur saturable et active son récepteur présent sur les neurones à 26RFa. La libération de 26RFa et l'activation du GPR103 permet de stimuler la sécrétion périphérique d'insuline.

InsR : Récepteur à l'insuline

isoformes du GPR103 notamment chez le rongeur mais aussi par l'affinité du 26RFa pour le récepteur NPPF2 qui pourrait alors médier cette action (Gouardères *et al.* 2007).

4.2. Rôle du 26RFa dans le comportement anxieux

L'injection icv d'un analogue du 26RFa chez la souris réduit le comportement anxieux en modulant la transmission GABAergique et β -adrénergique (Palotai & Telegdy 2016). De plus, les souris déficientes pour le 26RFa présentent un comportement plus anxieux que les souris sauvages (Okamoto *et al.* 2016). *A contrario*, l'injection icv aiguë de 43RFa ne semble pas affecter le comportement anxieux mesuré dans la labyrinthe surélevé bien que les auteurs soulignent tout de même une augmentation des comportements stéréotypiques (toiletage) caractéristiques de l'activation de l'axe du stress (Takayasu *et al.* 2006). Ces différents effets des deux peptides peuvent alors s'expliquer par la capacité du 43RFa à augmenter l'expression de la CRH dans une lignée de cellules hypothalamiques (Ishigame *et al.* 2016) cependant d'autres études sont actuellement nécessaires afin de clarifier les effets des peptides QRFP sur l'anxiété et le stress.

4.3. Rôle du 26RFa dans la nociception

Le GPR103 ainsi que le 26RFa sont fortement exprimés dans les différents centres qui médient la transmission de la douleur tels que le noyau parafasciculaire du thalamus, le locus cœruleus, le noyau parabrachial ainsi que la moelle épinière suggérant un rôle du 26RFa dans l'intégration des signaux nociceptifs (Bruzzone *et al.* 2006, 2007).

Les mécanismes d'action permettant au 26RFa de réguler la perception de la douleur sont encore mal compris. Une étude suggère que le 26RFa, en activant les récepteurs NPPF1/2, augmente la sensibilité à la douleur chez la souris (Elhabazi *et al.* 2013). D'autres études quant à elles mettent en évidence une activité analgésique du 26RFa (Yamamoto *et al.* 2009, 2011; Yoshida *et al.* 2019). Cette action serait médiée en partie par les récepteurs NPY-Y1 ou NPPF2 ainsi que par le récepteur α 2-adrénergique. Le 26RFa induirait alors un relargage de noradrénaline dans la moelle épinière entre 15 et 75 minutes après l'induction d'une douleur aiguë chez le rat (Yoshida *et al.* 2019).

Ainsi, bien que le 26RFa et le 43RFa semblent impliqués à la fois dans la régulation de la locomotion, du comportement anxieux et dans la nociception, l'état actuel des connaissances ne permet pas de déterminer avec précision les mécanismes impliqués dans ces différents phénomènes.

CHAPITRE 3 : L'obésité associée au diabète de type 2

1. Les caractéristiques de l'obésité et du diabète de type 2

D'après l'organisation mondiale de la santé, l'obésité se définit comme une accumulation anormale de graisses qui représente un risque pour la santé. La gravité de l'obésité est fréquemment estimée à l'aide de l'indice de masse corporelle ($IMC = \text{Poids corporel} / \text{Taille}^2$). L'obésité est alors souvent caractérisée par un IMC supérieur à 30 kg/m². D'après l'OMS en 2016, 1.9 milliard d'individus étaient en surpoids dans le monde ($IMC > 25 \text{ kg/m}^2$). Parmi eux, 650 millions étaient considérés comme obèses ce qui représente 13% de la population mondiale. En fonction du degré de sévérité, de la durée et de la distribution de cet excès de masse grasse, les patients souffrant d'obésité ont un risque accru de développer des complications notamment cardiovasculaires mais aussi un risque accru de développer un DT2 (Schiller *et al.* 2012).

Le diabète, défini par une hyperglycémie chronique, constitue la maladie métabolique la plus fréquente dans le monde. Cette élévation du glucose plasmatique conduit à de nombreux dysfonctionnements affectant le cœur, les vaisseaux, les yeux ou encore le système nerveux. Le diabète est diagnostiqué par une glycémie à jeun supérieure à 1.26g/L ou une glycémie post prandiale supérieure à 2g/L (2 heures après le repas) (American Diabetes Association 2017). Il existe deux formes principales de diabète. Tout d'abord, le diabète de type 1 se caractérise par une destruction auto-immune des cellules β pancréatiques et par conséquent une insulino-pénie et une hyperglycémie. Par ailleurs, le DT2, la forme la plus fréquente affectant près de 90% des patients diabétiques, est caractérisé par une insulino-résistance c'est à dire une incapacité de l'insuline à agir sur ces différents tissus cibles et donc à réguler la glycémie mais aussi une défaillance de la sécrétion insulinaire qui s'accroît avec l'évolution de la maladie.

D'après la fédération internationale du diabète (FID), plus de 416 millions de personnes dans le monde souffrent de DT2 (Ogurtsova *et al.* 2017). En Europe, cela représente près de 60 millions de patients soit 10,3% des hommes et 9,6% des femmes âgés de plus de 25 ans. La prévalence de la pathologie ne cesse d'augmenter, la FID estime que plus de 700 millions de personnes dans le monde pourraient souffrir de diabète à l'horizon 2045.

1.1. Les facteurs de risques

L'augmentation de la prévalence du DT2 est fortement liée à l'augmentation de l'obésité au cours de ces dernières années. En effet, il est estimé que 90% de cas de DT2 dans le monde est causé par un excès pondéral (Hossain *et al.* 2007).

Les facteurs de risque qui conduisent au développement du DT2 sont sensiblement les mêmes que ceux qui conduisent au développement de l'obésité. Ces facteurs de risque sont multiples et comportent principalement des facteurs génétiques, métaboliques et environnementaux. Les facteurs de risque peuvent ainsi être divisés en deux catégories : les facteurs de risque non modifiables tels que les facteurs génétiques et les facteurs de risque modifiables qui rassemblent les facteurs environnementaux.

1.1.1. Les facteurs génétiques

L'impact des facteurs génétiques dans le développement du DT2 comparativement aux facteurs socio-économiques et environnementaux n'est pas parfaitement connu. Les facteurs héréditaires favorisent l'émergence de clusters caractérisés par un risque de développer un DT2 3,5 fois plus élevé que dans la population générale (Cuschieri 2019). En effet, un enfant dont l'un des parents est diabétique est exposé à un risque de développer un DT2 augmenté de 40% ou de 70 % si ses deux parents sont diabétiques (Cuschieri 2019).

Aujourd'hui, 40 *loci* génétiques sont associés avec le développement du DT2. La majorité de ces loci semble principalement concerner des gènes liés à la fonction de la cellule β plutôt qu'aux mécanismes de l'insulino résistance (Hu 2011). Cependant, jusqu'à ce jour, ces *loci* n'augmentent que modestement le risque de DT2 en comparaison avec les facteurs environnementaux et ne permettent pas de prédire la maladie.

1.1.2. Les facteurs environnementaux

L'obésité est fortement associée au développement du DT2. Ainsi, la sédentarisation, le manque d'exercice physique, la consommation excessive de calories ainsi qu'un mauvais équilibre alimentaire constituent les principaux facteurs de risque associés au DT2.

La sédentarisation associée à nos modes de vie contemporains comporte une diminution du temps associé à la pratique sportive et donc une diminution de la dépense énergétique. Deux heures passées à regarder la télévision s'associent à une augmentation de 14% du risque de développer un DT2 (Hu *et al.* 2003). En revanche, une heure de marche rapide quotidienne permet de réduire de 34% le risque de DT2. La diminution de la dépense énergétique observée dans les pays industrialisés est souvent associée à une augmentation de la prise alimentaire qui amplifie le risque d'obésité et de DT2

Cependant, parallèlement à l'excès calorique, la composition et la qualité de la nourriture ingérée joue un rôle important dans l'émergence du DT2. L'alimentation comportant de fortes proportions de sucres et d'acides gras saturés augmente le risque de DT2 via l'excès de tissu adipeux viscéral (Stanhope & Havel 2010) et l'insulino-résistance alors qu'*a contrario* la consommation de nourriture riche en fibres et en acides gras polyinsaturés est associée avec une diminution de ce risque (Hu *et al.* 2001).

1.2. De l'obésité au diabète de type 2

L'obésité compliquée d'insulinorésistance fait le lit du DT2 (Felber & Golay 2002). Il est admis que la sensibilité à l'insuline varie au cours de la vie. L'insulino résistance est ainsi observée physiologiquement durant la puberté, la grossesse ou encore le vieillissement (DeFronzo 1979; Buchanan *et al.* 1990; Moran *et al.* 1999). Parallèlement, l'obésité constitue un des facteurs majeurs de l'insulino résistance. L'excès de masse grasse s'associe à une augmentation des concentrations plasmatiques de triglycérides et à la sécrétion de nombreuses hormones et cytokines pro-inflammatoires qui favorisent le dysfonctionnement de la signalisation de l'insuline (Scherer 2006; Piché *et al.* 2020). Cependant, l'excès de tissu adipeux ne semble pas suffisant pour l'apparition du diabète. En effet, il est admis que 10 à 25% des patients obèses ne présentent aucune anomalie métabolique (Blüher 2010). Au-delà de la masse totale, la répartition de la masse grasse joue un rôle physiopathologique déterminant. Ainsi, le tissu adipeux sous-cutané est moins délétère que le tissu adipeux abdominal (ou viscéral) (Blüher 2010). En effet, ce dernier sécrète comparativement davantage de cytokines pro-inflammatoires, et est donc considéré comme métaboliquement plus actif. (Motoshima *et al.* 2002; van Harmelen *et al.* 2002).

L'excès calorique apporté par l'alimentation favorise l'expansion du tissu adipeux et l'obésité. L'évolution de l'obésité vers un phénotype diabétique correspond à un processus long et lent (Felber & Golay 2002). Durant les 10 premières années, en dépit de l'insulinorésistance, la glycémie à jeun des patients reste stable au prix d'un hyperinsulinisme. Après 20 ans d'évolution lente, l'hyperinsulinisme ne parvient souvent plus à maîtriser la glycémie toujours dans le contexte d'insulino-résistance, l'hyperglycémie chronique s'installe alors. Ces patients sont alors diagnostiqués comme souffrant de DT2. Enfin, cette hyperglycémie chronique associée une capacité sécrétoire d'insuline qui diminue progressivement conduit à l'état d'insulino déficience. **Figure 25**

2. Le développement de l'insulino-résistance

2.1. De l'excès de gras à l'insulino-résistance

2.1.1. Le rôle déterminant du tissu adipeux dans l'insulino-résistance

Le tissu adipeux, outre son implication dans le stockage d'énergie, secrète de nombreuses adipokines et cytokines. Les premières études mettant en exergue le rôle de l'inflammation du tissu adipeux dans la genèse du DT2 datent des années 1990. En effet, chez l'Homme et le rongeur, en condition d'obésité, le tissu adipeux blanc produit des concentrations élevées de cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, l'expression du TNF- α (Tumor necrosis factor α) intra-adipocytaire est corrélée positivement à l'insulino-résistance (Hotamisligil *et al.* 1993). Parallèlement, les patients obèses et insulino-résistants présentent une inflammation élevée au sein du tissu adipeux comparativement aux patients obèses insulino-sensibles (Lawler *et al.* 2016).

Comme nous l'avons vu, la fonction principale du tissu adipeux est de capter les substrats énergétiques excédentaires pour les transformer sous forme de triglycérides et de les stocker dans les adipocytes. Ainsi, l'excès calorique génère une hypertrophie des adipocytes (Longo *et al.* 2019). Or, l'hypertrophie adipocytaire est associée à de nombreuses modifications cellulaires dont l'émergence de facteurs pro-inflammatoires et *in fine* l'insulinorésistance.

L'hypertrophie adipocytaire conduit d'une part à une augmentation de la consommation en oxygène par les adipocytes et d'autre part à une diminution de la vascularisation au sein du tissu adipeux, ainsi une hypoxie tissulaire importante s'établit (Pasarica *et al.* 2009; Lee *et al.* 2014). L'exposition à l'hypoxie active des voies pro-inflammatoires telles que la voie médiée par HIF-

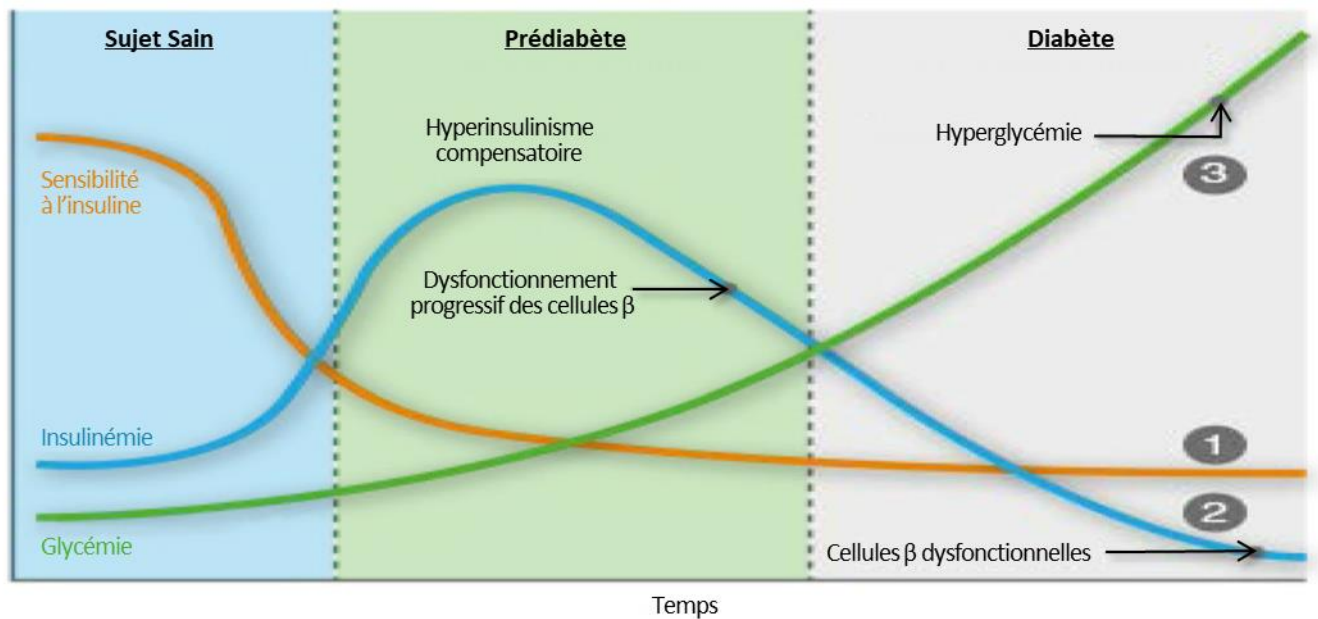


Figure 25. Evolution du profil glycémique des patients durant les stades de prédiabète et de diabète avéré.

Durant le stade de prédiabète, la consommation excessive de calories favorise le développement progressif de l'insulino-résistance. La glycémie est maintenue au prix d'un hyperinsulinisme. Cependant ces mécanismes compensatoires engendrent un dysfonctionnement des cellules β qui progressivement n'arrivent plus à contrôler la glycémie. L'hyperglycémie s'installe alors et les patients sont diagnostiqués diabétiques.

D'après Bar-Tana et al. 2020

1 α (*Hypoxia-Inducible Factor-1 α*) (Wang *et al.* 2007). Ce dernier joue un rôle déterminant dans la mesure où l'inactivation de ce facteur de transcription spécifiquement dans les adipocytes prévient l'inflammation ainsi que l'insulino-résistance chez le rongeur (Lee *et al.* 2014). HIF-1 α favorise le phénotype pro-inflammatoire des macrophages présents dans le tissu adipeux (Fujisaka *et al.* 2013). La libération de cytokines pro-inflammatoires issues des macrophages active les voies de signalisation médiées par NF κ B (*nuclear factor-kappa B*) et JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) dans les macrophages et les adipocytes (Longo *et al.* 2019). L'activation de ces deux voies est associée à la production et la sécrétion de cytokines telles que le TNF- α , l'interféron γ (IFN- γ) ou IL6 qui maintiennent l'inflammation et l'émergence de l'insulino-résistance dans le tissu adipeux. **Figure 26**

Pour rappel, la signalisation de l'insuline s'effectue principalement par la phosphorylation des protéines IRS sur des résidus tyrosine. Par la suite, ces protéine IRS activent la voie de signalisation PI3K/AKT. Or, l'activation des voies NF κ B et JNK via une phosphorylation des protéine IRS sur la sérine-307 inhibe la voie de signalisation PI3K (Aguirre *et al.* 2002; Longo *et al.* 2019). De ce fait, l'insuline n'est plus capable (i) de stimuler la captation de glucose par le tissu adipeux ; et (ii) de réguler correctement la balance lipogénèse/lipolyse. Les adipocytes hypertrophiques présentent alors une augmentation de l'activité de l'enzyme HSL favorisant la lipolyse et donc la libération d'acides gras dans le milieu extra cellulaire (Berger & Barnard 1999; Wueest *et al.* 2009). L'insulino-résistance favorise alors la lipotoxicité dans le tissu adipeux ce qui finalement, maintient l'activation des macrophages et l'inflammation dans le tissu.

Ainsi, l'insulino-résistance dans le tissu adipeux entraîne une augmentation des acides gras et du glucose circulants ce qui, non seulement, engendre une hyperglycémie mais aussi entraîne un dysfonctionnement majeur de la signalisation insulinique dans le muscle et le foie (Abel *et al.* 2001).

2.1.2. L'insulino-résistance musculaire

La fonction principale de l'insuline dans le muscle est de promouvoir la captation du glucose via la translocation de GLUT4 à la membrane des myocytes. Il est admis que l'effet de l'insuline au niveau musculaire permet plus 70% de la captation du glucose post-prandial, ainsi l'apparition d'une insulino-résistance le muscle influence fortement l'homéostasie du glucose.

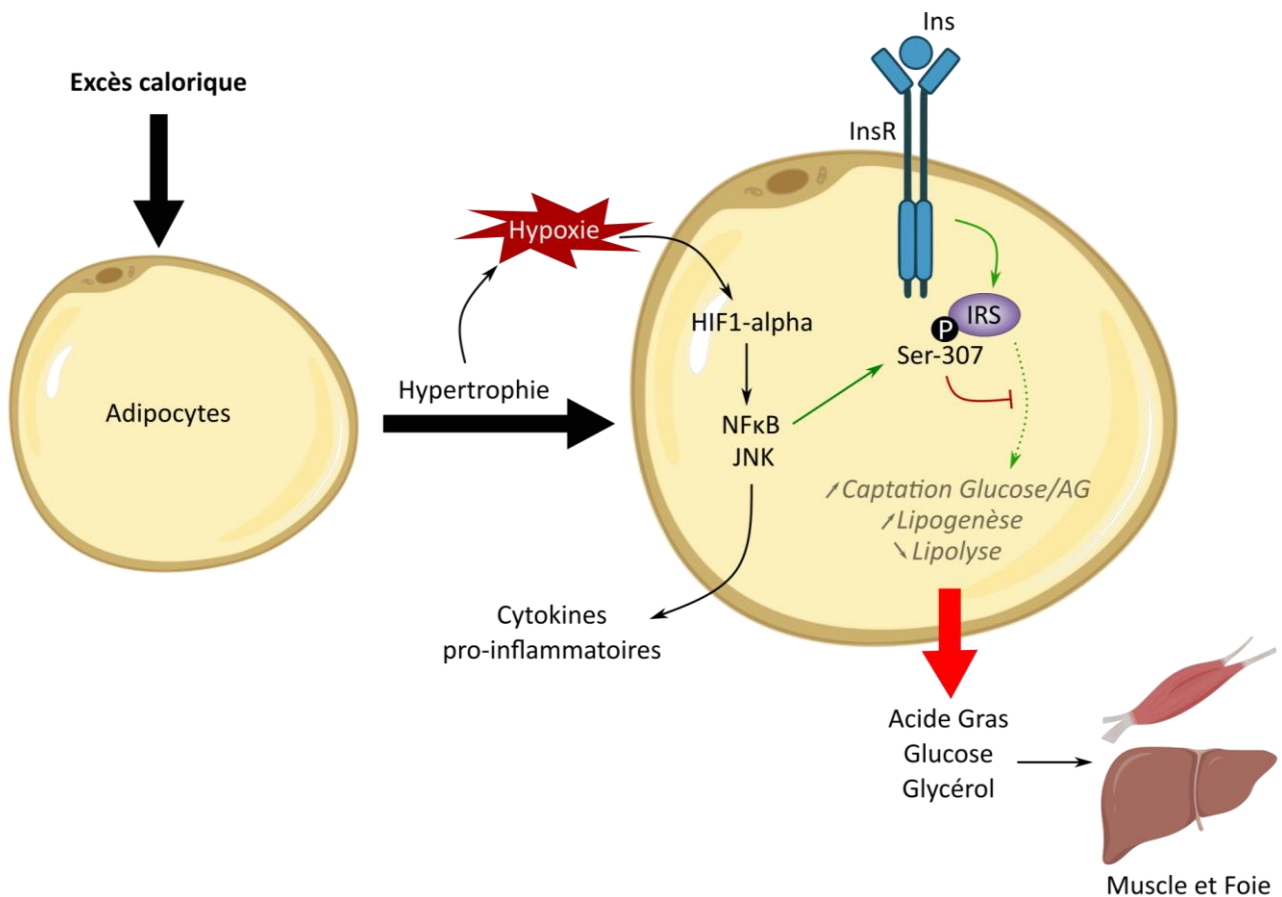


Figure 26. Installation de l'insulino-résistance dans le tissu adipeux

L'hypertrophie des adipocytes, causée par l'excès calorique, favorise le développement d'une hypoxie intratissulaire qui active le facteur de réponse à l'hypoxie : HIF-1 α . Ce facteur active alors des voies pro-inflammatoires médiées par NFk β et JNK qui induisent la phosphorylation de la sérine 307 des protéines IRS et inhibent ainsi le signal insulinaire. Par conséquent, l'insuline ne stimule plus la captation de glucose et d'acides gras (AG) ni la lipogenèse et n'inhibe plus la lipolyse. Les acides gras, le glycérol, et le glucose circulants sont ensuite redirigés vers le foie et le muscle.

Ins : Insuline ; InsR : récepteur de l'insuline

L'hypothèse principale de l'insulinorésistance musculaire repose sur une augmentation des acides gras circulants en lien avec le dysfonctionnement adipocytaire, les acides gras s'accumulent anormalement dans le muscle et *in fine* altèrent la voie de signalisation insulinique musculaire (Samuel & Shulman 2016). Ainsi, il a été montré que l'accumulation d'acide gras dans les myocytes diminuait la captation du glucose par l'insuline (Roden *et al.* 1996; Dresner *et al.* 1999), anomalie également bien décrite chez les patients obèses et insulino-résistants (Petersen *et al.* 1998).

Les acides gras intra-musculaires sont métabolisés en triglycérides par un processus d'estérification. Cependant, certains travaux suggèrent que l'insulinorésistance ne serait pas directement liée aux triglycérides mais à d'autres espèces lipidiques (Yu *et al.* 2002). En effet, le processus d'estérification des acides gras entraîne une augmentation transitoire de diacylglycérol (DAG). Or, chez le rongeur l'infusion de DAG dans le muscle squelettique active la PKC- θ (Protéine Kinase C θ) qui inhibe l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline (Itani *et al.* 2002; Szendroedi *et al.* 2014). Ce dernier n'est alors plus capable de phosphoryler les protéines IRS et par conséquent d'activer la voie de signalisation de l'insuline dans le muscle squelettique. Le transporteur GLUT4 est alors séquestré dans le cytoplasme empêchant ainsi la captation du glucose par les myocytes. **Figure 27**

2.1.3. L'insulino-résistance hépatique

L'insulino-résistance hépatique est principalement caractérisée par l'incapacité de l'insuline à inhiber la néoglucogenèse. En effet, ceci a bien été démontré chez le rongeur où la délétion du gène du récepteur à l'insuline spécifiquement dans les hépatocytes provoque une intolérance au glucose liée à une augmentation de la néoglucogenèse hépatique (Petersen & Shulman 2018). Chez l'Homme, l'insulino-résistance hépatique est fortement associée à l'accumulation de lipides dans le foie aussi appelée stéatose hépatique (Perseghin *et al.* 1999; Samuel & Shulman 2016). Pour rappel, la captation des acides gras circulants dans les cellules est médiée par la LPL. Ainsi, dans un modèle murin transgénique, la surexpression de la LPL dans les hépatocytes provoque une accumulation anormale de lipides dans ces cellules impactant péjorativement la signalisation insulinique. Dans ce modèle, le développement de l'insulino-résistance est tissu-spécifique et n'a lieu exclusivement que dans les hépatocytes (Kim *et al.* 2001). Les mécanismes qui rendent compte de l'accumulation ectopique de lipides dans le foie et de l'insulino-

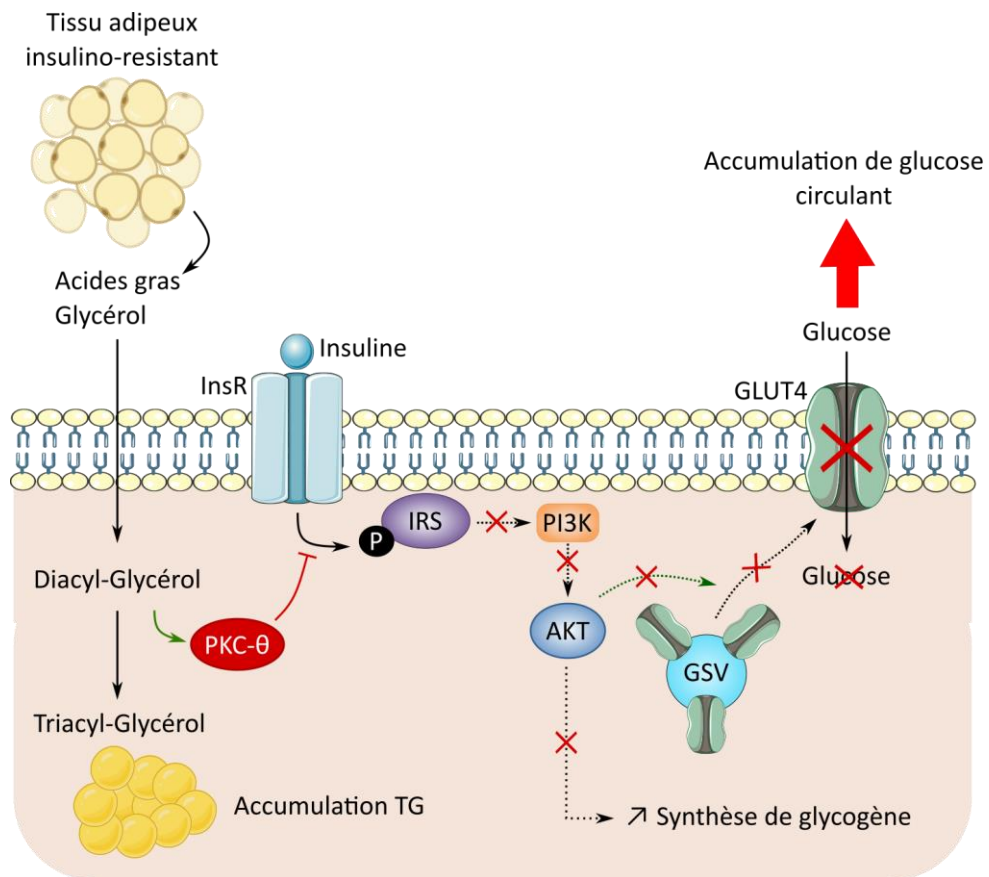


Figure 27. L'insulino résistance dans le muscle

Les acides gras et le glycérol provenant de l'alimentation ou du tissu adipeux sont captés par le tissu musculaire et s'accumulent dans les myocytes sous forme de triglycérides (TG). Le diacyl-glycérol ainsi formé, active la PKC-θ, ce qui bloque la phosphorylation des protéines IRS par le récepteur de l'insuline. Ainsi, l'insuline ne permet plus la translocation de GLUT4 à la membrane ce qui empêche la captation de glucose par les myocytes. Parallèlement, l'insuline ne favorise plus la synthèse de glycogène. L'ensemble de ces mécanismes conduisent à une augmentation de la glycémie.

résistance sont très semblables à ceux décrits dans le muscle. En effet, les acides gras intra-hépatocytaires sont estérifiés en triglycérides. Cette voie métabolique accentue la production de DAG. Or, l'augmentation de DAG dans le foie active la PKC- ϵ qui diminue alors l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline (Samuel *et al.* 2004). Les souris déficientes pour la PKC- ϵ sont protégées de l'insulino-résistance hépatique malgré l'accumulation de lipides dans le foie (Samuel *et al.* 2007).

La stéatose hépatique est expliquée par différents processus physiopathologiques. Tout d'abord, il a été montré que le dysfonctionnement du tissu adipeux engendre une accumulation anormale de lipides dans le foie. En effet, l'augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL6 et le TNF- α par le tissu adipeux viscéral est fortement corrélée à la sévérité de la stéatose hépatique chez l'Homme (Jorge *et al.* 2018). En outre, TNF- α et IL6 augmentent la synthèse de triglycérides notamment dans les hépatocytes (Popa *et al.* 2007). Par ailleurs, l'accumulation de lipides dans le foie peut être aussi médiée par l'excès des apports nutritionnels en graisses. En effet, chez la souris, l'exposition à un régime HFD pendant 3 jours stimule fortement l'accumulation de lipides dans les hépatocytes. Bien que l'insulino-sensibilité du tissu adipeux soit préservée dans ce modèle (Samuel *et al.* 2004), la stéatose hépatique induite par ces 3 jours de régime HFD est suffisante pour induire une insulino-résistance dans les hépatocytes en activant la PKC- ϵ (Samuel *et al.* 2004). Ainsi, l'accumulation ectopique de lipides dans le foie pourrait s'expliquer par des apports nutritionnels excessifs en lipides puis auto-entretenu par les conséquences délétères de l'insulino-résistance dans le tissu adipeux. **Figure 28**

En condition d'insulino-résistance hépatique, l'homéostasie du glucose est ainsi fortement altérée par la levée d'inhibition de l'insuline sur la néoglucogénèse. En outre, l'insulino-résistance du tissu adipeux, combinée à l'insulino-résistance hépatique, majore les concentrations d'acides gras libres et de glycérols qui constituent les principaux substrats de la néoglucogénèse pour les hépatocytes, l'ensemble conduisant donc à une augmentation majeure de la production hépatique de glucose.

L'émergence d'un nouveau modèle de régulation de l'homéostasie du glucose centré sur une coopération entre la périphérie et le système nerveux central supporte également l'hypothèse d'un rôle déterminant de ce dernier dans la physiopathologie du DT2. La prise alimentaire excessive notamment en lipides rencontrée dans l'obésité entraîne des conséquences majeures sur le SNC.

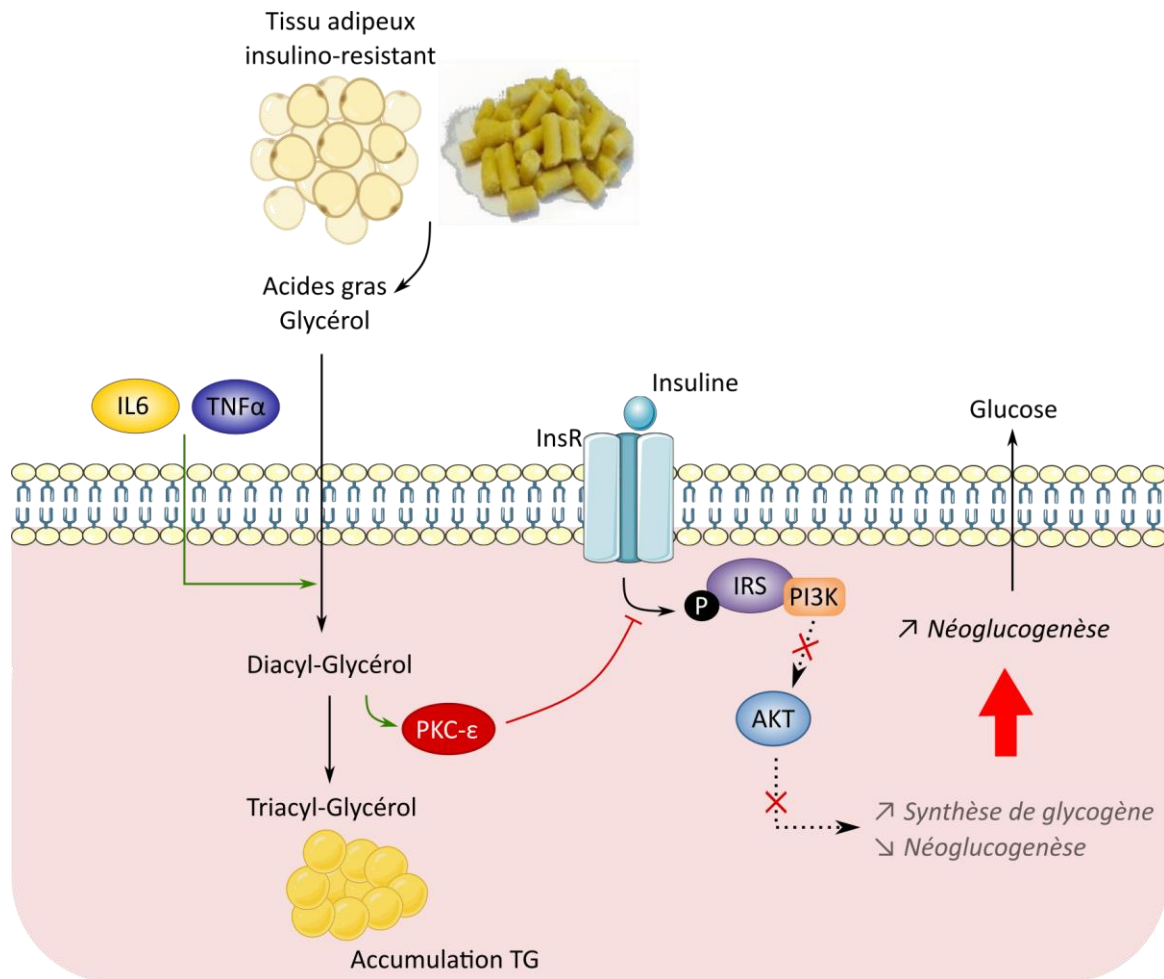


Figure 28. L'insulino résistance dans le foie

Les lipides et le glucose provenant du tissu adipeux, du muscle et de l'alimentation sont captés par les hépatocytes puis transformés en triglycérides sous l'action des cytokines pro-inflammatoires (IL6, TNFα). L'ensemble de ce processus génère du diacylglycérol qui active la PKC-ε inhibant ainsi la signalisation insulinique. Ainsi, l'insulino-résistance dans le foie favorise la production hépatique de glucose qui participe activement à l'hyperglycémie observées au cours du diabète de type 2.

2.1.4. Rôle de l'inflammation du SNC

De Souza et coll ont montré pour la première fois en 2005 que la consommation d'un régime HFD provoque une inflammation hypothalamique et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que IL1 β (interleukine 1 β), l'IL6 et le TNF- α via l'activation des voies JNK et NF κ B (De Souza *et al.* 2005). Chez le rongeur, la consommation d'un régime HFD de 24h est suffisante pour induire une augmentation des marqueurs inflammatoires hypothalamiques en l'absence d'inflammation périphérique et de prise de poids (Thaler *et al.* 2012; Berkseth *et al.* 2014). Cette inflammation est spécifique à l'ARC et favorise le recrutement des cellules gliales. L'activation du pattern inflammatoire des cellules gliales et des neurones durant les premiers jours du régime HFD chez la souris est cependant transitoire et peut être reversée par la reprise d'une nourriture standard (Thaler *et al.* 2012; Berkseth *et al.* 2014). Ce phénomène pourrait constituer un mécanisme de défense contre l'excès calorique et lipidique. En revanche, cette diminution des marqueurs inflammatoires après 1 semaine de régime HFD est de courte durée puisque l'exposition chronique au régime HFD (plus de 4 semaines chez la souris) entraîne de nouveau le développement d'une inflammation centrale (Thaler *et al.* 2012).

Les mécanismes moléculaires de l'inflammation hypothalamique, partiellement connus, s'appuient sur une forte implication des acides gras saturés et du récepteur *Toll-like receptor 4* (TLR4) (Milanski *et al.* 2009; Gupta *et al.* 2012; Huang *et al.* 2012; Lee *et al.* 2014). Ainsi, les souris invalidées pour le gène du TLR4 sont protégées vis-à-vis de l'inflammation induite par le palmitate (Zhao *et al.* 2017; Lancaster *et al.* 2018). L'activation des voies de signalisation de JNK et NF κ B par TLR4 provoque une libération de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL1 β et l'IL6 (Tak & Firestein 2001).

Par ailleurs, l'excès calorique occasionne des dysfonctionnements de la BHE. En effet, chez le patient diabétique et chez la souris soumise à un régime HFD ou riche en sucre, des modifications architecturales et fonctionnelles de la BHE ont été observées (Yi *et al.* 2012). L'épithélium fenestré de l'éminence médiane constitue physiologiquement un filtre pour le passage sélectif des molécules périphériques du compartiment sanguin vers le SNC. L'exposition chronique à un régime HFD modifie la perméabilité de la BHE via une réduction de l'expression des protéines de jonction serrées (Chehade *et al.* 2002; Argaw *et al.* 2009; Sajja *et al.* 2014; Yoo *et al.* 2016; Xu *et al.* 2017). Il en résulte une activation des voies inflammatoires astrocytaires et le recrutement de monocytes qui auto-entretiennent l'inflammation locale.

Ainsi, l'inflammation hypothalamique observée au cours de l'obésité résulte de l'inflammation de bas grade périphérique associée à une action directe des acides gras saturés sur les astrocytes et les neurones. Le dysfonctionnement des organes périphériques induit par l'insulino-résistance augmente les concentrations circulantes d'acides gras et par conséquent contribue à l'inflammation centrale. La stimulation des voies pro-inflammatoires dans l'hypothalamus favorise l'apoptose des populations neuronales de l'ARC (AgRP/NPY et POMC) impactant le système de régulation de l'homéostasie énergétique centrale (Jais & Brüning 2017). De plus, l'inflammation centrale perturbe la fonction de « glucose sensing » de l'hypothalamus ainsi que l'action de l'insuline (Parton *et al.* 2007; Purkayastha *et al.* 2011; de Andrade *et al.* 2015). L'hypothalamus n'est alors plus capable de réguler des fonctions clés de l'homéostasie glucidique. **Figure 29**

2.1.5. Rôle de la leptino-résistance

Comme nous l'avons vu précédemment, la leptine est sécrétée par le tissu adipeux en réponse à l'augmentation de celui-ci. La leptine agit ensuite sur son récepteur hypothalamique afin de diminuer la prise alimentaire et d'augmenter la sensibilité centrale à l'insuline. Chez la souris rendue obèse par un régime HFD, la leptine n'est plus capable d'activer sa voie de signalisation hypothalamique, ce qui correspond à la leptino-résistance (Seeley *et al.* 1996; Halaas *et al.* 1997; Münzberg *et al.* 2004).

L'inflammation centrale joue un rôle déterminant dans la leptino-résistance observée dans l'obésité. En effet, l'excès calorique et principalement l'apport excessif de lipides entraînent comme nous l'avons déjà vu l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoires hypothalamiques NFκB et JNK. Tout d'abord, l'activation de la voie NFκB dans l'hypothalamus est associée à une surexpression de la cytokine SOCS3 (*Suppressor Of Cytokine Signaling 3*) qui régule négativement la signalisation de la leptine (Zhang *et al.* 2008). De plus, l'inhibition hypothalamique de la voie JNK soit par des inhibiteurs pharmacologiques soit par son invalidation dans des modèles murins transgéniques améliore fortement la sensibilité à la leptine (Sabio *et al.* 2010). Enfin, l'inhibition centrale de la voie du TLR4 permet une restauration de la leptino-résistance induite par un régime HFD chez le rongeur (Milanski *et al.* 2009).

Parallèlement à l'inflammation centrale, l'hypersécrétion de leptine observée dans l'obésité pourrait induire sa propre résistance hypothalamique. En effet, la sécrétion de leptine augmente

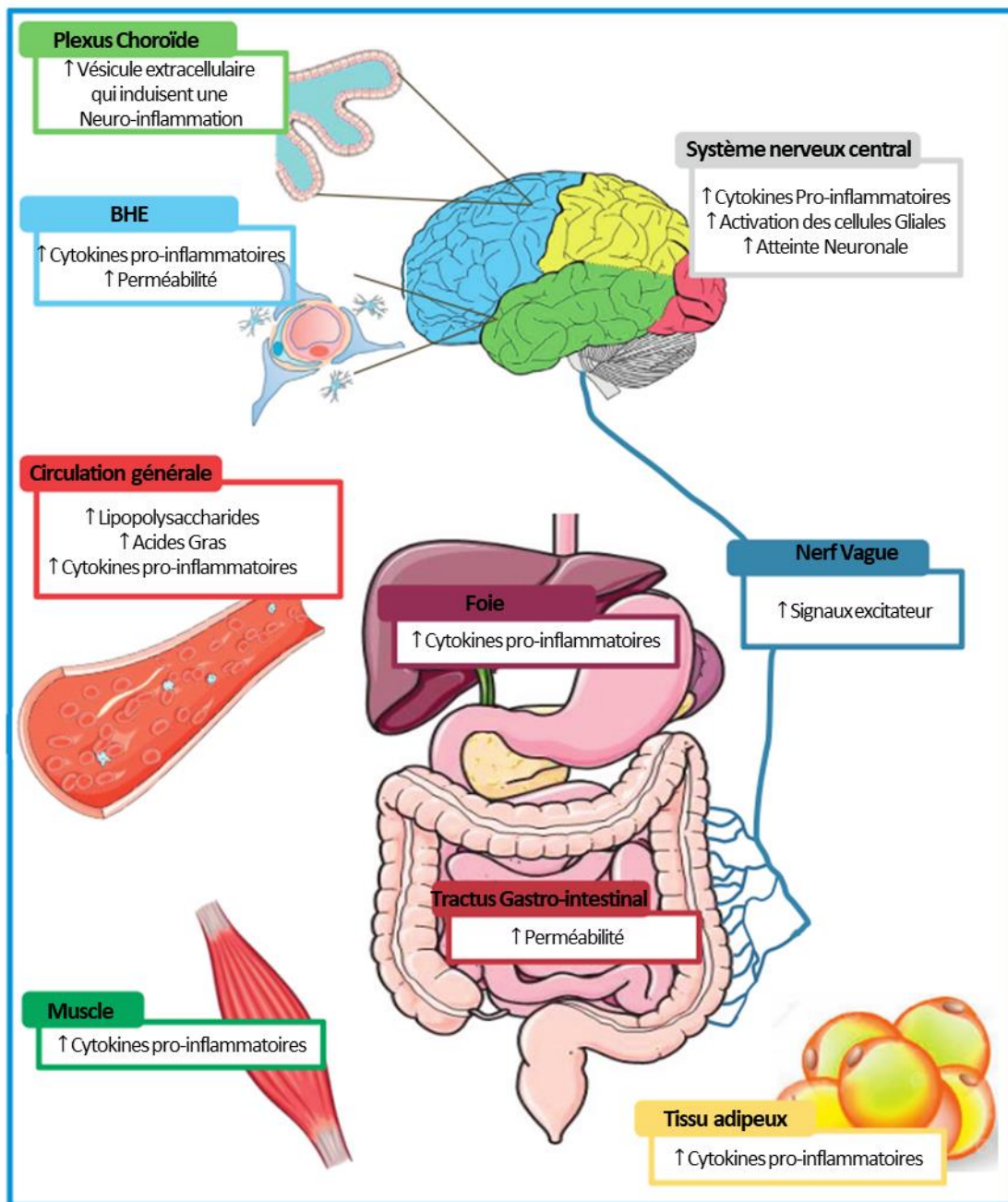


Figure 29. L'inflammation induite par l'obésité et l'excès calorique

La surnutrition et l'obésité augmentent les concentrations plasmatiques d'acides gras, d'endotoxines et de cytokines pro-inflammatoires ce qui entraîne des dysfonctionnements métaboliques dans plusieurs organes. Le système nerveux central, par l'intermédiaire du nerf vague et de la BHE, est affecté par cette inflammation périphérique. Il en résulte une augmentation de la perméabilité de la BHE, l'activation des cellules gliales et une neuro-inflammation.

D'après Guillemot-Legris et Muccioli 2017

avec l'hypertrophie des adipocytes, qui est principalement causée par l'excès calorique comme nous l'avons vu (*CF Chapitre 3-2.1*) (Couillard *et al.* 2000). La souris ob/ob (déficiente pour la leptine) soumise à un régime HFD reste sensible à la leptine exogène soutenant l'hypothèse que l'excès de lipides n'est pas suffisant pour induire la résistance à la leptine (Knight *et al.* 2010). De façon similaire, une réduction de la production de la leptine chez la souris HFD permet de restaurer la sensibilité à la leptine dans l'hypothalamus (Zhao *et al.* 2019). Les mécanismes moléculaires sous-jacents à ce phénomène ne sont pas encore bien élucidés, cependant une étude récente a montré que la leptine contribuait fortement à l'induction de l'inflammation centrale liée à un régime HFD (Pretz *et al.* 2021). Ainsi l'obésité et l'excès calorique favorisent l'hypertrophie des adipocytes et l'augmentation de la sécrétion de la leptine qui induirait l'inflammation centrale et sa propre résistance. La perte du signal anorexigène de la leptine contribuerait alors à une augmentation des apports caloriques et à l'installation d'un cercle vicieux.

2.1.6. Rôle et mécanismes de l'insulino-résistance centrale

Comme pour les organes périphériques, l'insulino-résistance dans le SNC se traduit par l'incapacité de l'insuline à réguler l'homéostasie glucidique en activant son récepteur hypothalamique. Cette insulino-résistance peut être liée à une diminution du transport de l'insuline vers le SNC et/ou à un défaut de signalisation intracellulaire.

Pour compenser l'insulino-résistance qui s'installe progressivement dans les organes périphériques avec l'obésité, les concentrations plasmatiques d'insuline augmentent. Cependant, comme nous l'avons vu, l'insuline rejoint le compartiment central via un mécanisme dépendant d'un transporteur saturable (Baura *et al.* 1993; Hersom *et al.* 2018; Rhea *et al.* 2018). Ce transporteur saturable constitue donc un facteur limitant pour le passage de l'insuline dans le SNC. Ainsi, le ratio $[\text{insuline}]_{\text{LCR}}/[\text{insuline}]_{\text{Plasma}}$ diminue et le cerveau est finalement exposé à une « hypoinsulinémie » comparativement aux organes périphériques (Stein *et al.* 1987; Kaiyala *et al.* 2000; Kern *et al.* 2006; Heni *et al.* 2014a). En outre, l'administration icv d'insuline chez le rongeur obèse ou intranasale chez le patient obèse (qui permet à l'insuline d'accéder directement au SNC) ne permet pas de restaurer la normoglycémie suggérant que d'autres mécanismes sont également impliqués dans l'insulino-résistance centrale (Ikeda *et al.* 1986; Hallschmid *et al.* 2008; Clegg *et al.* 2011; Heni *et al.* 2014b).

Comme pour l'inflammation centrale, l'insulino-résistance centrale apparaît précocement dès 72h après l'exposition au régime HFD (Clegg *et al.* 2011). Induite par l'inflammation centrale, l'augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires favorise le développement de l'insulino-résistance centrale. L'exposition du SNC au TNF- α est associée au développement de l'insulino-résistance centrale (Romanatto *et al.* 2007). En effet, le TNF- α augmente l'expression de la phosphatase PTP1B (*Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1*) qui réduit la signalisation de l'insuline en déphosphorylant son récepteur ainsi que les protéine IRS (Bence *et al.* 2006; Zabolotny *et al.* 2008). La délétion de PTP1B dans les neurones est d'ailleurs associée à une amélioration de l'homéostasie du glucose (Bence *et al.* 2006).

Par ailleurs, l'activation du TLR4 par les acides gras recrute la voie de signalisation médiée par JNK qui, comme dans le tissu adipeux, stimule la phosphorylation du récepteur de l'insuline sur la serine 307 bloquant ainsi la signalisation insulinique (Aguirre *et al.* 2002). De plus, les acides gras saturés tels que le palmitate activent la PKC- θ qui inhibe la signalisation insulinique médiée par PI3K spécifiquement dans les neurones AgRP de l'ARC (Benoit *et al.* 2009).

Ainsi, l'inflammation centrale perturbe la signalisation insulinique centrale. L'insuline n'est alors plus capable de réguler la glycémie. L'apparition précoce de l'insulino-résistance centrale participe sans doute activement à la dérégulation de l'homéostasie glycémique observée dans l'obésité et le DT2. **Figure 30**

3. Rôle des incrétines dans l'obésité et le diabète de type 2

Comme nous l'avons vu, les incrétines, GIP et GLP-1, participent puissamment à la régulation de la glycémie notamment en potentialisant la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Dans le contexte de l'obésité associée au DT2 de nombreuses études ont rapporté des altérations majeures du système incrétine.

Chez les patients souffrant de DT2, il a été rapporté que l'effet incrétine, c'est à dire la sécrétion d'insuline après une charge orale en glucose, est fortement diminué (Perley & Kipnis 1967; Nauck *et al.* 1986; Knop *et al.* 2007; Bagger *et al.* 2011). Cette diminution de l'effet incrétine est expliquée par une diminution de la sécrétion et/ou une diminution de l'effet insulino-trope du GIP et du GLP-1.

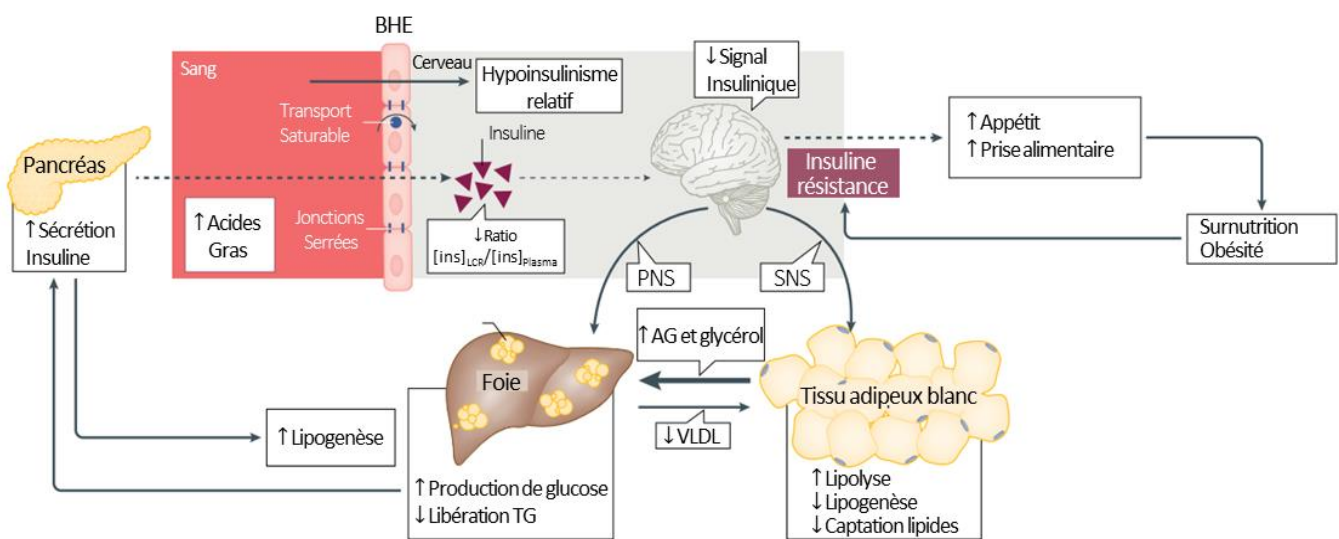


Figure 30. Insulino-résistance centrale et conséquences métabolique.

L'obésité induit une augmentation de la sécrétion d'insuline par le pancréas. Le cerveau quant à lui est exposé à un hypoinsulinisme relatif et à une diminution du signal insulinaire central conduisant à une augmentation de la lipolyse dans le tissu adipeux et à une augmentation de la production hépatique de glucose. Parallèlement la perte du signal anorexigène de l'insuline augmente la prise alimentaire ce qui entretient l'obésité et l'insulino-résistance.

D'après Scherer *et al.* 2021

En ce qui concerne la sécrétion des incrétines au cours du diabète, les résultats dans la littérature sont hétérogènes. Tout d'abord, il a été montré que les concentrations plasmatiques à jeun de GIP étaient augmentées chez les patients obèses (Jones *et al.* 1989; Chia *et al.* 2017). Contrairement aux concentrations à jeun de GLP-1 qui ne sont pas modifiées chez les patients (Chia *et al.* 2017). Parallèlement, au cours d'une charge orale en glucose, la sécrétion de GIP est augmentée chez les patients diabétiques (Salera *et al.* 1982; Jones *et al.* 1989; Chia *et al.* 2017). En ce qui concerne le GLP-1, les résultats sont plus controversés et certaines études rapportent une réduction significative de la sécrétion de GLP-1 induite par le glucose chez les sujets obèses et diabétiques (Toft-Nielsen *et al.* 2001; Vilsbøll *et al.* 2003) tandis que d'autres études ne montrent aucune différence entre les patients et les sujets sains (Nauck *et al.* 2011; Calanna *et al.* 2013). Enfin, une méta-analyse de 2011 suggère une grande variabilité inter-individuelle de la sécrétion de GLP-1 après une charge orale en glucose dépendamment du sexe, de l'âge, des agents pharmacologiques mais aussi du stade de la pathologie (stade de prédiabète, diabète avéré) ce qui pourrait naturellement expliquer la discordance des données de la littérature (Færch *et al.* 2015). Globalement, la perte de l'effet incrétine observée chez les patients diabétiques ne semble pas s'expliquer par une diminution de la sécrétion d'insuline.

Dans ce contexte, la sensibilité des îlots pancréatiques aux deux hormones incrétines a été étudiée. Chez les patients DT2, les îlots pancréatiques demeurent sensibles au GLP-1. Cependant, l'effet insulino-trope du GLP-1 est 3 à 5 fois moins important que chez les sujets sains (Elahi *et al.* 1994; Kjemis *et al.* 2003). En revanche, chez les patients DT2, les cellules β deviennent complètement insensibles au GIP, ainsi en dépit de l'élévation des concentrations plasmatiques de GIP observée chez les patients, l'effet insulino-trope du peptide est aboli (Krarup *et al.* 1987; Elahi *et al.* 1994; Kjemis *et al.* 2003). La diminution de la capacité sécrétoire d'insuline du pancréas classiquement décrite dans le DT2 (*Cf ci-dessous*) ainsi que la diminution de l'expression du récepteur au GIP sur les cellules β (Lynn *et al.* 2001; Xu *et al.* 2007; Kaneto & Matsuoka 2013) contribuent à la perte d'effet incrétine du peptide.

4. Le dysfonctionnement de la cellule β

4.1. Les mécanismes compensatoires de la cellule β

L'insulino-résistance observée dans les tissus périphériques et dans le SNC entraîne une augmentation des concentrations plasmatiques de glucose, d'acides gras libres et de cytokines

pro-inflammatoires. En réponse à ces anomalies, les cellules β pancréatiques développent des mécanismes compensatoires afin d'augmenter la sécrétion d'insuline. Parmi ces mécanismes, la prolifération des cellules β joue un rôle déterminant. En effet, chez la souris *ob/ob*, obèse et insulino-résistance, le volume des cellules β est 3.6 fois plus élevé que chez la souris contrôle (Bock *et al.* 2003). Parallèlement, les modèles murins qui présentent un défaut de prolifération des cellules β développent plus rapidement un diabète et une insulino-résistance en cas d'exposition à un régime HFD (El Ouaamari *et al.* 2016; Shirakawa *et al.* 2017). Chez l'Homme, l'augmentation de la prolifération et du volume des cellules β est plus difficile à quantifier mais des études d'analyse de tissus *post-mortem* ont permis de confirmer ce résultat (Klöppel *et al.* 1985; Rahier *et al.* 2008).

Cette augmentation de la prolifération cellulaire observée dans le pancréas des sujets diabétiques afin de pallier la forte demande en insuline n'est pas le seul mécanisme compensatoire mis en place par la cellule β . En effet, des études ont montré que lorsqu'elles sont exposées à un milieu riche en glucose, elles augmentent l'expression du transporteur GLUT2 et stimulent l'activité de la GCK afin de favoriser l'hypersécrétion d'insuline (Chen *et al.* 1994; Larqué *et al.* 2011).

4.2. La défaillance des cellules β au cours du diabète

La normoglycémie chez les patients insulino-résistants est maintenue au prix d'un hyperinsulinisme. Cependant, ce dernier n'est que transitoire car la sollicitation permanente du pancréas provoque des dysfonctionnements majeurs des cellules β affectant la fonction mais aussi la quantité de cellules β . En effet, de nombreuses études ont rapporté une forte diminution (24 à 65%) de la masse de cellules β chez les patients diabétiques (Clark *et al.* 1988; Sakuraba *et al.* 2002; Butler *et al.* 2003; Rahier *et al.* 2008; Inaishi *et al.* 2016) associée à une diminution de la taille des îlots pancréatiques (Deng *et al.* 2004). Parallèlement, la capacité de sécrétion d'insuline chez les patients DT2 s'accroît avec la durée de la maladie, l'ensemble de ces anomalies contribue naturellement à la physiopathologie de l'hyperglycémie observée dans le DT2. (Ward *et al.* 1984; Jensen *et al.* 2002; Ferrannini *et al.* 2005). Cette défaillance des cellules β au cours de la maladie repose sur des processus multifactoriels.

Tout d'abord, l'augmentation de la production d'insuline sollicite fortement le réticulum endoplasmique. L'accumulation de protéines mal conformées pourrait activer les mécanismes

de stress du réticulum et *in fine* l'apoptose cellulaire des cellules β (Rabhi *et al.* 2014). L'activation des marqueurs du stress du réticulum tels que le facteur de transcription CHOP est élevée dans les cellules β pancréatiques des souris exposées au régime HFD (Song *et al.* 2008; Oh *et al.* 2018). Chez l'Homme, la taille du réticulum endoplasmique des cellules β des patients DT2 est deux fois plus élevée que chez les sujets sains ce qui peut être considéré comme un marqueur du stress du réticulum endoplasmique (Remedi & Emfinger 2016).

Deuxièmement, des anomalies mitochondriales liées à la lipotoxicité induisent un dysfonctionnement des cellules β . Les acides gras potentialisent la sécrétion d'insuline induite par le glucose notamment en augmentant la concentration intracellulaire de calcium et donc l'exocytose (Deeney *et al.* 2000; Nolan *et al.* 2006). Cependant, l'hyperlipidémie chronique peut, au contraire, diminuer la sécrétion d'insuline (Oprescu *et al.* 2007). Bien que les mécanismes moléculaires ne soient pas encore bien connus, l'accumulation intracellulaire de lipides induit un dysfonctionnement mitochondrial responsable d'une surproduction d'espèces réactives à l'oxygène et donc un stress oxydatif (Supale *et al.* 2012; Gerber & Rutter 2017; Oh *et al.* 2018). La diminution de la fonction mitochondriale dans les cellules β contribue à la diminution de l'insulinosécrétion et l'augmentation du stress oxydatif participe à l'apoptose des cellules β

Figure 31.

Enfin, il a récemment été montré que l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie pouvaient induire une dédifférenciation des cellules β (Accili *et al.* 2016; Chen *et al.* 2017). Ce phénomène de dédifférenciation est caractérisé par une diminution de l'expression de certains facteurs de transcription clés dans la fonction de la cellule β et une augmentation des facteurs de transcription spécifiques des cellules progénitrices (Talchai *et al.* 2012). Ces cellules β dédifférenciées deviennent négatives à l'immunomarquage pour l'insuline et ne participent plus à la régulation de l'homéostasie glucidique. Les mécanismes de dédifférenciation cellulaire ne sont pas élucidés, toutefois, la normalisation de la glycémie et un traitement à l'insuline chez le rongeur pourraient reverser ce phénomène (Wang *et al.* 2014).

Au total, l'insulino-résistance qui s'installe progressivement dans les différents organes lors de l'excès calorique génère une augmentation de la sécrétion d'insuline qui permet initialement de maintenir la normoglycémie. Cependant, cet hyperinsulinisme ne peut pas perdurer en raison des conséquences du stress du réticulum, de la dysfonction mitochondriale et *in fine* de l'apoptose de la cellule β . C'est alors le début d'un cercle vicieux où la diminution de

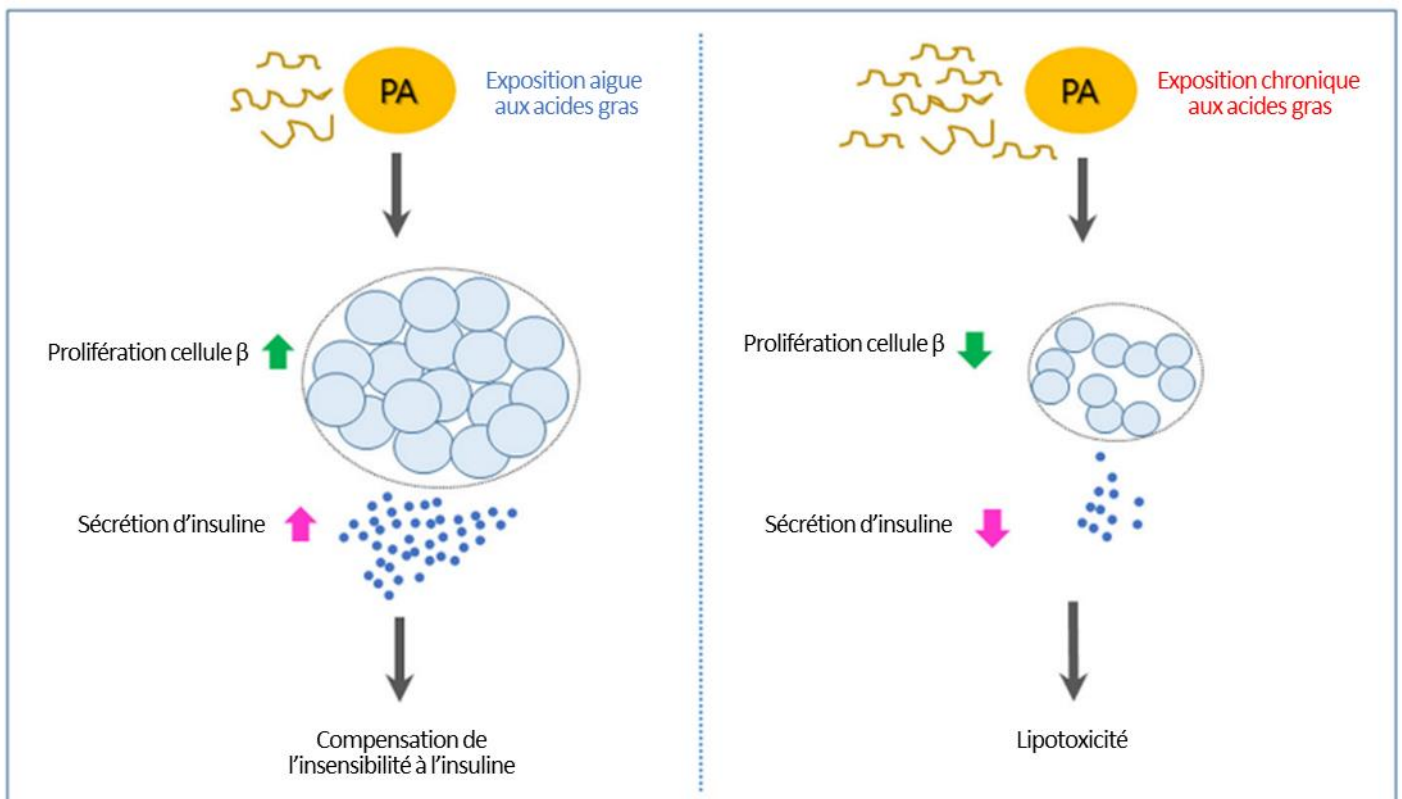


Figure 31. Mécanisme de la défaillance des cellules β pancréatiques en condition de lipotoxicité.

En condition d'insulino-résistance, l'augmentation des acides gras circulants favorise la prolifération des cellules β ainsi que la sécrétion d'insuline afin de compenser la perte d'insulino sensibilité. Cependant l'exposition chronique aux acides gras participe au dysfonctionnement et à l'apoptose des cellules β ce qui conduit au diabète de type 2.

D'après Oh *et al.* 2018

l'insulinémie et l'insulino résistance ne permettent plus de maîtriser la glycémie et la lipidémie amplifiant alors l'apoptose et la défaillance des cellules β **Figure 32**

5. Les traitements actuels du diabète

La physiopathologie de l'obésité, de l'insulino résistance et du DT2 est complexe et repose sur de nombreuses anomalies métaboliques. Elle ouvre le champ finalement à de nombreuses approches thérapeutiques. L'ensemble de ces traitements a pour objectif un maintien durable de la normoglycémie et l'amélioration, la restauration des systèmes de régulation défaillants.

Tout d'abord, la metformine apparaît comme le traitement le plus communément utilisé pour traiter les patients diabétiques. Elle n'a pas d'effet sur la fonction pancréatique cependant elle permet de limiter la glycogénèse hépatique en inhibant les enzymes de la néoglucogénèse.

Ensuite, d'autres classes thérapeutiques améliorent la sécrétion d'insuline telles que les sulfonylurées. La prise prolongée de ces traitements pourrait favoriser une hyperinsulinémie potentiellement délétère sur le long terme et accélérer les dysfonctionnements des cellules β comme nous l'avons vu précédemment.

Certains traitements améliorent la sensibilité à l'insuline. C'est le cas des thiazolidinediones qui amplifient l'action de l'insuline dans le muscle, le foie et le tissu adipeux notamment en stimulant le métabolisme du glucose (GLUT 4, glycogène synthase) et le métabolisme des lipides (augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la lipogénèse).

Enfin, certains traitements visent à améliorer le système des incrétines défaillant dans le DT2. Les inhibiteurs de la peptidase DPP4, diminuent la dégradation du GLP1 et donc de favoriser son action. Les agonistes du GLP-1 (exenatide, liraglutide...) augmentent la sécrétion d'insuline en activant directement le récepteur au GLP-1 pancréatique. De plus, les analogues du GLP1 diminuent la prise alimentaire et donc favorisent la perte de poids.

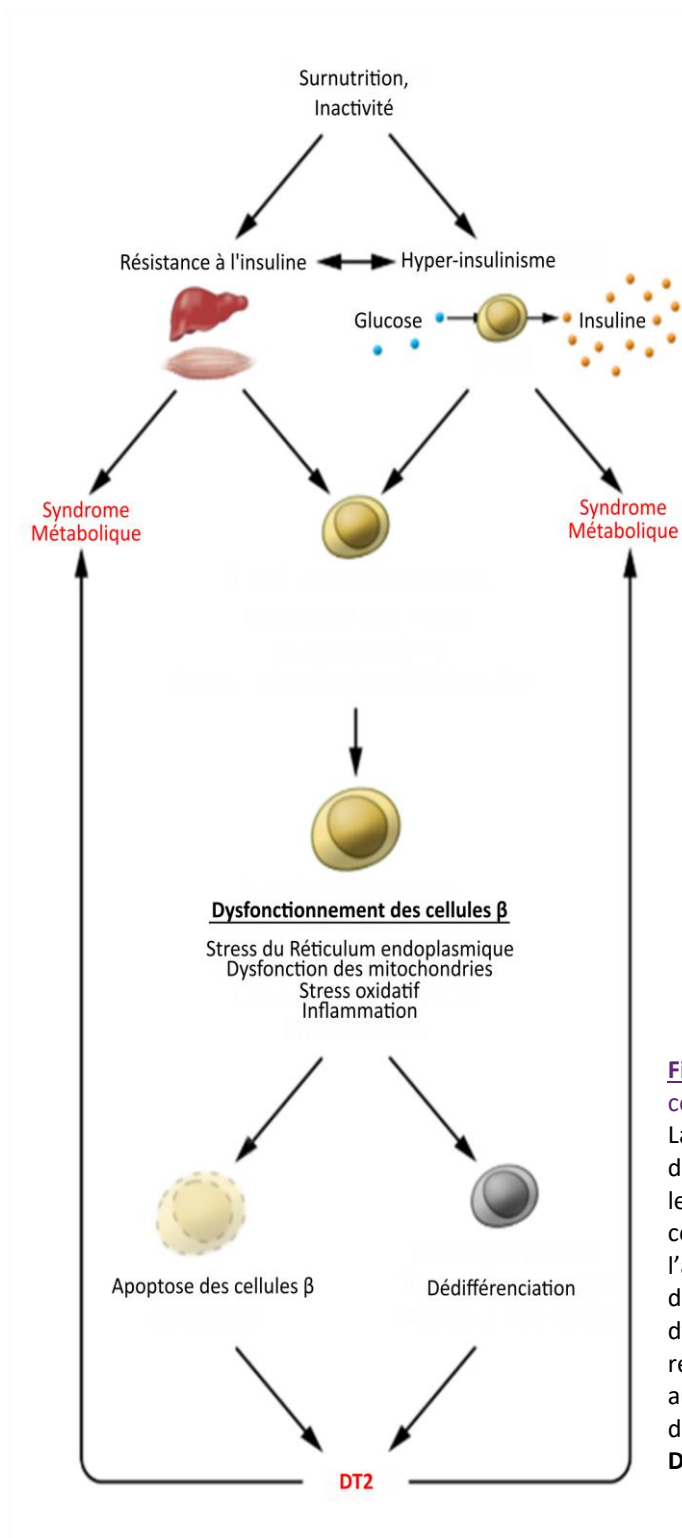


Figure 32. Mécanisme de compensation des cellules β dans le diabète de type 2

La surnutrition et l'inactivité favorise le développement de l'insulino-résistance qui force les cellules β à adopter des mécanismes compensatoires. La prolifération des cellules β , l'augmentation de la réponse UPR, l'augmentation de la fonction mitochondriale entraîne le dysfonctionnement des cellules β . Le stress du réticulum, le stress oxydatif et l'inflammation augmente l'apoptose des cellules β et leur dédifférenciation conduisant au diabète de type 2. D'après Hudish *et al.* 2019

La liste des traitements énoncés ici n'est pas exhaustive mais elle rend compte de la diversité thérapeutique du diabète. Cependant, malgré le développement de ces thérapies, les observations cliniques montrent que de nombreux patients sont résistants aux traitements disponibles. Le recours à l'insulinothérapie est fréquent y compris dans le DT2, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques demeure donc indispensable (Scheen 2017). **Figure 33**

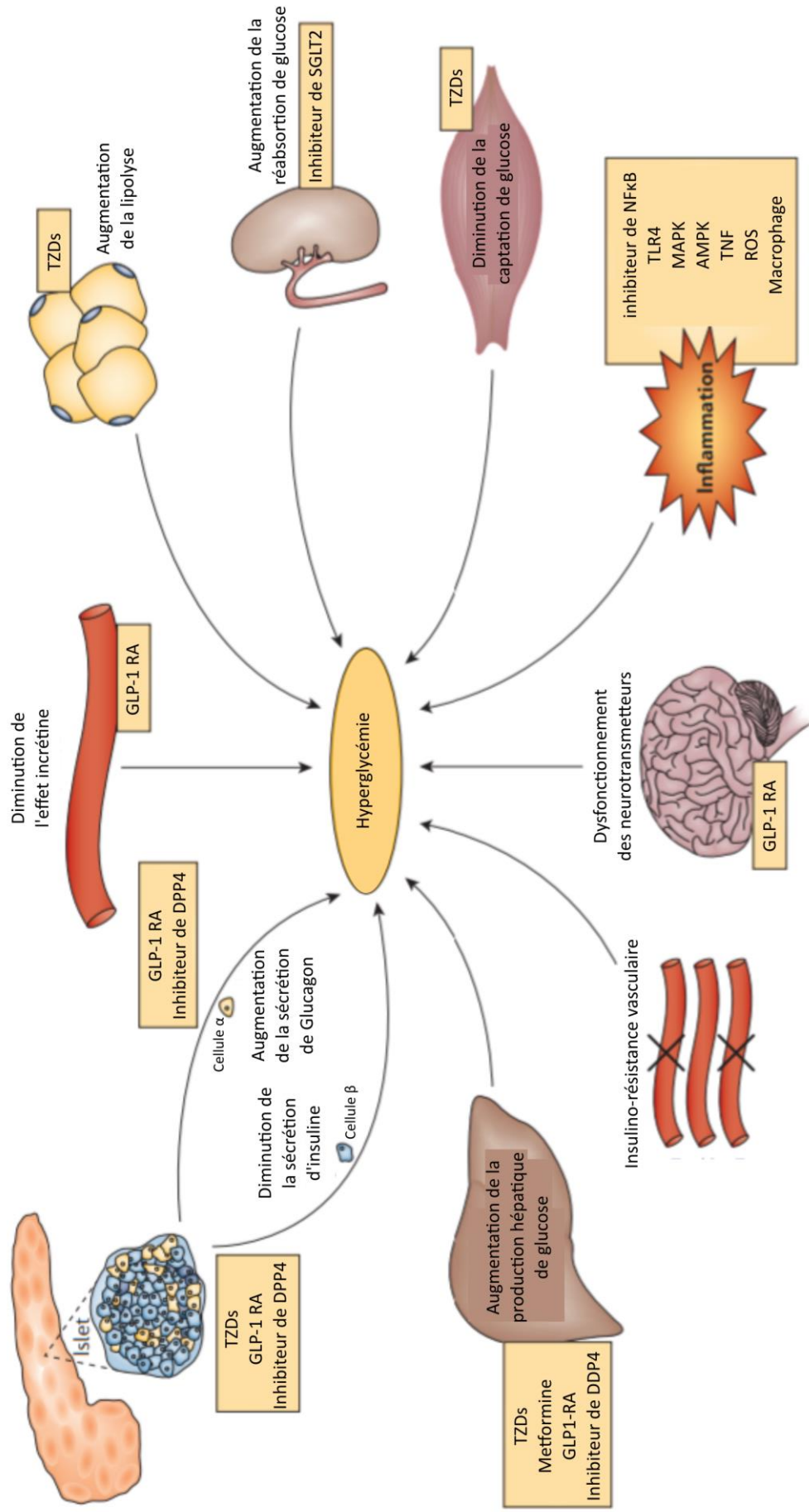


Figure 33. Ensemble des stratégies thérapeutiques pour le diabète de type 2.
 GLP-1 RA : Analogue du GLP-1, TZDs : thiazolidinediones
 D'après Defronzo et al. 2015

OBJECTIFS

Pour résumer, l'homéostasie glycémique est un processus complexe qui met en jeu de nombreux organes et effecteurs. L'insuline, sécrétée par les cellule β pancréatiques, est l'hormone principale dans la régulation de l'hyperglycémie. Dans un premier temps, l'insuline agit directement sur ces organes cibles : le muscle, le tissu adipeux et le foie. Elle va alors (i) favoriser la captation de glucose et son stockage sous forme de glycogène ; (ii) diminuer la production hépatique de glucose ; et enfin (iii) favoriser la captation de lipides par le tissu adipeux. Dans un second temps, l'insuline va amplifier l'ensemble de ses actions périphériques en activant directement son récepteur présent dans l'hypothalamus.

Le neuropeptide 26RFa, est produit par l'hypothalamus mais aussi par d'autres organes tels que le duodénum et le pancréas. Ce neuropeptide a récemment été caractérisé comme une nouvelle hormone incrétine. En effet, à l'instar des autres hormones incrétones comme le GLP-1 et le GIP, le 26RFa est sécrété par l'intestin après une charge orale en glucose et stimule la sécrétion d'insuline en activant directement son récepteur, le GPR103, présent sur les cellules β . De plus, le 26RFa augmente la sensibilité à l'insuline probablement en favorisant la captation de glucose et d'acides gras par le muscle et le tissu adipeux réciproquement. Parallèlement, l'action centrale de l'insuline stimule la production et la sécrétion du 26RFa par l'hypothalamus. Le 26RFa central, exerce alors un effet anti-hyperglycémiant en stimulant la production périphérique d'insuline. Le 26RFa apparaît alors comme un nouvel acteur dans la régulation centrale et périphérique de la glycémie.

Au cours de certaines pathologies, le système gluco-régulateur peut être défaillant. C'est notamment le cas durant l'obésité et le DT2. Durant ces pathologies, l'excès calorique ainsi que l'augmentation de la masse grasse favorise le développement d'une inflammation centrale et périphérique. Cette inflammation entraîne alors un dysfonctionnement des voies de signalisation de l'insuline dans le muscle, le tissu adipeux, le foie et le système nerveux central. Ces anomalies perturbent fortement la régulation de la glycémie qui devient alors anormalement élevée chez les patients.

Aujourd'hui, le fonctionnement du système neuropeptidergique 26RFa/GPR103 dans le contexte physiopathologique de l'obésité et du DT2 n'est pas connu. Ainsi l'objectif de cette thèse est de déterminer l'impact de l'obésité et de l'hyperglycémie chronique sur les

mécanismes d'action du 26RFa dans la régulation de la glycémie à la fois périphérique et centrale.

Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle de souris classiquement utilisé pour étudier l'obésité associée au DT2 : les souris « *High Fat Diet* ». Comme nous l'avons vu, le développement de l'obésité et du DT2 est fortement associé à l'excès de calories apportées par l'alimentation et particulièrement à l'excès de lipides. Afin de convenir au mieux à la pathogenèse chez l'Homme, les souris adultes sont soumises à un régime fortement enrichi en graisses (beurre anhydre). Après plusieurs semaines, les souris présentent une surcharge pondérale associée à une hyperglycémie chronique.

Ainsi, dans ce modèle de souris HFD, nous avons dans un premier temps déterminé l'impact du régime HFD sur le système 26RFa/GPR103 périphérique. Dans un second temps, nous avons utilisé un modèle de souris déficientes pour le 26RFa que nous avons soumises à ce même régime riche en graisses afin de déterminer si l'absence de 26RFa pouvait altérer le phénotype obèse et hyperglycémique des souris. Enfin, dans un troisième temps, nous avons déterminé les effets centraux du 26RFa dans la régulation de la glycémie dans ce modèle de souris HFD. Ce deuxième objectif se divise en deux parties. La première était de déterminer les effets d'une injection aiguë de 26RFa sur le métabolisme glucidique. La deuxième partie était d'évaluer les effets d'une infusion icv chronique de 26RFa sur le phénotype obèse et diabétique des souris HFD.

Ainsi, durant ces travaux de thèse nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

- Le 26RFa conserve-t-il son effet anti-hyperglycémiant périphérique chez les souris HFD ?
- Comment le régime HFD impact-il le système 26RFa/GPR103 périphérique ?
- Le 26RFa conserve-t-il ses effets anti-hyperglycémians centraux chez les souris HFD ?
- Un traitement central de longue durée peut-il améliorer le phénotype obèse et diabétique des souris HFD ?

RESULTATS

Article 1 : Le 26RFa est un régulateur clé dans la régulation de l'homéostasie énergétique et son activité est altérée chez la souris obèse et hyperglycémique

Gaëtan Prévost, Arnaud Arabo, **Marie-Anne Le Solliec**, Justine Bons, Marie Picot, Julie Maucotel, Hind Berrahmoune, Mouna El Mehdi, Saloua Cherifi, Alexandre Benani, Emmanuelle Nédélec, Moïse Coëffier, Jérôme Leprince, Anneli Nordqvist, Valéry Brunel, Pierre Déchelotte, Hervé Lefebvre, Youssef Anouar, and Nicolas Chartrel

Article publié le 01 juillet 2019 dans Am J Physiol Endocrinol Metab

Le 26RFa est un neuropeptide qui a récemment été décrit comme une nouvelle incrétine. En effet, le 26RFa est sécrété par l'intestin et exerce une activité insulinothrompe en activant directement son récepteur, le GPR103, sur les cellules β pancréatiques. De plus, des injections intra-péritonéales de 26RFa augmentent la sensibilité de l'insuline notamment en favorisant la captation de glucose par le muscle squelettique et la captation d'acide gras par le tissu adipeux. Alors qu'il est bien connu que l'effet incrétine est fortement réduit en condition d'obésité associée au diabète, aucune étude n'a encore évalué le rôle du système 26RFa/GPR103 dans ces conditions.

Nous avons dans un premier temps caractérisé l'effet incrétine du 26RFa en utilisant un antagoniste du GPR103 durant différents tests métaboliques. Puis, dans un second temps, nous avons soumis des souris à un régime riche en graisses (*High Fat Diet* – HFD) afin d'évaluer les effets du 26RFa dans les conditions d'obésité associée une hyperglycémie chronique au décours de test métaboliques. De plus, l'effet insulinothrompe du 26RFa a été évalué dans un modèle *in vitro* de cellules β pancréatiques soumises à des conditions de lipotoxicité.


Nous avons tout d'abord montré que l'utilisation d'un antagoniste du GPR103 chez la souris contrôle atténuait significativement l'effet du 26RFa sur la sécrétion d'insuline et la sensibilité à l'insuline. L'injection ip de 26RFa chez la souris HFD n'a pas d'effet sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose ainsi que sur la sensibilité à l'insuline au décours de différents test métaboliques. Cette résistance au 26RFa est notamment associée à une diminution de l'expression du GPR103 dans les organes cibles de l'insuline (muscle, tissu adipeux) ainsi que

sur le pancréas. L'activité insulinothropique du 26RFa est également fortement atténuée dans les cellules β exposée aux conditions de lipotoxicité

Cette étude a permis de confirmer que le 26RFa est fortement impliqué dans la régulation de l'homéostasie du glucose. Il agit comme une incrétine en stimulant la sécrétion d'insuline après une charge orale en glucose. De plus, il augmente la sensibilité à l'insuline. En revanche, ces effets sont drastiquement diminués en condition physiopathologique chez la souris HFD. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que le système 26RFa/GPR103 fait partie intégrante du système gluco-régulateur et que le dysfonctionnement de ce système participe à la diminution de l'effet incrétine global observé au cours du diabète.

RESEARCH ARTICLE

Neuropeptide 26RFa (QRFP) is a key regulator of glucose homeostasis and its activity is markedly altered in obese/hyperglycemic mice

Gaëtan Prévost,^{1,2} Arnaud Arabo,¹ Marie-Anne Le Solliec,¹ Justine Bons,^{1,2} Marie Picot,¹ Julie Maucotel,¹ Hind Berrahmoune,^{1,2} Mouna El Mehdi,¹ Saloua Cherifi,¹ Alexandre Benani,³ Emmanuelle Nédélec,³ Moïse Coëffier,^{4,5} Jérôme Leprince,¹ Anneli Nordqvist,⁶ Valéry Brunel,⁷ Pierre Déchelotte,^{4,5} Hervé Lefebvre,^{1,2} Youssef Anouar,¹ and  Nicolas Chartrel¹

¹Normandie University, UNIROUEN, INSERM U1239, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication (DC2N), Rouen, France; ²Normandie University, UNIROUEN, Rouen University Hospital, Department of Endocrinology, Diabetes and Metabolic Diseases, Rouen, France; ³Center for Taste and Feeding Behaviour, CNRS (UMR6265), INRA (UMR1324), Université de Bourgogne-Franche Comté, Dijon, France; ⁴Normandie University, UNIROUEN, INSERM U1073 Nutrition, Inflammation and dysfunction of gut-brain axis, Rouen, France; ⁵Normandie University, UNIROUEN, Rouen University Hospital, Department of Nutrition, Rouen, France; ⁶Cardiovascular Renal and Metabolism, IMED Biotech Unit, AstraZeneca, Gothenburg, Mölndal, Sweden; and ⁷Normandie University, UNIROUEN, Rouen University Hospital, Department of Biochemistry, Rouen, France

Submitted 12 December 2018; accepted in final form 29 April 2019

Prévost G, Arabo A, Le Solliec MA, Bons J, Picot M, Maucotel J, Berrahmoune H, El Mehdi M, Cherifi S, Benani A, Nédélec E, Coëffier M, Leprince J, Nordqvist A, Brunel V, Déchelotte P, Lefebvre H, Anouar Y, Chartrel N. Neuropeptide 26RFa (QRFP) is a key regulator of glucose homeostasis and its activity is markedly altered in obese/hyperglycemic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 317: E147–E157, 2019. First published May 14, 2019; doi:10.1152/ajpendo.00540.2018.—Recent studies have shown that the hypothalamic neuropeptide 26RFa regulates glucose homeostasis by acting as an incretin and increasing insulin sensitivity. In this study, we further characterized the role of the 26RFa/GPR103 peptidergic system in the global regulation of glucose homeostasis using a 26RFa receptor antagonist and also assessed whether a dysfunction of the 26RFa/GPR103 system occurs in obese hyperglycemic mice. First, we demonstrate that administration of the GPR103 antagonist reduces the global glucose-induced incretin effect and insulin sensitivity whereas, conversely, administration of exogenous 26RFa attenuates glucose-induced hyperglycemia. Using a mouse model of high-fat diet-induced obesity and hyperglycemia, we found a loss of the antihyperglycemic effect and insulinotropic activity of 26RFa, accompanied with a marked reduction of its insulin-sensitive effect. Interestingly, this resistance to 26RFa is associated with a downregulation of the 26RFa receptor in the pancreatic islets, and insulin target tissues. Finally, we observed that the production and release kinetics of 26RFa after an oral glucose challenge is profoundly altered in the high-fat mice. Altogether, the present findings support the view that 26RFa is a key regulator of glucose homeostasis whose activity is markedly altered under obese/hyperglycemic conditions.

diabetes; glucose homeostasis; incretin; obesity; 26RFa

INTRODUCTION

The neuropeptide 26RFa, also referred to as QRFP (for pyroglutamylated RFamide peptide), is the latest member of the RFamide peptide family discovered (5, 9, 16). 26RFa and its N-extended form 43RFa were identified as the cognate ligands of the human orphan G-protein-coupled receptor, GPR103 (6, 9, 16, 30). This peptidergic system is abundantly expressed in the hypothalamus and is involved in the control of feeding behavior (3–5, 30). Indeed, 26RFa (or 43RFa) stimulates food intake (5, 20, 21, 30), and the neuropeptide exerts its orexigenic activity via a modulation of the neuropeptide Y (NPY)/POMC network in the arcuate nucleus (20). These observations have been recently confirmed by data obtained from 26RFa-deficient mice showing that the knockout (KO) mice are lean and hypophagic and that, under a high-fat (HF) diet, the 26RFa KO mice show a lower weight gain than the wild-type animals (22). In line with this, a more sustained orexigenic activity of 26RFa/43RFa has been reported in wild-type mice submitted to an HF diet (21, 27). Moreover, the expression of prepro26RFa mRNA is upregulated in the hypothalamus of genetically obese *ob/ob* and *db/db* mice and rodents submitted to an HF diet (27, 30). Altogether, these findings support the notion that 26RFa could play a role in the development and maintenance of the obese status (7).

Accumulating evidence over the last decade supports the role of neuropeptides controlling feeding behavior, such as neuropeptide Y (NPY), orexins, ghrelin, corticotropin-releasing factor, or apelin, in the peripheral regulation of glucose homeostasis (14, 15, 23, 32, 33). This has led to the new concept that hypothalamic neuropeptides may serve as a link between energy and glucose homeostasis, and therefore, they represent potential therapeutic targets for the treatment of diabetes and obesity (28, 29). In this context, the potential role of 26RFa in the control of glucose homeostasis was investigated. It was found that 26RFa/43RFa and GPR103 are expressed in pancreatic islets, as well as in various insulin-

Address for reprint requests and other correspondence: N. Chartrel, Normandie Univ., UNIROUEN, INSERM U1239, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication (DC2N), 76000 Rouen, France (e-mail: nicolas.chartrel@univ-rouen.fr).

secreting cell lines (11, 26) and that 26RFa and 43RFa prevent cell death and apoptosis of β -cell lines and isolated human pancreatic islets (11). It has been shown that 26RFa is abundantly expressed by the gut and that intraperitoneal administration of the neuropeptide attenuates glucose-induced hyperglycemia by increasing plasma insulin via a direct insulinotropic effect on the pancreatic β cells and also by increasing insulin sensitivity (26). Furthermore, it was reported that an oral glucose challenge induces a massive secretion of 26RFa by the gut into the blood, strongly suggesting that this neuropeptide plays an important role in the regulation of glycemia by acting as an incretin (26).

The incretin effect is known to be markedly reduced in patients with diabetes (18), although most studies have reported that levels of GLP-1 and gastric inhibitory polypeptide (GIP) in response to oral glucose were similar in subjects with and without diabetes (8, 13, 18). This incretin defect is notably characterized by a decreased, albeit partially preserved, insulinotropic potency of GLP-1 and an almost complete loss of insulin secretion to GIP (18). In this context, the objective of the present study was twofold 1): to characterize further the role of 26RFa/GPR103 peptidergic system in the global regulation of glucose homeostasis (via an oral glucose tolerance test) using a 26RFa receptor antagonist (namely 25e) (10) and 2) to determine whether a dysfunction of the 26RFa/GPR103 system occurs in obese/hyperglycemic conditions.

MATERIAL AND METHODS

Animals. Male C57Bl/6 mice (Janvier Laboratory, Le Genest-Saint-Isle, France), weighing 22–25 g, were housed at 5 animals per cage, with free access to standard diet (U.A.R., Villemoisson-sur-Orge, France) and tap water. They were kept in a ventilated room at a temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$ under a 12-h light/12-h dark cycle (light on between 0700 and 1900). All the experiments were carried out between 0900 and 1800 in testing rooms adjacent to the animal rooms. Animal manipulations were performed according to the European Community Council Directive of November 24, 1986 (86:609; EEC) and were conducted by authorized investigators.

HF model. Mice were submitted to a dietary challenge at 2 mo of age by using a standard chow (U8200G10R; energy density: 2,830 kcal/kg; Scientific Animal Food & Engineering (SAFE), Augy, France) or an HF diet (U8978; energy density: 5,283 kcal/kg; SAFE). Experiments were performed after 3 mo of dietary challenge. Our Institutional Animal Use and Care Committee (CENOMAX, Agreement of the Ministry of Research no. 54) approved the experimental procedures (agreement no. 11752).

Peptides and chemicals. Mouse 26RFa (ASGPLGTLAEELSSYS-RRKGGFSFRF-NH₂) was synthesized (0.1-mmol scale) by the solid phase methodology on a Rink amide 4-methylbenzhydrylamine resin (Biochem, Meudon, France) by using a 433A Applied Biosystems peptide synthesizer and the standard fluorenylmethoxycarbonyl procedure. The synthetic peptide was purified by reversed-phase HPLC on a 2.2×25 -cm Vydac 218TP1022 C₁₈ column (Alltech, Templemars, France) by using a linear gradient (10%–50% over 50 min) of acetonitrile/trifluoroacetic acid (99.9:0.1; vol/vol) at a flow rate of 10 ml/min. Analytical HPLC, performed on a Vydac 218TP54 C₁₈ column (0.46×25 cm), showed that the purity of the peptides was greater than 99%. The identity of the synthetic peptide was confirmed by mass spectrometry on a JEOL model AX-500 mass spectrometer. The GPR103 antagonist 25e was synthesized as previously described (10). Insulin and exenatide were purchased from Eli Lilly (Neuilly-sur-Seine, France).

Blood glucose and insulin measurements in mice. For intraperitoneal glucose tolerance test and glucose-stimulated insulin secretion

assay, mice were fasted for 16 h with free access to water and then injected intraperitoneally with glucose (1.5 g/kg) and 26RFa (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) or PBS solution. For measurements of basal glycemia, mice were fed ad libitum and injected intraperitoneally with 26RFa (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) or PBS solution. Blood plasma glucose concentrations were measured from tail vein samplings at various times using an AccuChek Performa glucometer (Roche Diagnostic, Saint-Egreve, France). Plasma insulin concentrations were determined using an AlphaLISA insulin detection kit (ref AL204c, Perkin Elmer, Courtabeuf, France). For insulin tolerance test, mice were fasted for 6 h and injected intraperitoneally with 0.75 units/kg body wt of human insulin (Eli Lilly, Neuilly-sur-Seine, France) and 26RFa (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) or the GPR103 antagonist 25e (5 mg/kg) or PBS. For oral glucose tolerance test, mice were fasted for 16 h before the test with free access to water and injected intraperitoneally with the GPR103 antagonist 25e (5 mg/kg) or PBS 30 min before a 2 g/kg oral glucose load. For the experiments with 26RFa, the peptide (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) was injected (ip) just before the glucose load. Blood plasma glucose and insulin concentrations were measured from tail vein samplings at various times, and plasma samples for 26RFa concentration measurements were obtained from decapitation just before or 30 and 120 min after the glucose challenge and then assayed for 26RFa.

Insulin secretion by the EndoC- β H1 cells. Human β cells (EndoC- β H1), a kind gift from Dr. R. Scharfmann (INSERM U1016, Institut Cochin, Paris, France), were grown in DMEM containing 2.8 mM glucose and supplemented with 2% heat-inactivated fetal bovine serum, 2-mercaptoethanol (50 μM), nicotinamide (10 mM), selenite sodium (6.7 ng/ml), transferrin (5.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), penicillin (100 mg/l) and streptomycin (100 mg/l) in a humidified atmosphere of 5% CO₂-95% air at 37°C. Concurrently, some wells containing the EndoC- β H1 cells were incubated in the same medium containing a solution of palmitate (10 mM, cat. no. P9767-5G, Sigma Aldrich) for 4 days. Before the experiments, the culture medium was removed, and EndoC- β H1 cells (4.3×10^5 cells/well) were preincubated in a Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing 0.2% BSA and 2.8 mM glucose [low glucose (LG)] for 1 h at 37°C (period P1) to evaluate basal insulin secretion. The culture medium was then removed and replaced by the same culture medium (LG) or a culture medium with 16.5 mM of glucose [high glucose (HG)] added or not with 26RFa (10^{-6} M) and the GLP-1 analog exenatide (5×10^{-7} M) for 1 h (period P2). Insulin secreted in the culture medium was measured using a commercial ELISA kit (Mercodia Insulin ELISA, Uppsala, Sweden) and was expressed as the ratio between secretion during the P2 period and secretion during the P1 period.

Immunohistochemical procedure. Deparaffinized sections (15 μm thick) of duodenum and pancreas of control or HF mice were used for immunohistochemistry. Tissue sections were incubated for 1 h at room temperature with rabbit polyclonal antibodies against 26RFa (3) diluted 1:400 or GPR103 (no. NLS1922; Novus Biologicals, Littleton, CO) diluted 1:100. The sections were incubated with a streptavidin-biotin-peroxydase complex (Dako Corporation, Carpinteria, CA), and the enzymatic activity was revealed with diaminobenzidine. Some slices were then counterstained with hematoxylin. Observations were made under a Nikon E 600 light microscope.

Quantitative PCR. Total RNA from the skeletal muscle, adipose tissue, liver, and duodenum of HF and control mice, and from EndoC- β H1 cells was isolated as previously described (25). Relative expression of the 26RFa, GPR103, GLP-1 receptor, GLUT-1, and GLUT-2 genes was quantified by real-time PCR with appropriate primers (Table 1). GAPDH or cyclophilin A were used as internal controls for normalization. PCR was carried out using Gene Expression Master Mix 2X assay (Applied Biosystems, Courtabeuf, France) in an ABI Prism 7900 HT Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems). The purity of the PCR products was assessed by dissociation curves. The amount of target cDNA was calculated by the comparative threshold (Ct) method and expressed by means of the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method.

Table 1. Sequence of the primers used for the qPCR experiments

	Forward Primer	Reverse Primer
Human GPR103	GAAAGGCACCAGGGACTTGT	CCAGACCACCTAGCATTGT
Human GLP-1 rec	TGAGCATAGGCTGGGTGTT	CAGCCGGATAATGAGCCAGT
Human glut-1	TGGCATGAACGCTGTCTTCT	AGCCAATGGTGGCATAACACA
Human glut-2	CTAGTCAGGTGCATGTGCCA	AGGGTCCCAGTGACCTTATCT
Mouse GPR103	GGACGAAGGGCACCATCTT	CGTCACGATGCTCCAGAACAA
Mouse 26RFa	TCTGCGTCCCTACCATCTCA	TCTCAGGACTGTCCCAAAGGAG
Mouse GAPDH	TCCGGACGCACCCTCAT	CGGTTGACCTCCAGGAAATC
Human cyclophilin A	ATGGCACTGGTGGCAAGTCC	TTGCCATTCTGGACCCAAA

26RFa radioimmunoassay. Quantification of 26RFa in plasma and tissue samples was carried out using a specific radioimmunoassay set up in the laboratory that has been previously described in detail (3). For the radioimmunoassay procedure, each plasma sample was diluted (1:1) in a solution of water/trifluoroacetic acid (99.9:0.1; vol/vol). The duodenum fragments were immersed for 15 min in boiling 0.5 M acetic acid, homogenized at 4°C using a glass potter homogenizer, and centrifuged (6,000 g, 4°C, 30 min). Diluted plasma and supernatant fluid of tissue extracts were pumped at a flow rate of 1.5 ml/min through one Sep-Pak C₁₈ cartridge. Bound material was eluted with acetonitrile/water/trifluoroacetic acid (50:49.9:0.1; vol/vol/vol), and acetonitrile was evaporated under reduced pressure. Finally, the dried extracts were resuspended in 0.1 M PBS and assayed for 26RFa.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed with Statistica (5th version). A student *t*-test or ANOVA for repeated measures were used for comparisons between two groups. A post hoc compar-

ison using Tukey honestly significant difference (HSD) was applied according to ANOVA results. Statistical significance was set up at $P < 0.05$.

RESULTS

Consequence of blocking 26RFa action on glucose and insulin tolerance in control mice. Administration of the 26RFa receptor antagonist, 25e, 30 min before an oral glucose tolerance test resulted in a significant increase of the glycemia between 30 and 60 min after the oral glucose challenge (Fig. 1A), as assessed by the calculation of the areas under the curve (Fig. 1A, inset). Plasma insulin concentrations tended to be slightly higher in animals that received the GPR103 antagonist but without reaching the statistical significance (Fig. 1B).

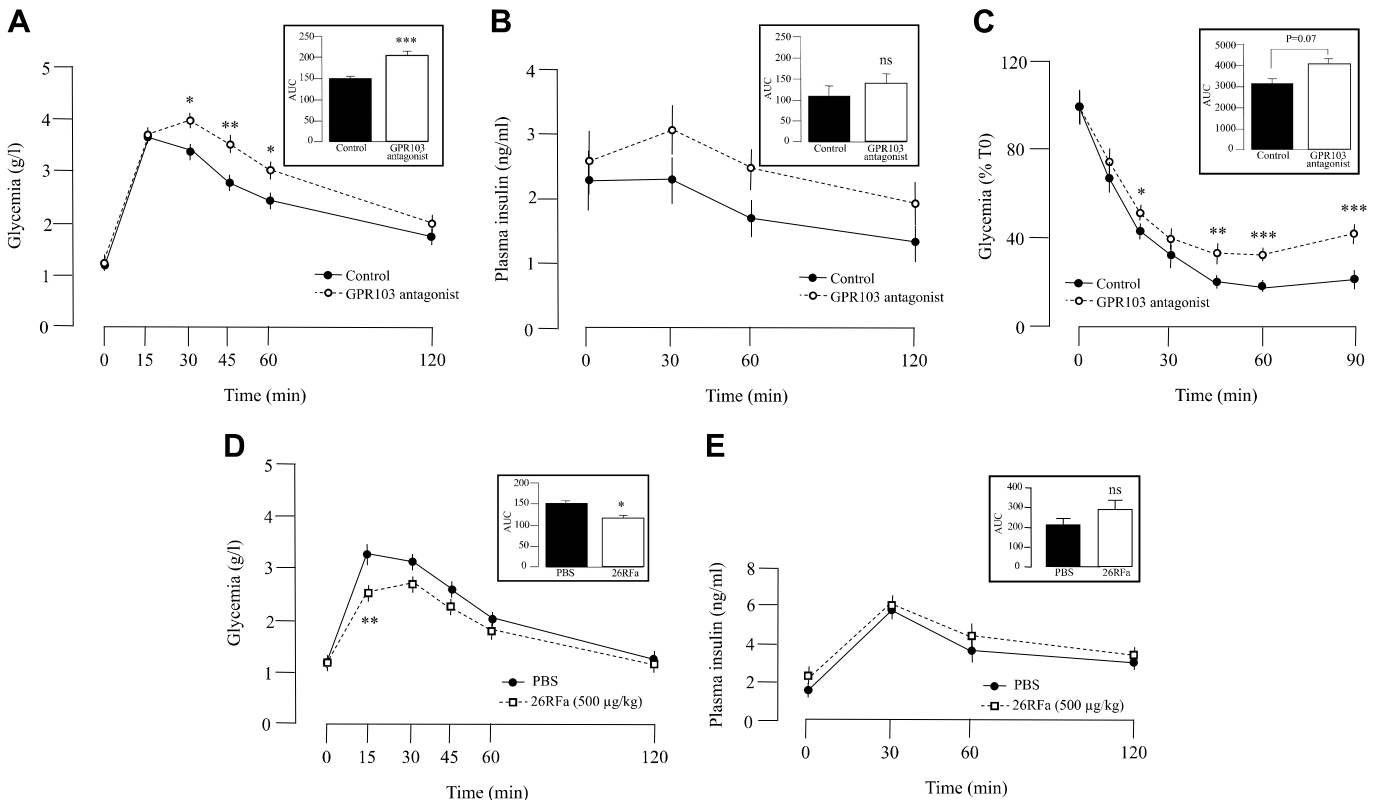


Fig. 1. Consequence of blocking 26RFa action on glucose and insulin tolerance in control mice. Intraperitoneal injection of the GPR103 antagonist 25e at a dose of 5 mg/kg significantly increases the blood glucose level during an oral glucose tolerance test (A, inset). During the same test, plasma insulin concentrations tend to be higher all along the test in animals that received the GPR103 antagonist (B), although statistical analysis does not reveal any significant difference between treated and nontreated animals (B, inset). Administration of 25e during an insulin tolerance test significantly reduces insulin sensitivity from 15 to 90 min after the intraperitoneal injection of insulin (C). Intraperitoneal administration of 26RFa (500 µg/kg) reduces significantly the hyperglycemia induced by a 2-g/kg oral glucose challenge (D) but without affecting plasma insulin levels (E). Calculation of the areas under the curves (insets). Data represent means \pm SE of 3 independent experiments ($n = 10$ –15/group). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs. nontreated animals. ns, Not significant.

Administration of 25e during an insulin tolerance test significantly reduced insulin sensitivity from 15 to 90 min after the intraperitoneal injection of insulin ($P < 0.05$ – $P < 0.001$) (Fig. 1C) as assessed with a statistical difference of the areas under the curve of $P = 0.07$ between 25e-treated mice and animals that did not receive the GPR103 antagonist (Fig. 1C, inset).

Effect of a 26RFa injection on blood glucose and plasma insulin levels following an oral glucose challenge. We completed the experiments using the 26RFa receptor antagonist, by performing oral glucose tolerance tests with administration of exogenous 26RFa. In these experiments, the hyperglycemic effect induced by the glucose challenge was significantly reduced by the intraperitoneal injection of 26RFa (Fig. 1D) but without any significant alteration of plasma insulin levels (Fig. 1E).

Effect of 26RFa on basal glycemia, glucose-induced hyperglycemia, and insulin tolerance. The HF diet challenge induced a significant ($P < 0.001$) weight gain right from the first month of treatment (Fig. 2A). After 3 mo, the HF mice exhibited a weight of 43.00 ± 0.65 g, whereas mice fed a standard chow weighted 27.00 ± 0.85 g (Fig. 2A). Similarly, plasma glucose was significantly increased ($P < 0.01$) after 1 mo of HF diet (Fig. 2B). After 3 mo, the HF mice exhibited a fasting glycemia of 2.11 ± 0.06 g/l, whereas that of the mice fed a standard chow at the same time was 1.16 ± 0.05 g/l ($P < 0.001$; Fig. 2B).

The impact of 26RFa was investigated on basal glycemia in mice fed a standard chow and in HF mice. As illustrated in Fig. 2, C and D, intraperitoneal administration of 26RFa did not affect significantly basal plasma glucose levels during the 90-min period of the test in the two diet conditions. By

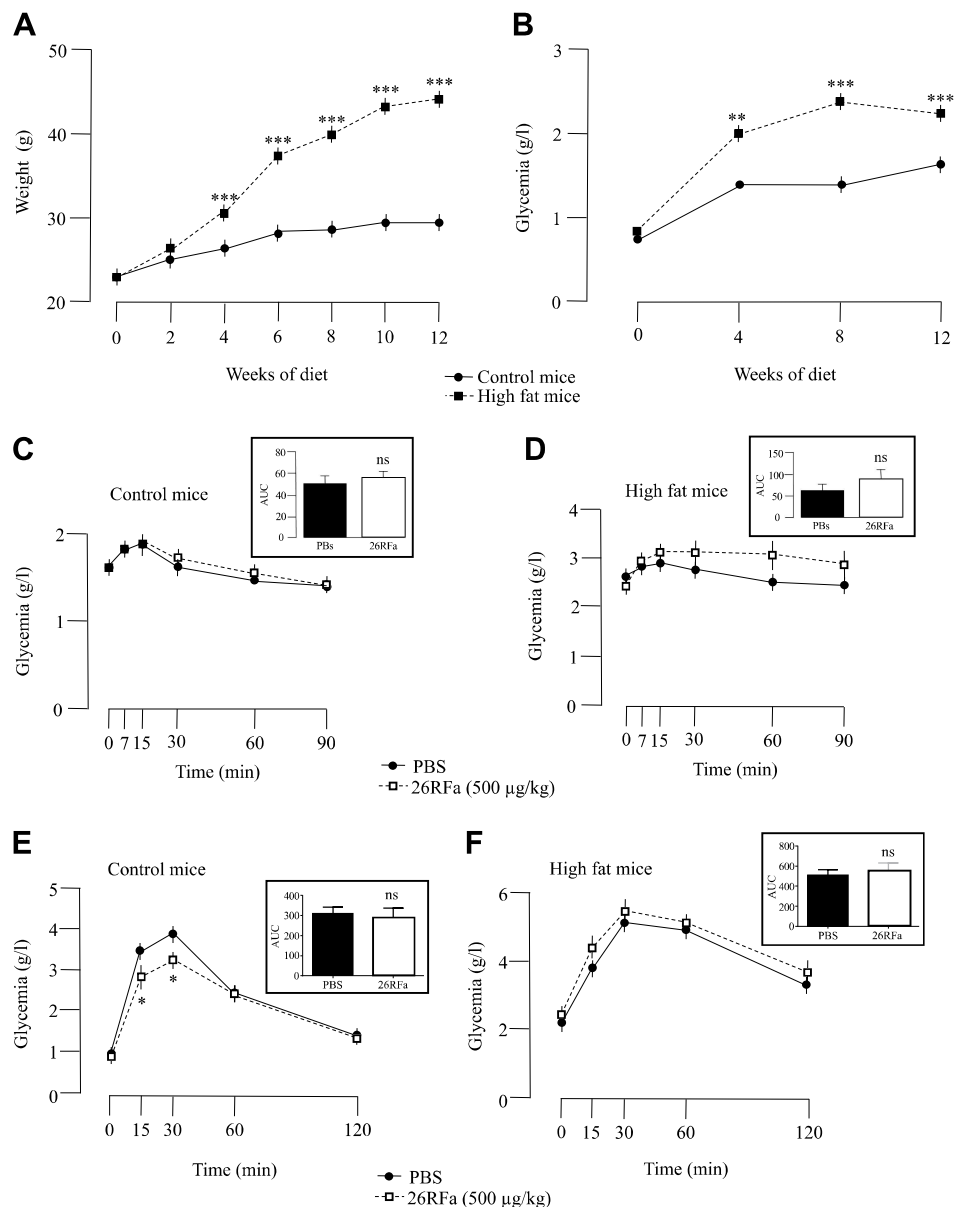


Fig. 2. Effect of 26RFa on basal glycemia and glucose-induced hyperglycemia. A 3-mo high-fat (HF) diet induces a highly significant weight gain (A) and increase of glycemia (B) right from the first month of treatment as compared with mice fed a standard chow. Effect of intraperitoneal administration of 26RFa (500 µg/kg) on basal plasma glucose levels. 26RFa does not alter basal plasma glucose during the 90 min following its injection neither in mice fed a standard chow (C) nor in HF mice (D). Effect of intraperitoneal administration of 26RFa (500 µg/kg) during a glucose tolerance test. 26RFa significantly attenuates the hyperglycemia induced by the intraperitoneal injection of glucose (1.5 g/kg) throughout the duration of the test in mice fed a standard chow (E). In HF mice, the antihyperglycemic effect of 26RFa during the glucose tolerance test is totally abolished (F). Calculation of the areas under the curves reveal no significant difference between the PBS and the 26RFa groups whatever the type of diet given (insets). Data represent means \pm SE of 5 independent experiments ($n = 20$ /group). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs. mice fed a standard chow. ns, Not significant.

contrast, an intraperitoneal glucose tolerance test performed in the two groups of mice revealed that 26RFa significantly attenuated ($P < 0.05$) the hyperglycemia induced by an intraperitoneal glucose challenge in mice fed a standard chow during the first 30 min of test, whereas this antihyperglycemic effect of the neuropeptide was totally abolished in HF mice (Fig. 2, *E* and *F*). Intraperitoneal injection of 26RFa also significantly potentiated ($P < 0.05$) insulin-induced hypoglycemia during the 90 min following the insulin challenge in mice fed a standard chow as illustrated by the quantification of the areas under the curves (Fig. 3, *A* and *C*). By contrast, the beneficial effect of 26RFa on insulin sensitivity was strongly attenuated in HF mice (Fig. 3, *B* and *C*). Quantification of GPR103 mRNA in insulin target tissues revealed a significant decrease ($P < 0.05$) in the expression of the 26RFa receptor in the muscle and the adipose tissue of HF mice (Fig. 3*D*). No expression of GPR103 was detected in the liver of the two groups of animals (Fig. 3*D*).

Consequence of blocking 26RFa action on glucose and insulin tolerance in HF mice. Administration of the GPR103 antagonist 25e during an oral glucose tolerance test in HF mice had no significant effect on plasma glucose and insulin levels (Fig. 4, *A* and *B*) in contrast to what was observed in mice fed a standard chow (Fig. 1, *A* and *B*). Intraperitoneal injection of 25e had no significant impact on insulin sensitivity during an insulin tolerance test in HF mice (Fig. 4*C*) in contrast to the insulin-resistant effect of the GPR103 antagonist observed in mice fed a standard chow (Fig. 1*C*). In addition, administration of 26RFa had no effect on the

hyperglycemia induced by the oral glucose load (Fig. 4*D*) or on plasma insulin levels (Fig. 4*E*).

Effect of 26RFa on insulin production. The effect of 26RFa on insulin production was investigated in vivo and in vitro. An acute glucose-stimulated insulin secretion test showed that injection of 26RFa significantly stimulated glucose-induced insulin production in mice fed a standard chow ($P < 0.05$; Fig. 5*A*), whereas this insulinotropic effect of the neuropeptide was totally abolished in HF mice (Fig. 5*B*). Concurrently, the impact of 26RFa on insulin secretion by pancreatic β cells was examined using the human insulin-secreting cell line, EndoC- β H1, that were treated with palmitate to mimic conditions of lipotoxicity. As illustrated in Fig. 5*C*, addition of 26RFa in the culture medium significantly stimulated insulin secretion by untreated EndoC- β H1 cells incubated in LG ($P < 0.05$) or HG ($P < 0.01$) conditions. The GLP-1 analog, exenatide, used as a positive control, also significantly stimulated insulin secretion ($P < 0.01$) by the untreated EndoC- β H1 cells (Fig. 5*C*). Conversely, when the cells were treated for 96 h with palmitate, the insulinotropic effect of 26RFa was totally abolished whatever the glucose concentration in the culture medium (Fig. 5*D*). By contrast, exenatide still significantly stimulated insulin secretion by palmitate-treated cells ($P < 0.01$, Fig. 5*D*). Comparison of insulin secretion between naive and palmitate-treated EndoC- β H1 cells revealed that in non-stimulated conditions, basal insulin release was not affected in palmitate-treated cells (Fig. 5*E*). By contrast, under stimulatory conditions (26RFa or exenatide), insulin secretion was dramatically altered in palmitate-treated cells compared

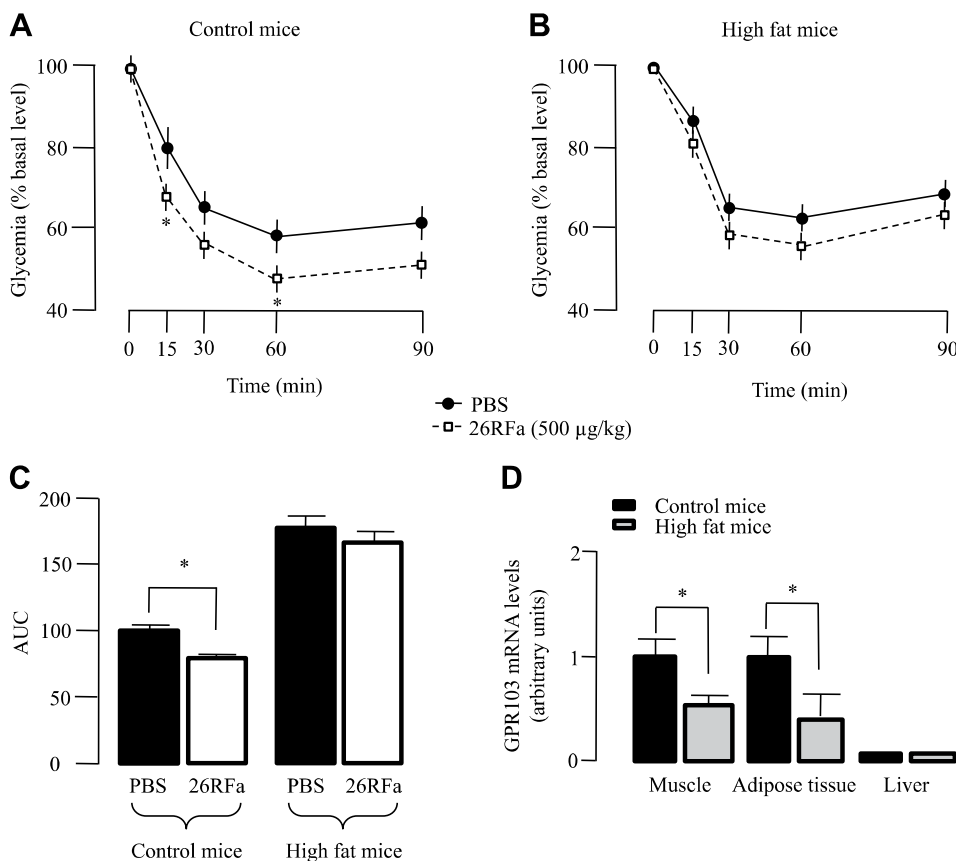


Fig. 3. Effect of 26RFa on insulin tolerance. Intraperitoneal administration of 26RFa (500 μ g/kg) during an insulin tolerance test significantly potentiates insulin-induced hypoglycemia during the 90 min following the insulin load (0.75 units/kg) in mice fed a standard chow (A) as illustrated by the quantification of the areas under the curves (C), whereas in HF mice, the beneficial effect of 26RFa on insulin sensitivity is strongly attenuated (B and C). Data represent means \pm SE of 5 independent experiments ($n = 20$ /group). Expression of GPR103 mRNA was determined by quantitative polymerase chain reaction and adjusted to the signal intensity of GAPDH in the muscle, the adipose tissue and the liver (D). GPR103 mRNA levels are significantly lowered in the muscle and adipose tissue of HF mice as compared with those measured in mice fed a standard chow. No expression of GPR103 is detected in the liver of control or HF mice. Data represent means \pm SE of 3 independent experiments ($n = 6-9$ /group). * $P < 0.05$ vs. mice fed a standard chow. HF, high fat.

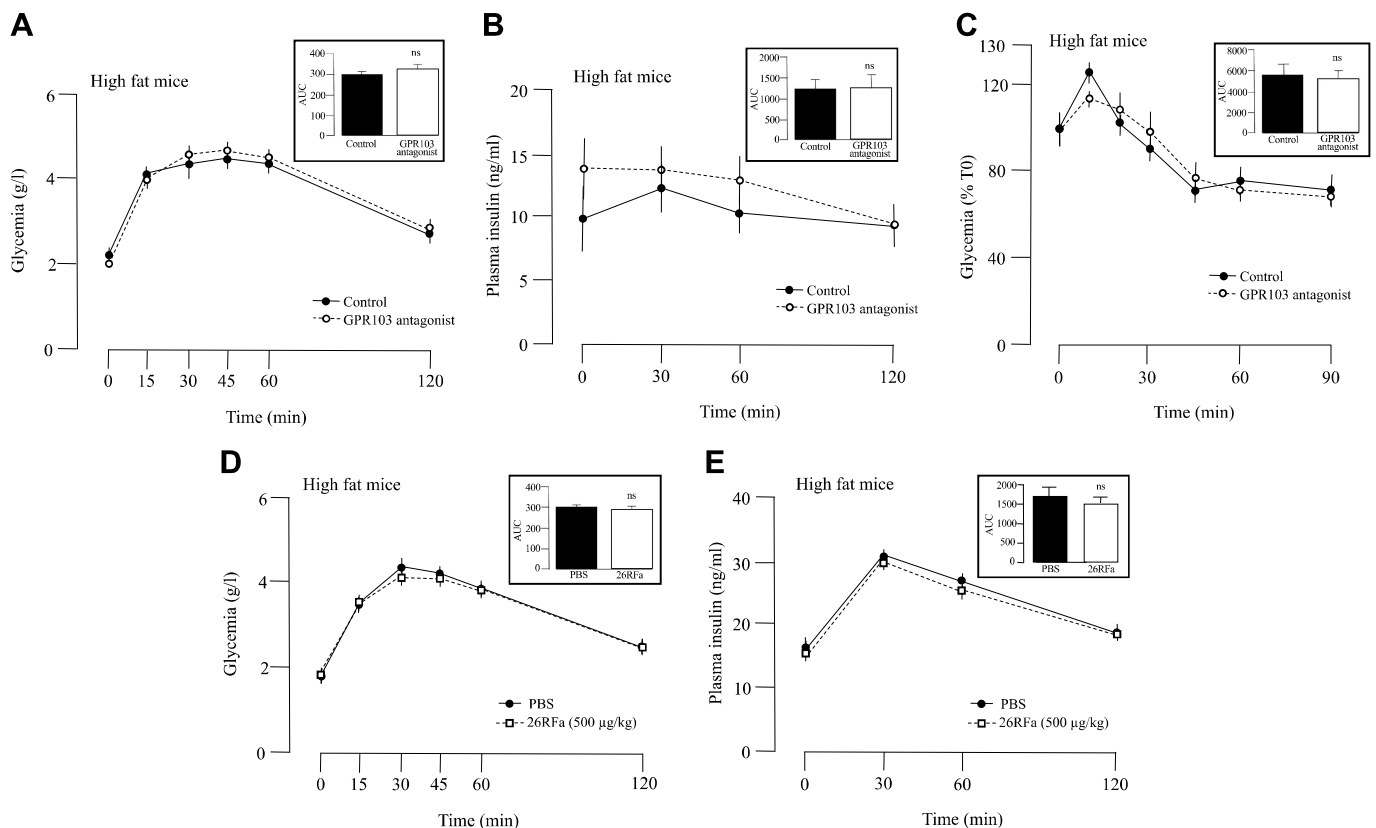


Fig. 4. Consequence of blocking 26RFa action on glucose and insulin tolerance in HF mice. Administration of the GPR103 antagonist 25e (5 mg/kg) during an oral glucose tolerance test in HF mice has no significant effect on plasma glucose (A) and insulin levels (C), as assessed by the calculation of the areas under the curves (insets). Similarly, intraperitoneal injection of 25e does not alter insulin sensitivity during an insulin tolerance test in HF mice (C). Intraperitoneal administration of 26RFa (500 µg/kg) has no significant effect on the hyperglycemia induced by an oral glucose challenge in HF mice (2 g/kg) (D), nor on plasma insulin levels (E). Calculation of the areas under the curves (insets). Data represent means \pm SE of 3 independent experiments ($n = 10-12$ /group). HF, high fat.

with native cells (Fig. 5E). Finally, expression of GLUT-1, GLUT-2, the GLP-1 receptor, and GPR103 was evaluated in native and palmitate-treated EndoC- β H1 cells (Fig. 5F). GLUT-1 and the GLP-1 receptor mRNA levels were not altered by the lipotoxic treatment of the cells (Fig. 5F). By contrast, expression of GLUT-2 was significantly decreased ($P < 0.05$) in palmitate-treated cells and that of GPR103 was also lowered ($P = 0.06$; Fig. 5F). Consistent with this latter observation, immunohistochemical observation of pancreas of mice fed a standard chow and HF mice revealed a decrease in the intensity of the GPR103 labeling in the pancreatic islets of HF mice (Fig. 5, G and H).

Effect of the HF diet on gut 26RFa production. We first investigated the expression and distribution of 26RFa in the duodenum of HF mice and mice fed a standard chow using a quantitative PCR approach combined with immunohistochemistry (Fig. 6, A and B). The expression of 26RFa was significantly lowered ($P < 0.01$) in the duodenum of HF mice as compared with mice fed a standard chow (Fig. 6A). In agreement with this finding, the immunohistochemistry revealed an important decrease in the number of enterocytes immunostained with the 26RFa antibody in the duodenum of HF mice (Fig. 6B).

The impact of a 2 g/kg oral glucose load on plasma glucose, insulin, and 26RFa and on 26RFa content in the duodenum was investigated in HF mice and mice fed a

standard chow (Fig. 6, C–G). In mice fed a standard chow, the oral glucose challenge induced an important increase of the glycemia at 30 min, followed by a decrease at 120 min (Fig. 6C). The HF mice exhibited a similar glycaemic profile although plasma glucose levels were significantly higher all along the test ($P < 0.05-0.01$; Fig. 6C). Measurement of plasma insulin during the oral glucose tolerance test indicated that insulinemia was always higher in HF mice compared with mice fed a standard chow, as assessed by the point-by-point statistical analysis ($P < 0.05-0.001$) and the measurement of the area under the curve ($P < 0.01$) (Fig. 6D). Plasma 26RFa profile in mice fed a standard chow was very similar to that observed for glycemia and insulinemia, with an increase of plasma 26RFa levels observed at 30 min followed by a decrease at 120 min (Fig. 6E). In HF mice, plasma 26RFa concentration was similar to that of mice fed a standard chow during the first 30 min of the test, but the obese/hyperglycemic mice exhibited a dramatic rise in plasma 26RFa levels at 120 min ($P < 0.05$) that was not observed in mice fed a standard chow (Fig. 6E), as underlined by the significant difference of the areas under the curves (Fig. 6F). Quantification of 26RFa content in the duodenum showed a significant decrease ($P < 0.01$) of the neuropeptide production in HF mice under basal condition (at time zero) (Fig. 6G). During the oral glucose tolerance test, 26RFa content in the duodenum exhibited a profile closely

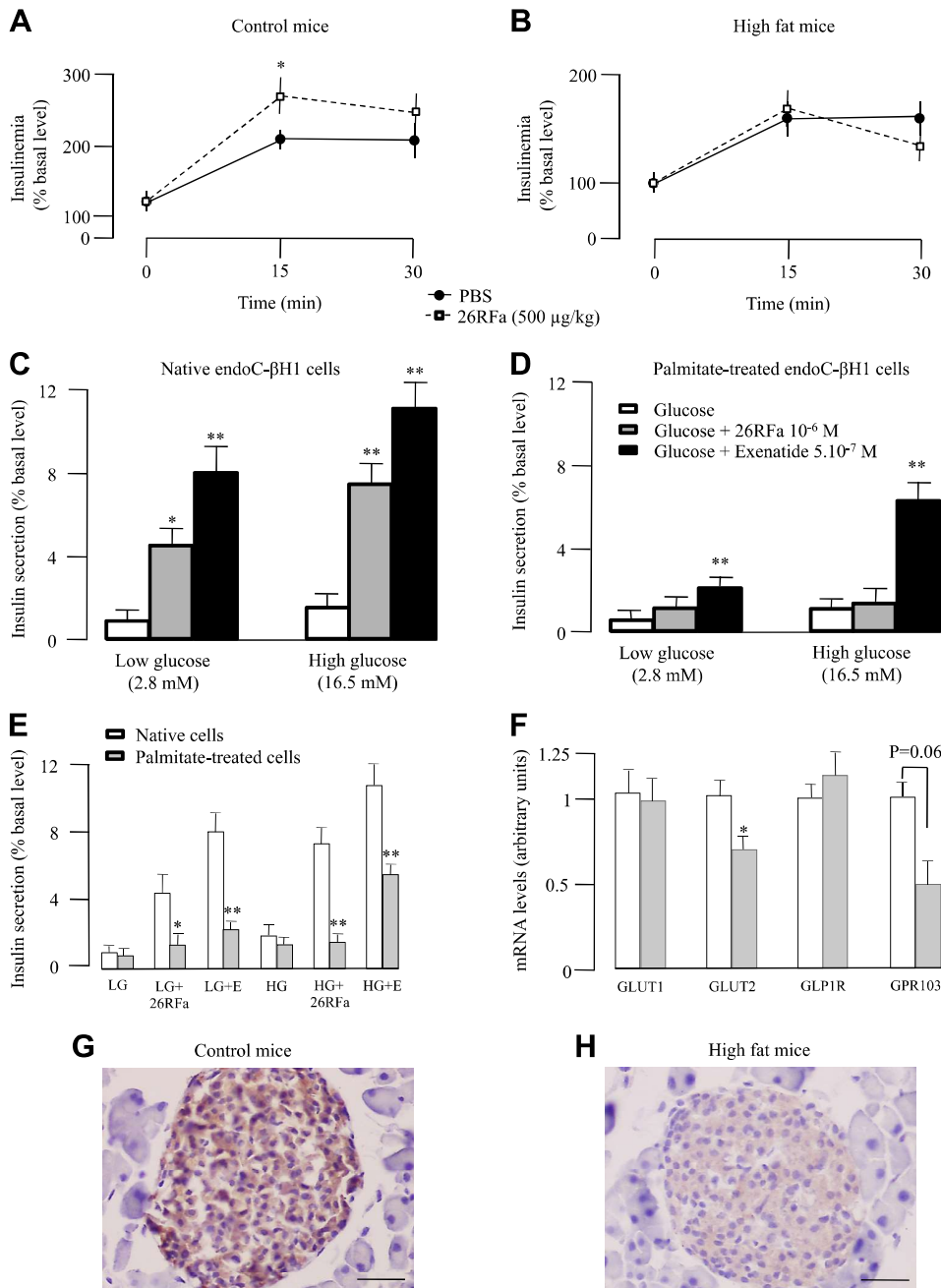


Fig. 5. Effect of 26RFa on insulin production. 26RFa (500 µg/kg) stimulates significantly glucose-induced insulin production during an acute glucose (1.5 g/kg)-stimulated insulin secretion test in mice fed a standard chow (A), whereas injection of the neuropeptide has no effect on plasma insulin in HF mice (B). Data represent means \pm SE of 5 independent experiments ($n = 20$ /group). Effect of 26RFa (10^{-6} M) on insulin secretion by the human pancreatic β -cell line EndoC- β H1 nontreated or treated by palmitate for 96 h. 26RFa significantly stimulates insulin secretion in untreated EndoC- β H1 cells incubated in a low-glucose (LG) or a high-glucose (HG) medium (C). Conversely, when the cells are treated with palmitate, the insulinotropic effect of 26RFa is abolished whatever the glucose concentration in the culture medium (D). Data represent means \pm SE of 4 independent experiments ($n = 10$ /condition). Comparison of insulin secretion between native and palmitate-treated EndoC- β H1 cells (E). In nonstimulatory conditions, insulin release is not affected in palmitate-treated cells compared with native cells. By contrast, under stimulatory conditions (26RFa or exenatide), the secreting response of the cells is significantly altered by the palmitate treatment. Data represent means \pm SE of 4 independent experiments ($n = 10$ /condition). Expression of the glucose transporters GLUT-1 and GLUT-2, the GLP-1 receptor (GLP1R) and GPR103 mRNA was determined in native EndoC- β H1 cells and in palmitate-treated EndoC- β H1 cells by quantitative polymerase chain reaction and adjusted to the signal intensity of cyclophilin A (F). GLUT-1 and the GLP1R mRNA levels are not altered by the lipotoxic treatment of the cells whereas the expression of GLUT-2 and GPR103 is decreased in palmitate-treated cells. Data represent means \pm SE of 3 independent experiments ($n = 6-9$ /group). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Immunohistochemical labeling of pancreatic islets of control and HF mice with GPR103 antibodies. Representative photomicrographs of pancreatic islets showing a robust decrease in the intensity of the GPR103 labeling in the pancreatic islets of HF mice (H) as compared with the pancreatic islets of mice fed a standard chow (G). Scale bars: 50 µm. HF, high fat.

related to that of plasma 26RFa in the two groups of mice with, in particular, a highly significant rise of duodenal 26RFa production ($P < 0.001$) 120 min after the oral glucose challenge in HF mice (Fig. 6G).

DISCUSSION

In the first part of the present study, we took advantage of the first disclosed GPR103 antagonist (10) that can be used as an *in vivo* tool to decipher the role of 26RFa in glucose homeostasis. We have previously demonstrated that 26RFa could be considered as a novel incretin (26). This conclusion was based on experiments carried out by our team showing that 26RFa is secreted by the gut in response to an oral glucose load and that the neuropeptide stimulates insulin

secretion from pancreatic β cells, leading to an antihyperglycemic effect (26). However, without a specific antagonist molecule, it is difficult to isolate the proper role of 26RFa on the glycemic status from the well-known effects of the other incretins such as GLP-1 and GIP during an oral glucose challenge, which is recognized as the gold standard test to assess the effects of incretin hormones. Here, we further characterized the role of 26RFa in the global regulation of glucose homeostasis using a GPR103 antagonist with Dystrophin Myotonia Protein Kinase properties suitable for *in vivo* experiments, namely 25e (10). In our set of experiments, administration of 25e induced a robust hyperglycemic effect during an oral glucose load in mice fed a standard chow. We also found that administration of the 26RFa

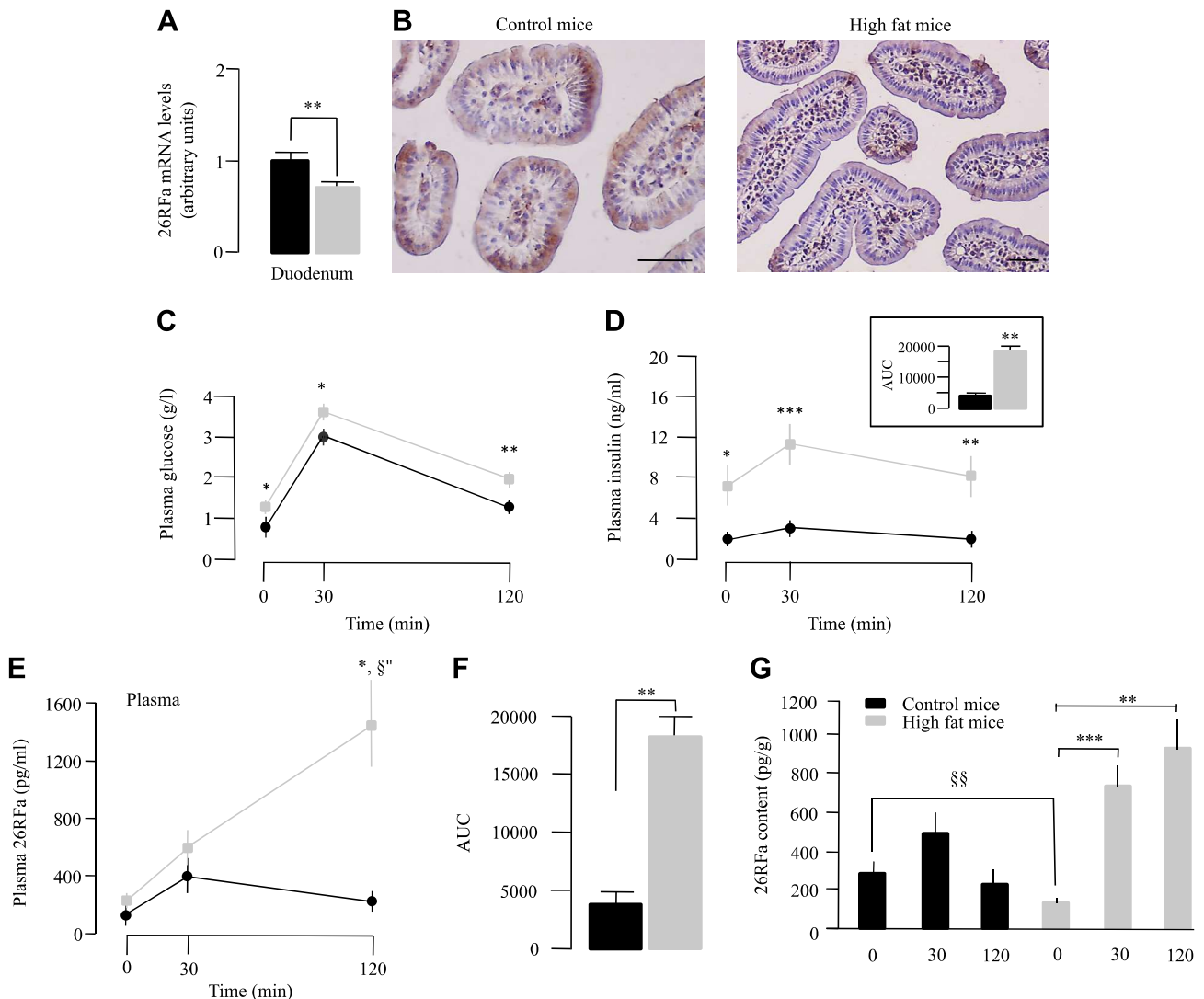


Fig. 6. Effect of the high-fat diet on gut 26RFa production. Expression and distribution of 26RFa in the duodenum of control and HF mice. Expression of 26RFa mRNA in the duodenum was determined by quantitative polymerase chain reaction and adjusted to the signal intensity of GAPDH, and its distribution was determined by immunohistochemistry. The expression of 26RFa is significantly lower in the duodenum of HF mice compared with mice fed a standard chow (A). In agreement with this finding, the immunohistochemistry reveals an important decrease in the number of enterocytes immunostained with the 26RFa antibody in the duodenum of HF mice in comparison to duodenal slices of mice fed a standard chow (B). Scale bars: 50 μ m. Impact of a 2-g oral glucose load on plasma glucose, insulin and 26RFa, and on 26RFa content in the duodenum of HF mice and mice fed a standard chow. During an oral glucose challenge, the HF mice exhibit a similar glycemic profile to that of mice fed a standard chow, although their plasma glucose levels are significantly higher all along the test (C). Measurement of plasma insulin during the same test reveals that insulinemia is always higher in HF mice as compared with mice fed a standard chow, as assessed by the point by point statistical analysis and the calculation of the areas under the curves (D). In HF mice, plasma 26RFa concentration is similar to that of mice fed a standard chow during the first 30 min of the test, but the obese/diabetic mice exhibit a dramatic rise in plasma 26RFa levels at 120 min that is not observed in mice fed a standard chow (E), as underlined by the significant difference of the areas under the curves (F). Quantification of 26RFa concentration in the duodenum reveals lower duodenal 26RFa content in HF mice under basal condition (G). During the oral glucose tolerance test, 26RFa content in the duodenum exhibits a profile closely related to that of plasma 26RFa in mice fed a standard chow as well as in HF mice with, in particular, a significant rise of duodenal 26RFa production 30 and 120 min after the oral glucose challenge in obese/diabetic animals (G). Data represent means \pm SE of 5 independent experiments ($n = 18$ – 20 /group). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs. mice fed a standard chow. § $P < 0.05$; §§ $P < 0.01$ vs. T0 min. AUC, area under the curve; HF, high fat.

receptor antagonist significantly reduces insulin sensitivity, confirming that one mechanism of action of the 26RFa/GPR103 system to control glucose homeostasis is to increase insulin sensitivity in addition to its incretin activity (26). There was a tendency for 25e to increase plasma insulin levels during a glucose challenge. We hypothesize that this may reflect the occurrence of a compensatory mechanism to counteract the insulin-resistant effect of the

GPR103 antagonist. However, this increase of insulin secretion is not sufficient to maintain normoglycemia, suggesting that blockade of 26RFa action also alters the insulin-secreting capacity of the pancreatic islets. Conversely, we show that exogenous administration of 26RFa during an oral glucose load significantly reduces the hyperglycemia without any significant alteration of the plasma insulin levels. In this experiment, it is important to note that, in fact, we have

analyzed the effects of both exogenous and endogenous 26RFa. Thus, it seems that exogenous administration of 26RFa could potentiate the antihyperglycemic effect already induced by endogenous 26RFa production. We may speculate that the decrease of the glycemia induced by exogenous 26RFa is rather linked to an alteration of the insulin sensitivity than insulin secretion because no modification of plasma insulin levels was observed. Together, these findings confirm our previous data (26) and support the view that the 26RFa/GPR103 system plays a crucial role to sustain normoglycemia in stimulatory conditions.

The second objective of the present study was to investigate whether an obese/chronic hyperglycemic status is associated with a dysfunction of the 26RFa/GPR103 system. For this purpose, we submitted mice to an HF diet for a period of 3 mo. Measurement of weight and glycemia revealed that the HF mice were actually obese and intolerant to glucose. 26RFa did not affect basal plasma glucose levels either in the HF mice or in control animals. This observation is consistent with the incretin status of the neuropeptide previously reported (26). By contrast, we found that the antihyperglycemic effect of 26RFa observed during a glucose tolerance test in control mice was lost in HF mice. We previously showed that the antihyperglycemic effect of 26RFa was the result of both increased insulin sensitivity in target tissues and a direct stimulation of insulin production by the pancreatic β cells (26). Here, we show that during an insulin tolerance test, the beneficial effect of 26RFa on insulin sensitivity is significantly attenuated. This was probably because the expression of GPR103 mRNA was downregulated in muscle and adipose tissues of HF mice compared with controls.

In the *in vivo* experiments, we found that the stimulatory effect of 26RFa on insulin production was totally lost in the HF mice. We have previously shown that 26RFa exerts a direct insulinotropic effect on pancreatic β cells via activation of GPR103 (26). In this study, we used a human β pancreatic cell line that expresses GPR103 (i.e., EndoC- β H1 cells) to explore further the direct effects of 26RFa on insulin secretion. We show that 26RFa robustly stimulates insulin release by these cells. Treatment of the EndoC- β H1 cells with palmitate, which mimics conditions of lipotoxicity observed in diabetes, totally abolished the insulinotropic effect of 26RFa. By contrast, the GLP-1 analog, exenatide, was still able to stimulate insulin release (albeit with a reduced potency) under the same lipotoxic conditions. This latter observation is in agreement with previous studies showing a reduction of GLP-1-induced insulin secretion under conditions of lipo- and glucotoxicity induced by an HF diet (12). Finally, we show that the expression of the 26RFa receptor is lowered in the EndoC- β H1 cells cultured in lipotoxic conditions as well as in the pancreatic islets of HF mice, suggesting that this decreased expression of GPR103 in β cells is responsible, at least in part, for the loss of the insulinotropic effect of 26RFa in obese/hyperglycemic conditions. In accordance with these findings, a loss of GIP insulinotropic effect has also been reported in type 2 diabetes (13, 19), and downregulation of the GIP receptor has been proposed as one of the mechanisms underlying the lack of GIP activity in patients with type 2 diabetes (1, 17, 24). Similarly, a downregulation of the GLP-1 receptor has been described in pancreatic β cells under diabetic conditions that may underlie the reduced incretin effect of GLP-1 in diabetes (17). However,

some studies suggest that the loss or altered incretin effect in type 2 diabetes is a consequence of the diabetic state and not a primary event and that the incretin defect is mainly a consequence of general β -cell dysfunction (8, 13, 17, 18). Together, these observations support the idea that the altered insulinotropic activity of the incretins in diabetes is probably the result of a downregulation of their receptor expression in β -cells associated with a dysfunction of insulin synthesis and production.

We have previously found that the enterocytes of the duodenum are the main source of peripheral 26RFa and that its release to the general circulation is increased after an oral glucose challenge (26). Here, we show that after an overnight fasting, the expression and production of 26RFa in the duodenum is significantly decreased in HF mice. This finding, together with the low expression of the 26RFa receptor in insulin target tissues in HF mice, suggests that the 26RFa/GPR103 peptidergic system is markedly altered under obese/chronic hyperglycemic conditions. However, we concurrently show that under stimulatory conditions (an oral glucose load), the duodenum of HF mice keeps its ability to produce and secrete large amounts of 26RFa in the general circulation and is even overstimulated as compared with control mice. Indeed, in HF mice, plasma 26RFa levels still increase 2 h after the oral glucose load whereas in mice fed a standard chow, they return to basal values as previously reported (26). Interestingly, this plasma 26RFa profile during the oral glucose tolerance test in HF animals follows that of duodenal 26RFa production suggesting that the duodenum is the main source of circulating 26RFa. In addition, these high plasma 26RFa levels 2 h after glucose ingestion might reflect the occurrence of a mechanism of action involving 26RFa production by the gut, aiming at decreasing glycemia. In this context, it would be interesting to investigate whether insulin, whose plasma levels also remain high 2 h after the oral glucose challenge in HF mice, could regulate 26RFa production by the gut as the hormone has already been reported to be able to regulate glucose intestinal absorption, in addition to its peripheral effects (31). It is noteworthy that this discrepancy in the plasma 26RFa profile during an oral glucose tolerance test between normal and chronic hyperglycemic conditions is not found for GLP-1 and GIP (2) and thus seems to be a specificity of 26RFa that deserves further investigation.

Finally, we show that administration of the 26RFa receptor antagonist 25e or 26RFa in obese/hyperglycemic mice has no effect on the glycemic response during an oral glucose tolerance test or an insulin tolerance test, nor an insulin secretion during an acute glucose-stimulation insulin secretion test. This observation is in agreement with the blunted 26RFa response we have observed in HF mice and can be linked to the decreased expression of GPR103 in insulin target tissues and in β pancreatic cells of the HF mice.

In conclusion, we have confirmed, using a 26RFa receptor antagonist, that the neuropeptide 26RFa is a key regulator of glucose homeostasis by acting as an incretin and improving insulin tolerance. Our data also reveal a loss of the incretin and insulin-sensitive effect of 26RFa in obese/chronic hyperglycemic conditions that is associated with a downregulation of its receptor. Together, these observations strongly suggest that dysfunctions of the 26RFa/GPR103 system participate in the general reduced incretin effect and insulin intolerance observed in diabetes.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to Dr. R. Scharfmann (INSERM U1016, Cochin Institute, Paris, France) for the kind gift of the human pancreatic β -cell line, EndoC- β H1.

GRANTS

This work was funded by INSERM (U1239), the University of Rouen, the Institute for Research and Innovation in Biomedicine, the Fondation pour la Recherche Médicale (grant no. DEA 20140629966), the Société Francophone du Diabète (grant no. R16038EE), and the Plateforme Régionale de Recherche en Imagerie Cellulaire de Normandie.

The present study was also cofunded by European Union and Normandie Regional Council. Europe gets involved in Normandie with the European Regional Development Fund.

DISCLOSURES

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

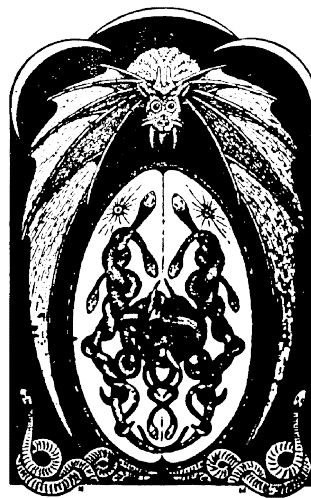
AUTHOR CONTRIBUTIONS

G.P. and N.C. conceived and designed research; A.A., M.-A.L.S., J.B., M.P., J.M., H.B., M.E.M., S.C., A.B., E.N., M.C., J.L., A.N., and V.B. performed experiments; G.P., A.A., M.-A.L.S., J.B., M.P., M.E.M., A.B., M.C., and J.L. analyzed data; G.P., J.B., M.P., and M.C. interpreted results of experiments; G.P., M.-A.L.S., and N.C. prepared figures; G.P. and N.C. drafted manuscript; G.P., Y.A., and N.C. edited and revised manuscript; P.D., H.L., Y.A., and N.C. approved final version of manuscript.

REFERENCES

- Ahrén B. Incretin dysfunction in type 2 diabetes: clinical impact and future perspectives. *Diabetes Metab* 39: 195–201, 2013. doi:10.1016/j.diabet.2013.03.001.
- Bagger JI, Knop FK, Lund A, Vestergaard H, Holst JJ, Vilsbøll T. Impaired regulation of the incretin effect in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 96: 737–745, 2011. doi:10.1210/jc.2010-2435.
- Bruzzone F, Lectez B, Tollemer J, Leprince J, Dujardin C, Rachidi W, Chatenet D, Baroncini M, Beauvillain JC, Vallarino M, Vaudry H, Chartrel N. Anatomical distribution and biochemical characterization of the novel RFamide peptide 26RFa in the human hypothalamus and spinal cord. *J Neurochem* 99: 616–627, 2006. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04090.x.
- Bruzzone F, Lectez B, Alexandre D, Jégou S, Mounien L, Tollemer H, Chatenet D, Leprince J, Vallarino M, Vaudry H, Chartrel N. Distribution of 26RFa binding sites and GPR103 mRNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 503: 573–591, 2007. doi:10.1002/cne.21400.
- Chartrel N, Dujardin C, Anouar Y, Leprince J, Decker A, Clerens S, Do-Régo JC, Vandesande F, Llorens-Cortes C, Costentin J, Beauvillain JC, Vaudry H. Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 15247–15252, 2003. doi:10.1073/pnas.2434676100.
- Chartrel N, Alonzeau J, Alexandre D, Jeandel L, Alvear-Perez R, Leprince J, Boutin J, Vaudry H, Anouar Y, Llorens-Cortes C. The RFamide neuropeptide 26RFa and its role in the control of neuroendocrine functions. *Front Neuroendocrinol* 32: 387–397, 2011. doi:10.1016/j.yfrne.2011.04.001.
- Chartrel N, Picot M, El Medhi M, Arabo A, Berrahmoune H, Alexandre D, Maucotel J, Anouar Y, Prévost G. The neuropeptide 26RFa (QRFP) and its role in the regulation of energy homeostasis: a mini-review. *Front Neurosci* 10: 549, 2016. doi:10.3389/fnins.2016.00549.
- Chon S, Gautier JF. An update on the effect of incretin-based therapies on β -cell function and mass. *Diabetes Metab J* 40: 99–114, 2016. doi:10.4093/dmj.2016.40.2.99.
- Fukusumi S, Yoshida H, Fujii R, Maruyama M, Komatsu H, Habata Y, Shintani Y, Hinuma S, Fujino M. A new peptidic ligand and its receptor regulating adrenal function in rats. *J Biol Chem* 278: 46387–46395, 2003. doi:10.1074/jbc.M305270200.
- Georgsson J, Bergström F, Nordqvist A, Watson MJ, Blundell CD, Johansson MJ, Petersson AU, Yuan ZQ, Zhou Y, Kristensson L, Kakol-Palm D, Tyrchan C, Wellner E, Bauer U, Brodin P, Svensson Henriksson A. GPR103 antagonists demonstrating anorexigenic activity in vivo: design and development of pyrrolo[2,3-c]pyridines that mimic the C-terminal Arg-Phe motif of QRFP26. *J Med Chem* 57: 5935–5948, 2014. doi:10.1021/jm401951t.
- Granata R, Settanni F, Trovato L, Gallo D, Gesmundo I, Nano R, Gallo MP, Bergandi L, Volante M, Alloati G, Piemonti L, Leprince J, Papotti M, Vaudry H, Ong H, Ghigo E. RFamide peptides 43RFa and 26RFa both promote survival of pancreatic β -cells and human pancreatic islets but exert opposite effects on insulin secretion. *Diabetes* 63: 2380–2393, 2014. doi:10.2337/db13-1522.
- Hansen KB, Vilsbøll T, Bagger JI, Holst JJ, Knop FK. Impaired incretin-induced amplification of insulin secretion after glucose homeostatic dysregulation in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 97: 1363–1370, 2012. doi:10.1210/jc.2011-2594.
- Holst JJ, Knop FK, Vilsbøll T, Krarup T, Madsbad S. Loss of incretin effect is a specific, important, and early characteristic of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 34, Suppl 2: S251–S257, 2011. doi:10.2337/dc11-s227.
- Huising MO, van der Meulen T, Vaughan JM, Matsumoto M, Donaldson CJ, Park H, Billestrup N, Vale WW. CRFR1 is expressed on pancreatic β cells, promotes β cell proliferation, and potentiates insulin secretion in a glucose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 912–917, 2010. doi:10.1073/pnas.0913610107.
- Imai Y, Patel HR, Hawkins EJ, Doliba NM, Matschinsky FM, Ahima RS. Insulin secretion is increased in pancreatic islets of neuropeptide Y-deficient mice. *Endocrinology* 148: 5716–5723, 2007. doi:10.1210/en.2007-0404.
- Jiang Y, Luo L, Gustafson EL, Yadav D, Laverty M, Murgolo N, Vassileva G, Zeng M, Laz TM, Behan J, Qiu P, Wang L, Wang S, Bayne M, Greene J, Monsma F Jr, Zhang FL. Identification and characterization of a novel RF-amide peptide ligand for orphan G-protein-coupled receptor SP9155. *J Biol Chem* 278: 27652–27657, 2003. doi:10.1074/jbc.M302945200.
- Kaneto H, Matsuoka TA. Down-regulation of pancreatic transcription factors and incretin receptors in type 2 diabetes. *World J Diabetes* 4: 263–269, 2013. doi:10.4239/wjcd.v4.i6.263.
- Knop FK, Vilsbøll T, Højberg PV, Larsen S, Madsbad S, Vølund A, Holst JJ, Krarup T. Reduced incretin effect in type 2 diabetes: cause or consequence of the diabetic state? *Diabetes* 56: 1951–1959, 2007. doi:10.2337/db07-0100.
- Krarup T, Saubrey N, Moody AJ, Kühl C, Madsbad S. Effect of porcine gastric inhibitory polypeptide on beta-cell function in type I and type II diabetes mellitus. *Metabolism* 36: 677–682, 1987. doi:10.1016/0026-0495(87)90153-3.
- Lectez B, Jeandel L, El-Yamani FZ, Arthaud S, Alexandre D, Mardargent A, Jégou S, Mounien L, Bizet P, Magoul R, Anouar Y, Chartrel N. The orexigenic activity of the hypothalamic neuropeptide 26RFa is mediated by the neuropeptide Y and proopiomelanocortin neurons of the arcuate nucleus. *Endocrinology* 150: 2342–2350, 2009. doi:10.1210/en.2008-1432.
- Moriya R, Sano H, Umeda T, Ito M, Takahashi Y, Matsuda M, Ishihara A, Kanatani A, Iwaasa H. RFamide peptide QRFP43 causes obesity with hyperphagia and reduced thermogenesis in mice. *Endocrinology* 147: 2916–2922, 2006. doi:10.1210/en.2005-1580.
- Okamoto K, Yamasaki M, Takao K, Soya S, Iwasaki M, Sasaki K, Magoori K, Sakakibara I, Miyakawa T, Mieda M, Watanabe M, Sakai J, Yanagisawa M, Sakurai T. QRFP-deficient mice are hypophagic, lean, hypoactive and exhibit increased anxiety-like behavior. *PLoS One* 11: e0164716, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0164716.
- Ouedraogo R, Näslund E, Kirchgessner AL. Glucose regulates the release of orexin-a from the endocrine pancreas. *Diabetes* 52: 111–117, 2003. doi:10.2337/diabetes.52.1.111.
- Piteau S, Olver A, Kim SJ, Winter K, Pospisilik JA, Lynn F, Manhart S, Demuth HU, Speck M, Pederson RA, McIntosh CH. Reversal of islet GIP receptor down-regulation and resistance to GIP by reducing hyperglycemia in the Zucker rat. *Biochem Biophys Res Commun* 362: 1007–1012, 2007. doi:10.1016/j.bbrc.2007.08.115.
- Prévost G, Arabo A, Jian L, Quelennec E, Cartier D, Hassan S, Falluel-Morel A, Tanguy Y, Gargani S, Lihmann I, Kerr-Conte J, Lefebvre H, Pattou F, Anouar Y. The PACAP-regulated gene selenoprotein T is abundantly expressed in mouse and human β -cells and its targeted inactivation impairs glucose tolerance. *Endocrinology* 154: 3796–3806, 2013. doi:10.1210/en.2013-1167.
- Prévost G, Jeandel L, Arabo A, Coëffier M, El Ouahli M, Picot M, Alexandre D, Gobet F, Leprince J, Berrahmoune H, Déchelotte P, Malagon M, Bonner C, Kerr-Conte J, Chigr F, Lefebvre H, Anouar Y, Chartrel N. Hypothalamic neuropeptide 26RFa acts as an incretin to

- regulate glucose homeostasis. *Diabetes* 64: 2805–2816, 2015. doi:10.2337/db14-1864.
27. Primeaux SD, Blackmon C, Barnes MJ, Braymer HD, Bray GA. Central administration of the RFamide peptides, QRFP-26 and QRFP-43, increases high fat food intake in rats. *Peptides* 29: 1994–2000, 2008. doi:10.1016/j.peptides.2008.07.024.
28. Prodi E, Obici S. Minireview: the brain as a molecular target for diabetic therapy. *Endocrinology* 147: 2664–2669, 2006. doi:10.1210/en.2006-0143.
29. Schwartz MW, Seeley RJ, Tschöp MH, Woods SC, Morton GJ, Myers MG, D'Alessio D. Cooperation between brain and islet in glucose homeostasis and diabetes. *Nature* 503: 59–66, 2013. doi:10.1038/nature12709.
30. Takayasu S, Sakurai T, Iwasaki S, Teranishi H, Yamanaka A, Williams SC, Iguchi H, Kawasaki YI, Ikeda Y, Sakakibara I, Ohno K, Ioka RX, Murakami S, Dohmae N, Xie J, Suda T, Motoike T, Ohuchi T, Yanagisawa M, Sakai J. A neuropeptide ligand of the G protein-coupled receptor GPR103 regulates feeding, behavioral arousal, and blood pressure in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 7438–7443, 2006. doi:10.1073/pnas.0602371103.
31. Tobin V, Le Gall M, Fioramonti X, Stolarczyk E, Blazquez AG, Klein C, Prigent M, Serradas P, Cuif MH, Magnan C, Leturque A, Brot-Laroche E. Insulin internalizes GLUT2 in the enterocytes of healthy but not insulin-resistant mice. *Diabetes* 57: 555–562, 2008. doi:10.2337/db07-0928.
32. Verhulst PJ, Depoortere I. Ghrelin's second life: from appetite stimulator to glucose regulator. *World J Gastroenterol* 18: 3183–3195, 2012. doi:10.3748/wjg.v18.i25.3183.
33. Yue P, Jin H, Aillaud M, Deng AC, Azuma J, Asagami T, Kundu RK, Reaven GM, Quertermous T, Tsao PS. Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E59–E67, 2010. doi:10.1152/ajpendo.00385.2009.



Etude de l'effet de l'inactivation du 26RFa sur le phénotype obèse et diabétique

Le 26RFa est un neuropeptide qui possède une activité de type incrétine. Ce peptide peut agir directement sur le pancréas afin de stimuler la sécrétion d'insuline lui permettant d'exercer un effet anti-hyperglycémiant. Chez la souris obèse et hyperglycémique, l'effet anti-hyperglycémiant du 26RFa périphérique est totalement perdu. La mise en place d'un modèle transgénique de souris déficientes pour le 26RFa, a permis à notre équipe de montrer que l'absence de 26RFa induit une diminution de la sécrétion d'insuline par les cellules β . Les souris 26RFa^{-/-} sont alors légèrement plus intolérantes au glucose bien que leur glycémie à jeun ne soit pas modifiée.

Dans ce contexte, nous avons soumis des souris 26RFa^{-/-} à un régime riche en graisses afin d'évaluer l'impact de l'absence de 26RFa sur le phénotype obèse et hyperglycémique des animaux. Pour cela, nous avons donc exposé des souris 26RFa^{+/+} ; 26RFa^{+/-} et 26RFa^{-/-} à un régime HFD durant 12 semaines au cours desquelles nous avons mesuré le poids corporel, la glycémie à jeun ainsi que l'insulinémie des souris. Enfin, à l'issue de ces 3 mois de régime, nous avons évalué le profil glycémique de ces animaux au cours de différents tests métaboliques.

Les résultats de cette étude montrent que l'absence de 26RFa n'influence ni la prise de poids, ni l'hyperglycémie, pas plus que l'hyperinsulinémie induite par le régime HFD. De même, la tolérance au glucose et à l'insuline évaluées lors des tests métaboliques ne sont pas modifiées chez les souris 26RFa^{-/-}. Cependant, dans ce modèle transgénique constitutif, l'absence de 26RFa depuis les premiers stades développementaux pourrait déclencher des phénomènes compensatoires liés à la suractivation d'autres systèmes régulateurs de l'homéostasie glucidique.

1. Introduction et Objectif

Le neuropeptide 26RFa, découvert en 2003 a dans un premier temps été identifié comme impliqué dans la régulation du comportement alimentaire. Il a ainsi pu être mis en évidence que ce peptide, de par son action sur les neurones à NPY du noyau arché, exerce un effet orexigène puissant (Chartrel et al., 2003; Lectez et al., 2009). Plus récemment, des travaux de notre équipe nous ont permis de mettre en évidence que le neuropeptide 26RFa participait activement à la régulation de l'homéostasie glucidique en proposant ce peptide comme une nouvelle incrétine. En effet, le 26RFa sécrété par le duodénum, en réponse à une charge orale en glucose, active directement son récepteur le GPR103 présent sur les cellules β pancréatiques afin de stimuler la sécrétion d'insuline. De plus, l'injection périphérique de 26RFa améliore la tolérance au glucose ainsi que la tolérance à l'insuline (Prévoist et al., 2015).

Chez les souris rendues obèses et diabétiques par un régime riche en graisses (modèle High Fat Diet -HFD), la diminution de l'expression du GPR103 dans le pancréas et dans les tissus cibles de l'insuline entraîne une perte de l'effet anti-hyperglycémiant du 26RFa. Dans ces conditions, le 26RFa n'est plus capable de stimuler la sécrétion de d'insuline par le pancréas en condition d'hyperglycémie (Prévoist et al., 2019).

Enfin, très récemment, une étude nous a permis de caractériser le phénotype glycémique des souris déficientes pour le 26RFa (El-Mehdi et al., 2020). Cette étude réalisée chez des souris mâles soumises à un régime standard révèle que les souris 26RFa^{-/-} ne présentent pas de modification ni du poids corporel ni de la composition corporelle. De plus, dans ce modèle, l'absence du peptide orexigène 26RFa n'entraîne pas de modifications du comportement alimentaire chez les souris 26RFa^{-/-}. L'analyse du profil glycémique de ces souris révèle que l'absence de 26RFa ne modifie pas la glycémie à jeun des animaux mais entraîne une diminution de leur insulïnémie à jeun. Bien que la sensibilité à l'insuline ne soit pas altérée dans ce modèle, les souris 26RFa^{-/-} sont légèrement plus intolérantes au glucose et présentent une diminution de la sécrétion d'insuline induite par l'hyperglycémie (GSIS). Enfin, l'étude histo-morphométrique du pancréas a montré que les souris déficientes pour le 26RFa présentent une diminution de la production d'insuline par les cellules β . En revanche, le nombre de ces dernières est augmenté comparativement aux souris sauvages, l'ensemble de ces anomalies suggère un possible mécanisme compensatoire permettant de pallier le défaut de sécrétion d'insuline et qui *in fine* permet de maintenir une glycémie normale.

L'objectif de cette étude est donc de déterminer l'impact de l'absence constitutive de 26RFa dans un contexte physiopathologique. Nous avons donc soumis des souris KO pour le 26RFa et des souris sauvages à un régime HFD pendant 12 semaines afin d'induire un phénotype obèse et hyperglycémique chronique chez les animaux. Nous avons ensuite évalué dans ce modèle si l'absence de 26RFa pouvait impacter la prise de poids, la glycémie et l'insulinémie de base des souris mais aussi sur leur métabolisme glycémique durant différents tests métaboliques.

2. Matériels et méthodes

2.1. Animaux

Les souris 26RFa^{-/-} ont été obtenues du Pr. Sakurai de l'*International Institute for Integrative Sleep Medicine, Tsukuba, Ibaraki*, Japon. Brièvement, ces souris ont été obtenues par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires 129ScJ. La région codante pour le prépro26RFa de l'exon 2 a été remplacée par le gène de la iCre recombinase associé à la cassette PGK-gb2Neo qui code pour un gène de résistance à la Kanamycine sous le promoteur de la phospho-glucokinase (PGK) **Figure 34**. Ces cellules souches ont ensuite été implantées dans des blastocytes de souris C57BL/6J.

Des souris mâles de 8 semaines 26RFa^{+/+}, 26RFa^{+/-} et 26RFa^{-/-} (n=7,8,8 respectivement) ont été soumises à un régime HFD durant 12 semaines (U8978 ; SAFE) avec libre accès à l'eau et à l'alimentation. Les souris ont été stabulées 3-5/cages dans une pièce ventilée à 22°C ± 1°C avec 12h de jour et 12h de nuit (7 : 00 et 19 : 00). Les souris ont été habituées avant les expériences par des expérimentateurs habilités et les expériences ont été réalisées durant la phase diurne. Durant toute la durée du régime, le poids corporel, la glycémie ainsi que l'insulinémie ont été suivis chaque semaine.

2.2. Tests métaboliques, mesure de glycémie et d'insulinémie

Les tests métaboliques ont été effectués après 6 heures de jeûne avec libre accès à l'eau. Les tests de tolérance au glucose comportaient une injection de glucose (Glucose 30%, 2 g/kg) par voie orale (OGTT) ou intra-péritonéale (ipGTT). Les tests de tolérance à l'insuline ont été

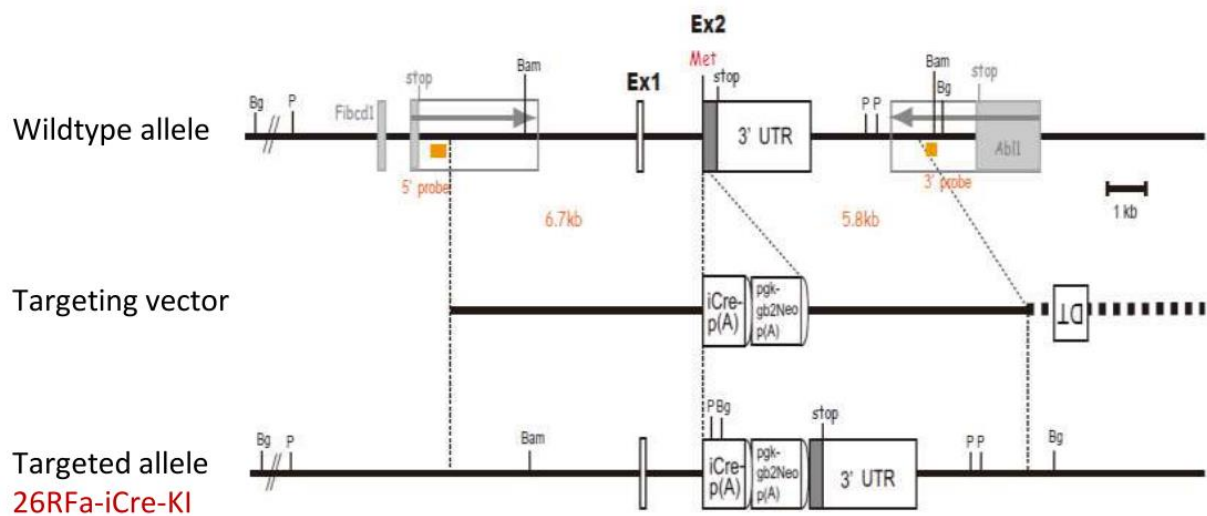


Figure 34. Stratégie d'inactivation du 26RFa chez la souris

Le gène de la cré-recombinase ainsi que la cassette PGK-gb2Neo, qui code pour un gène de résistance à la Kanamycine sous le promoteur de la phospho-glucokinase (PGK), a été insérée par recombinaison homologue dans l'exon 2 du gène du 26RFa permettant ainsi d'obtenir des souris déficientes pour le 26RFa.

Fibcd: fibrinogen C domain containing 1; Abl1: Proto-Oncogene 1

D'après El Mehdi *et al.* 2020

effectués par l'injection intra-péritonéale d'insuline (Umuline rapide, Eli Lilly, Neuilly-Sur-Seine, France) à raison de 0.75 U/kg.

Au cours de ces tests métaboliques, la glycémie a été mesurée à intervalles réguliers par prélèvements de sang à la veine caudale en utilisant des lecteurs de glycémie AccuCheck Performa (Roche diagnostic, Saint-Egrève, France) ou Xpress 2 (Nova biomédicale, Les Ulis, France). L'insulinémie a été mesurée par un prélèvement de sang à la veine caudale en utilisant un kit de dosage ultrasensible AlphaLISA provenant de Perkin Elmer.

3. Résultats et discussion

Durant les 12 semaines de régime HFD nous avons suivi le poids corporel, la glycémie ainsi que l'insulinémie à jeun des animaux. Les résultats montrent que les souris déficientes pour le 26RFa ne présentent pas de modification significative ni de leur poids corporel (J90 : 26RFa^{+/+} : 48,1 ± 0,5 g vs 26RFa^{+/-} : 46,4 ± 1,1 g vs 26RFa^{-/-} : 46,1 ± 1,1 g) **Figure 35A** ni de leur glycémie à jeun (J90 : 26RFa^{+/+} : 2,1 ± 0,2 g/L vs 26RFa^{+/-} : 2,0 ± 0,1 g/L vs 26RFa^{-/-} : 1,9 ± 0,1 g/L) **Figure 35B**, ni de leur insulinémie à jeun (J90 : 26RFa^{+/+} : 64,75 ± 11,00 µUI/ml vs 26RFa^{+/-} : 71,67 ± 8,57 µUI/ml vs 26RFa^{-/-} : 70,79 ± 10,39 µUI/ml), l'ensemble des animaux présente quel que soit leur génotype un hyperinsulinisme à partir de 60 jours de régime **Figure 35C**.

A l'issue des 12 semaines de régime nécessaire à l'apparition d'un phénotype obèse et hyperglycémique comme obtenu précédemment, le profil métabolique de tous les animaux a été évalué. Les résultats montrent que les souris déficientes pour le 26RFa ne présentent pas de modification de la tolérance au glucose qu'elle soit mesurée après une injection intrapéritonéale de glucose ou après une charge orale en glucose **Figure 36A, B** respectivement. Les souris ne présentent pas non plus de modification de la tolérance à l'insuline **Figure 36C**. Enfin, nous n'avons pas observé de modification de la sécrétion d'insuline induite par l'hyperglycémie quel que soit le génotype des animaux testés **Figure 37A,B**.

L'ensemble de ces résultats montre donc que l'absence de 26RFa ne semble ni aggraver, ni améliorer le phénotype des souris soumises à un régime HFD. Contrairement aux précédents résultats obtenus chez la souris soumise à un régime standard, les souris déficientes pour le 26RFa ne sont pas plus intolérantes au glucose que les souris 26RFa^{+/+} et/ou 26RFa^{+/-}. De plus, l'hyperinsulinisme observé à partir de 60 jours de régime est cohérent avec le phénotype obèse

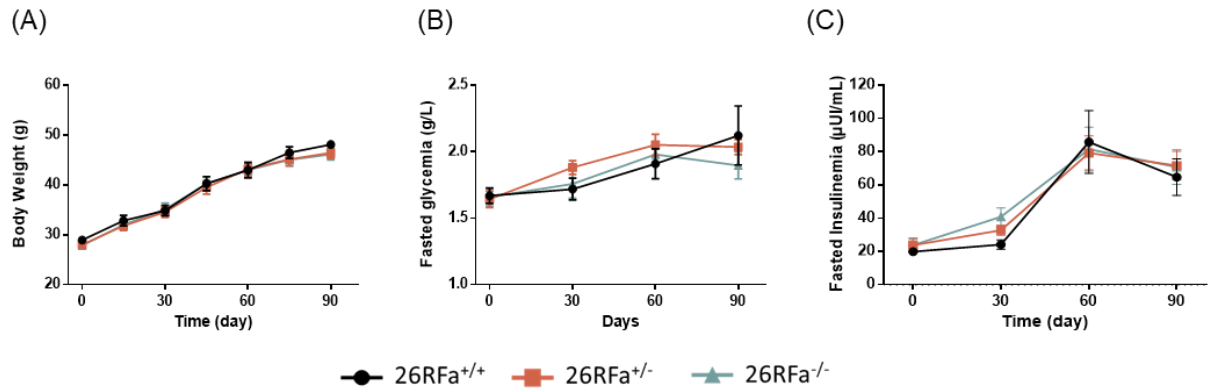


Figure 35. Evolution du phénotype des souris 26RFa^{+/+}, 26RFa^{+/-} et 26RFa^{-/-} soumises au régime HFD (n=7-8/groupes) (A) Evolution du poids corporel. (B) Evolution de la glycémie à jeun. Et (C) évolution de l'insulinémie à jeun. Résultats exprimés en moyenne ± SEM

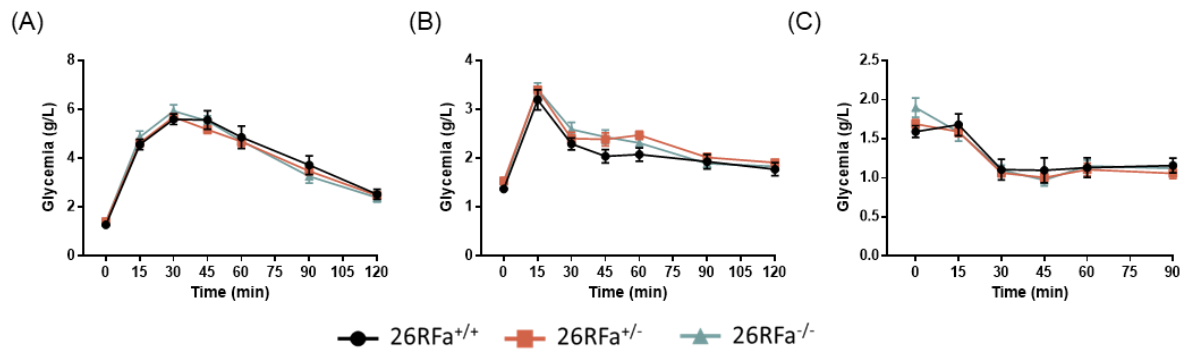


Figure 36. Profil glycémique des souris 26RFa^{+/+}, 26RFa^{+/-} et 26RFa^{-/-} soumises au régime HFD (n=7-8/groupes) durant (A) un test de tolérance du glucose (IPGTT), (B) après une charge orale en glucose (OGTT), et (C) durant un test de tolérance à l'insuline. Résultats exprimés en moyenne ± SEM

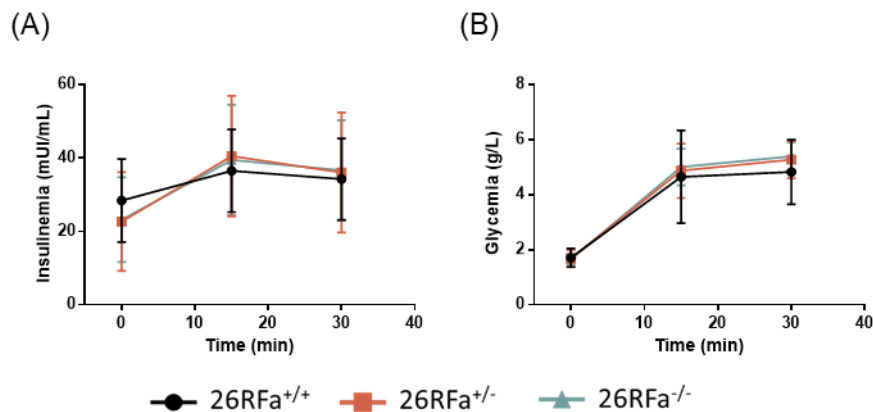


Figure 37. Mesure de la sécrétion d'insuline induite par le glucose chez les souris 26RFa^{+/+}, 26RFa^{+/-} et 26RFa^{-/-} soumises au régime HFD (n=7-8/groupes) durant un test de tolérance au glucose. (A) insulinémie ; (B) Glycémie. Résultats exprimés en moyenne ± SEM

et hyperglycémique des souris mais il n'est pas aggravé lorsque le système 26RFa est absent. Ces résultats sont donc en concordance avec les résultats que nous avons précédemment obtenus. En effet, dans le modèle de souris soumises à un régime HFD, le système 26RFa/GPR103 est défaillant. Dans ces conditions, le 26RFa n'est plus capable de stimuler la sécrétion d'insuline probablement par une diminution de la production du GPR103 dans les îlots pancréatiques. Ainsi, il est possible de concevoir que la délétion d'un système déjà défaillant chez la souris obèse et diabétique n'induit pas d'altérations notables de l'homéostasie du glucose. Cependant, comme nous l'avons vu, la régulation de l'homéostasie énergétique est un mécanisme complexe qui met en jeu de nombreux organes et systèmes régulateurs. Il est donc également envisageable que dans ce modèle transgénique constitutif, l'absence de 26RFa soit compensée par une suractivation d'autres systèmes peptidergiques.

Article 2 : L'administration icv aiguë de 26RFa contrairement à l'administration chronique améliore l'homéostasie du glucose chez la souris obèse et diabétique

Marie-Anne Le Solliec, Arnaud Arabo, Saloua Takhlidjt, Julie Maucotel, Mélodie Devère, Julien Riancho, Hind Berrahmoune Jean-Luc do Rego, Jean-Claude do Rego, Alexandre Bénani, Emmanuelle Nedelec, Benjamin Lefranc, Jérôme Leprince, Youssef Anouar, Marie Picot, Nicolas Chartrel, Gaëtan Prévost

Article soumis dans Neuroendocrinologie

Le neuropeptide 26RFa ainsi que son récepteur GPR103 sont impliqués dans la régulation de la glycémie. D'une part, le 26RFa agit comme une incrétine et d'autre part il augmente la sensibilité à l'insuline en favorisant la captation de glucose et des acides gras dans le muscle et le tissu adipeux respectivement. Cependant, cet effet anti-hyperglycémiant du 26RFa périphérique est totalement suspendu chez la souris obèse et diabétique en raison d'une diminution de l'expression du GPR103 dans le pancréas, le muscle et le tissu adipeux. Par ailleurs, il a récemment été montré que des injections icv de 26RFa diminuent fortement l'hyperglycémie induite par une charge en glucose et que cet effet est médié par une augmentation de la sécrétion d'insuline. Aujourd'hui, les effets centraux du 26RFa chez la souris obèse et diabétique demeurent inexplorés.

Dans ce contexte nous avons tout d'abord déterminé les effets d'une injection icv aiguë de 26RFa chez la souris HFD. Pour ce faire, nous avons utilisé des souris C57Bl/6J que nous avons soumis à un régime riche en graisses (High Fat Diet – HFD) durant 4 mois. Ces souris ont reçu une dose unique de 3 µg de 26RFa au décours de différents test métaboliques. Puis, nous avons évalué l'impact du régime HFD sur l'expression hypothalamique du 26RFa et du GPR103 chez la souris soumise au régime durant 30,60 et 120 jours. Enfin, nous avons déterminé l'effet d'une infusion icv chronique de 26RFa sur le phénotype obèse et hyperglycémique des souris HFD en utilisant des pompes osmotiques. Durant les 4 semaines de traitement, nous avons mesuré l'effet du 26RFa sur la prise alimentaire, le poids corporel, la glycémie, l'insulinémie. A la fin du protocole expérimentale nous avons étudié l'effet du traitement chronique de 26RFa sur la tolérance au glucose et à l'insuline.

Premièrement, l'administration icv aiguë de 26RFa chez la souris HFD induit un effet anti-hyperglycémiant lié à une augmentation de la sécrétion d'insuline. Deuxièmement, le régime HFD n'influence pas significativement l'expression hypothalamique du 26RFa et du GPR103. Enfin, le traitement chronique icv de 26RFa induit une augmentation significative du poids corporel liée à une augmentation de la prise alimentaire. Les tests métaboliques réalisés en fin de protocole ne révèlent aucune modification significative de la tolérance au glucose et de la sécrétion d'insuline chez les souris traitées.

Cette étude montre que l'effet insulinothrompique du 26RFa central est conservé chez les souris HFD. En revanche, l'administration centrale chronique de 26RFa ne permet pas d'améliorer le phénotype obèse et hyperglycémique des souris HFD ce qui suggère que le 26RFa pourrait intervenir principalement dans la régulation à court terme de la glycémie.

Acute but not chronic central administration of the neuropeptide 26RFa (QRFP) improves glucose homeostasis in obese/diabetic mice

Marie-Anne Le Sollicec¹, Arnaud Arabo², Saloua Takhlidjt¹, Julie Maucotel², Mélodie Devère¹, Julien Riancho¹, Hind Berrahmoune¹, Jean-Luc do Rego³, Jean-Claude do Rego³, Alexandre Bénani⁴, Emmanuelle Nedelec⁴, Benjamin Lefranc^{1,5}, Jérôme Leprince^{1,5}, Youssef Anouar¹, Marie Picot¹, Nicolas Chartrel^{1,*}, Gaëtan Prévost^{1,6}

¹Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1239, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication (DC2N), Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), 76000 Rouen, France

²Normandie Univ, UNIROUEN, Department of Biological Resources (SRB), Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), 76000 Rouen, France

³Normandie Univ, UNIROUEN, Animal Behaviour Platform SCAC, Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), 76000, Rouen, France

⁴Center for Taste and Feeding Behaviour, CNRS (UMR6265), INRA (UMR1324), AgroSup Dijon, Université de Bourgogne-Franche Comté, 21000 Dijon, France

⁵Cell Imaging Platform of Normandy, Normandie Univ, 76000 Rouen, France

⁶Normandie Univ, UNIROUEN, Rouen University Hospital, Department of Endocrinology, Diabetes and Metabolic Diseases, 76000 Rouen, France

Short title: 26RFa and central glucose homeostasis

***Corresponding author:** Dr Nicolas Chartrel, Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1239, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication (DC2N), 76000 Rouen, France

Phone: (33)235 14 6686; Fax: (33)235 14 6946

e-mail address: nicolas.chartrel@univ-rouen.fr

Number of tables: 2

Number of figures: 4

Word count: 4072

Key words: brain; glucose homeostasis; insulin; diabetes; obesity

Abstract

Introduction: The aim of the study is to investigate whether acute or chronic central administration of the hypothalamic neuropeptide 26RFa may ameliorate the glycaemic control of obese/diabetic mice. **Methods:** mice were treated for 4 months with a high fat diet (HF) and received a single i.c.v. injection of 26RFa (3 µg) or a chronic i.c.v. administration of the peptide during 28 days via osmotic minipumps (25 µg/day). i.p. and oral glucose tolerance tests, insulin tolerance test, glucose-stimulated insulin secretion, food/water intake, horizontal/vertical activity, energy expenditure, meal pattern and whole body composition were monitored. In addition, 26RFa and GPR103 mRNA expression as well as plasma 26RFa levels were evaluated by RT-QPCR and radioimmunoassay. **Results:** Acute administration of 26RFa in HF mice induced a robust anti-hyperglycaemic effect by enhancing insulin secretion whereas chronic administration of the neuropeptide is unable to improve glucose homeostasis in these obese/diabetogenic conditions. By contrast, chronic 26RFa treatment induced an increase of the body weight accompanied with an enhanced food intake and a decreased energy expenditure. Finally, we show that the HF diet does not alter the hypothalamic expression of the 26RFa/GPR103 neuropeptidergic system nor the levels of circulating 26RFa. **Conclusion:** Our data indicate that the central beneficial effect of 26RFa on glucose homeostasis, by potentiating glucose-stimulated insulin secretion, is preserved in HF mice. However, chronic administration of the neuropeptide is unable to balance glycaemia in these pathophysiological conditions, suggesting that the hypothalamic 26RFa/GPR103 neuropeptidergic system mainly affects short term regulation of glucose metabolism.

Introduction

Accumulated studies during the last decade provided the evidence that glucose homeostasis is driven by a complex interplay between the pancreatic islets and the brain [1, 2]. This concept is illustrated, for instance, by the fact that the pancreatic islets are richly innervated by both sympathetic and parasympathetic fibers, with the former capable of powerfully inhibiting glucose-stimulated insulin secretion and the latter having the opposite effect [3, 4]. The crucial role of the brain in the control of glucose metabolism is supported by the observations that the nuclei of the hypothalamus i.e.; the arcuate nucleus (Arc), the paraventricular nucleus (PVN), the ventromedial hypothalamic nucleus (VMN) and the lateral hypothalamic area (LH), all contain specific glucose-sensing neuronal populations that have a key role in initiating the glucose counter-regulatory response to hypo or hyperglycemia [3, 5]. Indeed, photoactivation of VMN SF1 neurons induces a diabetogenic-like effect characterized by hyperglycemia and glucose intolerance partially mediated by inhibition of insulin secretion and enhanced glucagon release [6]. It was also found that chemogenetic activation of Arc AgRP neurons causes peripheral insulin resistance and increase plasma insulin [7]. These observations and many others raise the hypothesis that aberrant activity of the hypothalamic glucoregulatory circuits may be involved in the pathogenesis of type 2 diabetes (T2D) and suggest that correcting these underlying defects should normalize glycemia in diabetic animals. Supporting this notion, it was recently reported that leptin is able to normalize glycemia in mice with severe insulin deficiency, and that a single icv injection of FGF1 can induce remission of hyperglycemia in rodents models of T2D for weeks or months [8-10]. However, our understanding of the hypothalamic glucoregulatory neurocircuitry and its contribution to T2D pathogenesis is still in its infancy, and deserves the identification of novel peptidergic neuronal systems regulating glucose homeostasis within the hypothalamus.

In this context, the neuropeptide 26RFa (also referred to as QRFP) and its receptor GPR103, discovered by us and others, are of particular interest [11-16]. Indeed, 26RFa- and GPR103-expressing neurons are primarily localized in the VMN and the LH, and i.c.v. administration of the neuropeptide stimulates food intake by modulating the NPY/POMC system in the Arc [11, 15, 17-20]. The 26RFa/GPR103 neuropeptidergic system is also involved in the control of glucose homeostasis at the periphery [21-24]. 26RFa and GPR103 are strongly expressed by the β cells of the pancreatic islets and in the gut [21-23]. 26RFa attenuates drastically glucose-induced hyperglycemia by acting as an incretin and by increasing insulin sensitivity, and 26RFa mutant mice exhibit an impaired regulation of glucose homeostasis [22, 24]. In addition, a loss of the incretin activity of 26RFa and a marked reduction of its insulin-sensitive effect, which is associated with a down-regulation of the 26RFa receptor in the pancreatic islets, and insulin target tissues are observed in obese/diabetic mice, revealing the occurrence, at the periphery, of a 26RFa resistance in these pathological conditions [25].

Finally, we promoted, very recently, the evidence that the 26RFa neuronal system of the hypothalamus plays a key role in the central regulation of glucose homeostasis by lowering glucose-induced hyperglycemia and by mediating some of the central effects of insulin on glucose metabolism [26].

With regard to all of these observations, the aim of the present study was to investigate whether acute or chronic central administration of 26RFa may ameliorate the glycaemic control of obese/diabetic mice.

Materials and Methods

Animals

Male C57Bl/6 mice (Janvier laboratory, Le Genest-Saint-Isle, France), weighing 22–25 g, were housed at 5 animals per cage, with free access to standard diet (U.A.R., Villemoisson-sur-Orge, France) and tap water. They were kept in a ventilated room at a temperature of $22\pm 1^\circ\text{C}$ under a 12-h light/12-h dark cycle (light on between 7 h and 19 h). All the experiments were carried out between 09.00 h and 18.00 h in testing rooms adjacent to the animal rooms. Animal manipulations were performed according to the European Community Council Directive of November 24th 1986 (86:609: EEC), and were conducted by authorized investigators. Mice were submitted to a dietary challenge at two months of age by using a standard chow (U8200G10R; energy density: 2 830 kcal/kg; Scientific Animal Food & Engineering (SAFE), Augy, France) or a HF diet (U8978; energy density: 5 283 kcal/kg; SAFE). Experiments were performed after three months of dietary challenge. Our Institutional Animal Use and Care Committee (CENOMAX, Agreement of the Ministry of Research n°54) approved the experimental procedures (Agreement n°: #11752).

Surgery

Mice were anesthetized with isoflurane and placed in a stereotaxic frame. A stainless steel 26 gauge guide cannula (Phymep, Paris, France) was inserted into the right lateral ventricle (0.8 mm lateral to bregma and 2.2 mm ventral to dura mater). A stainless dummy small cap for 26-gauge cannula (Phymep) was inserted to prevent occlusion of the guide cannula and leakage of the cerebrospinal fluid. The cannula placement was secured with dental acrylic cement. At the end of the surgery, animals were treated with a nonsteroidal anti-inflammatory drug, buprenorphine after guide cannula placement. Following surgery, all animals were allowed to recover for two weeks, and were handled three times in order to be habituated to handling by

researchers. Correct cannula positioning was confirmed by histological examination after Trypan blue injection.

For chronic ICV infusion, mice were implanted with a cannula to the right lateral ventricle using a brain infusion kit 3 (Alzet®, DURECT, Cupertino, CA) at stereotaxic coordinates: 0.85 mm lateral, 0.22 mm posterior to bregma, and 2.5 mm below the skull surface. The cannula were connected to a subcutaneous 28-days osmotic minipump (Alzet®, DURECT, Cupertino, CA) filled with either vehicle (hepes buffer) or 26RFa (25µg/day). After implantation, mice were treated with buprenorphine for 3 days.

Cell culture

The murine m-HypoA-59 neuronal cell line (CELLutions Biosystems Inc, Ontario, Canada) was cultured in DMEM (41965-039, Sigma–Aldrich&) supplemented with 10% of FBS and 2% of penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich) and plated in 6 well plate (500x10³ cells/well). After 24 h, cells were treated for 12 h with 100 µM of palmitate (P9767-5G, Sigma Aldrich) dissolved in serum-free DMEM containing 5% of free-fatty acids-BSA. Following this period, the cells were removed and subjected to RNA extraction for PCR quantification.

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Total RNA from m-HypoA-59 cells and hypothalami was isolated as previously described [24]. Relative expression of the 26RFa, GPR103, InsR and IL6 genes was quantified by real-time PCR with appropriate primers (Table 1). β-actin was used as internal control for normalization. PCR was carried out using Gene Expression Master Mix 2X assay (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) in an ABI Prism 7900 HT Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems). The purity of the PCR products was assessed by dissociation curves.

Table 1. Sequence of the primers used for the Q-PCR experiments

Name	Forward	Reverse
Mouse β -actine	AGATCAAGATCATTGCTCCTCCTG	CCCAGCTCAGTAACAGTCCG
Mouse 26RFa	GAAGGGGACCCACAGACATC	GTCTTGCCTCCCTAGACGGAA
Mouse GPR103	CACTGCTGTTGTGACGGAAAT	CCTTCGGGTAGTGTACTGCC
Mouse Insulin receptor	ATGGGCTTCGGGAGAGGAT	GGATGTCCATAACCAGGGCAC
Mouse IL6	GGGACTGATGCTGGTGACAA	ACAGGTCTGTTGGGAGTGTT

The amount of target cDNA was calculated by the comparative threshold (Ct) method and expressed by means of the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

Blood glucose and insulin measurements in mice

For acute experiments, all metabolic tests were performed on 16 h-fasting mice with free access to water, and test substances including 26RFa (3 μ g) and insulin (10 mUI) were dissolved in Hepes buffer and injected i.c.v. in a 2 μ l volume. The injections were done using a Hamilton syringe (outer diameter 0.5 mm; Hamilton Co., Reno, NV) attached to polyethylene tubing. The i.c.v. injections were performed under anesthesia consisting of an i.p. administration of diazepam (5 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg). For i.p. glucose tolerance test, mice were treated i.p. with glucose (2 g/kg).

For chronic experiment, all metabolic tests were performed on 6 h-fasting mice with free access to water to avoid a too much impact of fasting on the phenotype of obese mice. For i.p. glucose tolerance test and oral glucose tolerance test, mice received 2 g/kg of i.p or oral glucose, respectively. For insulin tolerance test, mice were injected with 0.75 UI/kg of human insulin (Eli Lilly, Neuilly-sur-Seine, France).

In all experiments, plasma glucose concentrations were measured from tail vein samplings at various times using an AccuChek Performa glucometer (Roche Diagnostic, Saint-Egreve, France) or Xpress 2 glucometer (Nova Biomedical, Les Ullis, France) when glycemia was higher than 6 g/L. Plasma insulin concentrations (from tail vein samplings) were determined using an ultrasensitive mouse insulin AlphaLisa detection kit (cat number AL204C) from Perkin Elmer.

Experiments during chronic i.c.v. infusion of 26RFa

8 weeks old mice were submitted to a high fat diet for 10 weeks and then divided in two groups: one group that received 26RFa via an osmotic pump for 28 days (25 µg/day) and the other one that received Hepes via the same procedure. After implantation of the pumps, mice were placed in a combined indirect calorimetry system for habituation (PhenoMaster, TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Germany). Ten days after pump implantation, food/water intake, horizontal/vertical activity and energy expenditure were measured for 5 days. At the end of these calorimetric experiments, mice were placed in individual BioDAQ cages (Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ), acclimated for 3 days, and meal pattern was evaluated for 3 days. After this period, mice were placed into standard individual cages until euthanasia. During the 4th and last week of treatment, mice were submitted to metabolic assays. Throughout the treatment, the body weight was measured each day and 6h-fasting glycemia and insulinemia were measured each week. At the end of treatment, whole body composition was assessed on vigil animals, using MiniSpec LF110 (Brucker, Wissembourg, France), a fast nuclear magnetic resonance method and mice were euthanized. Tissues and plasma samples were collected. Metabolic biomarkers were measured on plasma samples using IDEXX Catalyst One technology (Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA).

26RFa radioimmunoassay

Quantification of 26RFa in plasma samples was carried out using a specific radioimmunoassay set up in the laboratory [17]. For the radioimmunoassay procedure, each plasma sample was diluted (1:1) in a solution of water/trifluoroacetic acid (99.9:0.1; vol/vol). Diluted plasmas were pumped at a flow rate of 1.5 ml/min through one Sep-Pak C18 cartridge. Bound material was eluted with acetonitrile/water/trifluoroacetic acid (50:49.9:0.1; vol/vol/vol), and acetonitrile was evaporated under reduced pressure. Finally, the dried extracts were resuspended in 0.1 M PBS and assayed for 26RFa.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism (version 6). A Kruskal Wallis test with Dunn's multiple comparison test or Ordinary one-way ANOVA with Sidak's multiple comparison were used for comparisons between different groups. ANOVA two-ways were used for repeated measures. A post-hoc comparison using a Bonferoni, Tukey or Sidak test was applied according to ANOVA results. All data represent means \pm SEM. Statistical significance was set up at $p < 0.05$.

Results

Effects of acute i.c.v. administration of 26RFa on the glycemic control of obese/diabetic mice

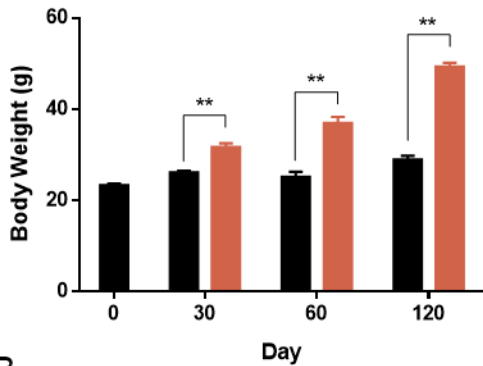
The high fat (HF) diet challenge induced a significant ($p < 0.01$) weight gain right from the first month of treatment (Fig. 1A). Plasma glucose was also significantly increased ($p < 0.01$) after one month of HF diet (Fig. 1B). After 4 months, the HF mice exhibited a fasting glycemia of 2.37 ± 0.17 g/l, whereas that of the SD mice at the same time was 1.65 ± 0.11 g/l ($p < 0.01$; Fig. 1B). By contrast, plasma 26RFa levels were not modified all along the HF treatment as compared to SD mice (Fig. 1C). However, it is noteworthy that, in the two groups of mice (SD and HF), plasma 26RFa increased gradually with the age of the animals to reach a significance at the end of the experimental protocol (4 months; $p < 0.05$) (Fig. 1C).

The impact of i.c.v. administration of 26RFa was investigated on basal glycemia in HF mice. As illustrated in figure 1D, 26RFa did not affect significantly basal plasma glucose levels during the 90-min period of the test. By contrast, an IPGTT revealed that 26RFa significantly attenuated ($p < 0.01$) the hyperglycemia induced by an i.p. glucose challenge in HF mice (Fig. 1E). Concurrently, an acute glucose-stimulated insulin secretion test (AGSIS) indicated that i.c.v. injection of 26RFa allowed to maintain high level of insulin production as compared to the mice that did not receive 26RFa and exhibited a progressive decreased insulin production during the test (Fig. 1F). Consequently, the ratio glucose/insulin (during the IPGTT) was significantly lower ($p < 0.01$) in 26RFa-injected mice as compared to Hapes-injected mice (Fig. 1G).

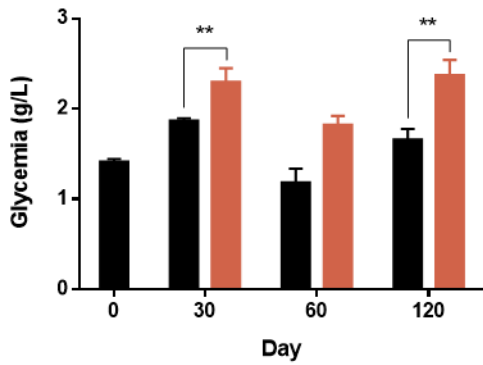
Hypothalamic expression of the 26RFa/GPR103 peptidergic system in obese/diabetogenic condition: impact of insulin

We investigated whether the expression of 26RFa and its receptor was impaired in a diabetogenic environment using *in vitro* and *in vivo* complementary approaches. Firstly, we

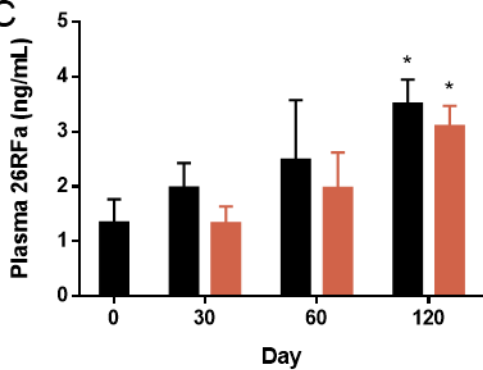
A ■ Standard Diet ■ High Fat Diet



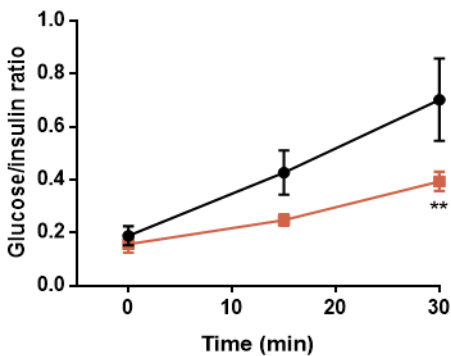
B



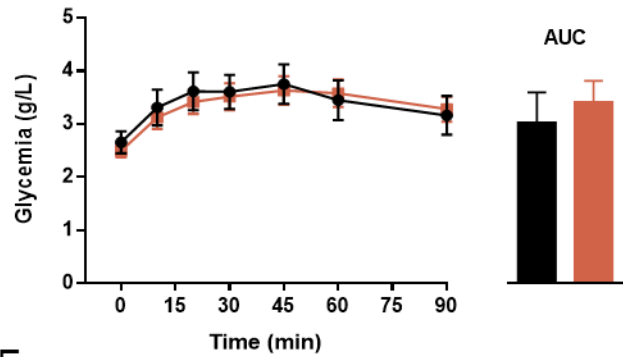
C



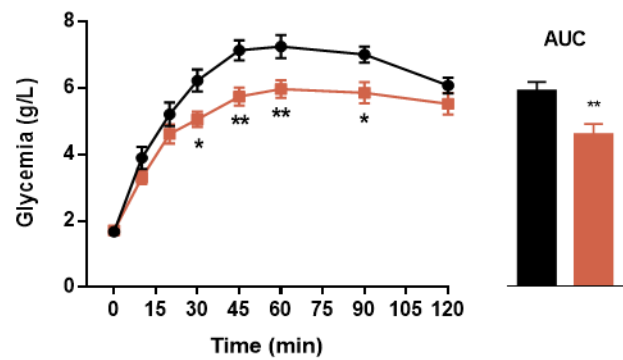
G



D ● Hepes ■ 26RFa



E



F

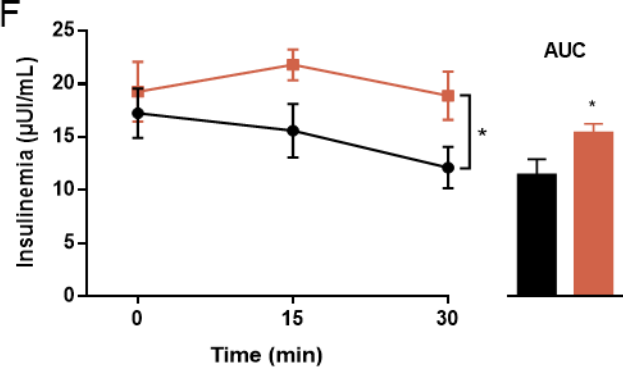


Figure 1. Effects of acute i.c.v. administration of 26RFa on the glycemic control of obese/diabetic mice. **(A-C)** Evolution of body weight (A), basal glycemia (B) and plasma 26RFa levels (C) during a 4-month standard diet (black) or high fat diet (red) (n=5 mice/condition). **(D-G)** Effect of central administration of 26RFa (3 µg) in high fat mice on basal glycemia (D), during a glucose tolerance test (IPGTT) (E), an acute glucose-stimulated insulin secretion test (F) and the glucose/insulin ratio measured during a IPGTT (G) (n=10-14/group). Values represent the mean ± SEM and AUC the areas under the curves. *, p<0.05; **, p<0.01 compared to mice injected with the vehicle.

used the hypothalamic neuronal cell line m-HypoA-59 that expresses 26RFa and its receptor GPR103 as a model of 26RFa-producing neurons, and we treated these cells with palmitate to mimic conditions of lipotoxicity. Our data revealed that the palmitate treatment did not alter the expression of 26RFa and GPR103 in the m-HypoA-59 neuronal cells (Fig. 2A). The increased expression of IL6 in these cells indicates that palmitate-induced lipotoxicity was effective (Fig. 2A). The hypothalamic expression of 26RFa and GPR103 was also followed during the 4-month HF challenge of the mice. A significant increase of the expression of 26RFa ($p < 0.05$) and GPR103 ($p < 0.05-0.01$) was observed 1 or 2 months after the beginning of the protocol in the HF as well as in the SD mice (Fig. 2B, C). However, the HF treatment did not alter the expression of the neuropeptide and its receptor in the hypothalamus as compared to the SD treatment (Fig. 2B, C). Then, we compared the effects of 26RFa and insulin (injected i.c.v.) during a glucose tolerance test in HF mice. 26RFa induced a robust antihyperglycemic effect whereas the insulin-induced attenuation of the glycemia was abolished in HF mice (Fig. 2D). Co-administration of 26RFa and insulin induced an antihyperglycemic effect similar in terms of amplitude and kinetic to that of 26RFa alone (Fig. 2D). Concurrently, we evaluated the impact of i.c.v. injection of insulin on the hypothalamic expression of 26RFa and that of its receptor (InsR) in HF mice, and compared it to that of SD mice. We found that insulin slightly increased 26RFa expression in SD mice but not in HF animals (Fig. 2E). By contrast, the hormone does not impact the expression of its own receptor whatever the diet challenge given (Fig. 2E).

Effects of chronic i.c.v. administration of 26RFa on the metabolic and glycemic phenotype of the obese/diabetic mice

A one month *in vivo* protocol was set up to determine the impact of continuous administration of 26RFa on the metabolic and glycemic phenotype of the obese/diabetic mice

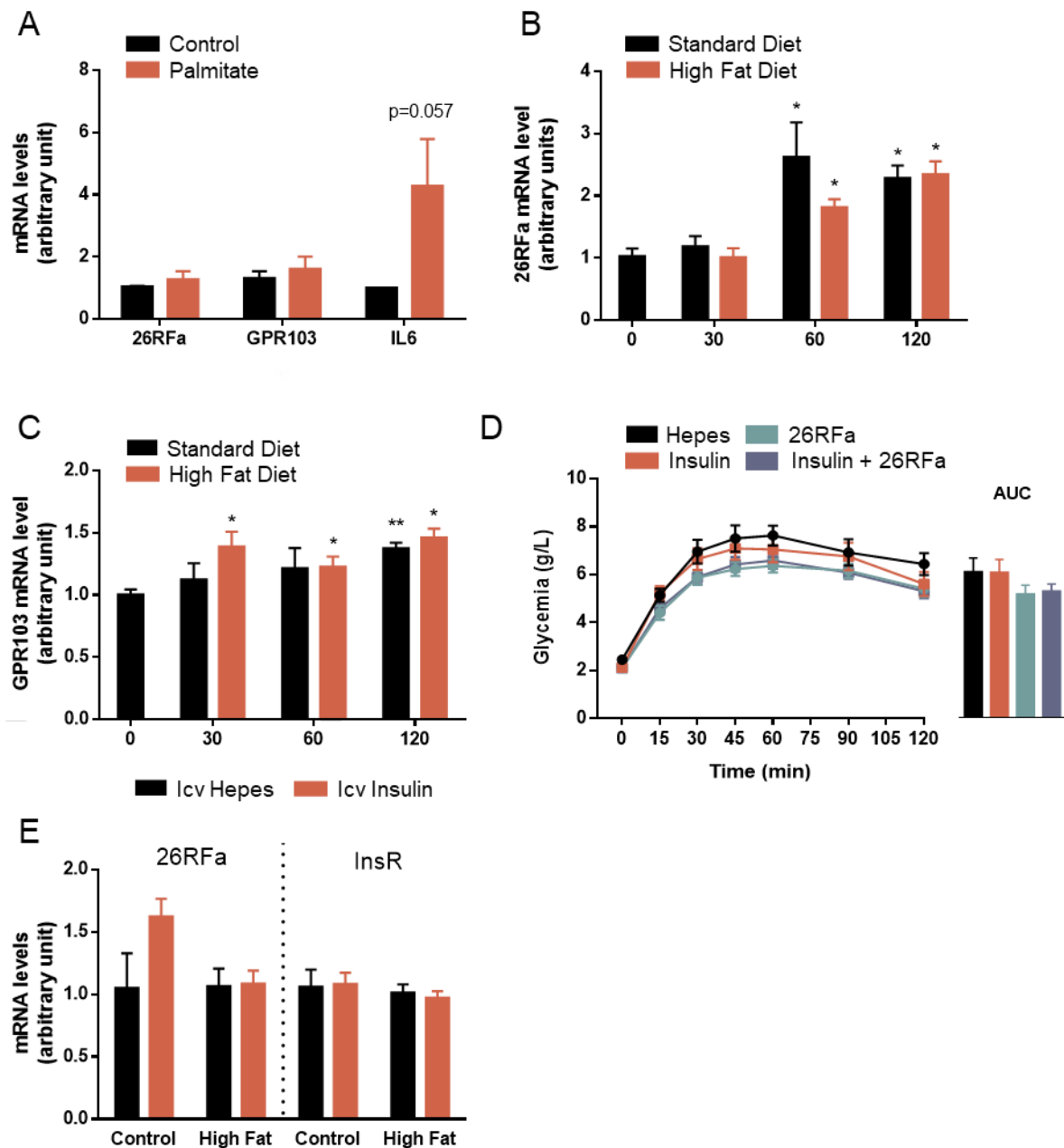


Figure 2. Hypothalamic expression of the 26RFa/GPR103 peptidergic system in obese/diabetogenic condition: impact of insulin. **(A)** Expression levels of 26RFa, GPR103 and IL6 mRNA in mHypoA-59 cells treated with palmitate (100 μ M, red) for 12 h vs non-treated cells (black) (N=3). **(B, C)** Expression levels of 26RFa and GPR103 mRNA in the hypothalamus of 4-month high fat-treated mice (red) vs mice fed a standard chow (black) (n=5/conditions). **(D)** Effect of an acute i.c.v. administration of insulin (10 mUI, red), 26RFa (3 μ g, light blue) or insulin (10 mUI) + 26RFa (3 μ g) (dark blue) on glycemia during a glucose tolerance test in mice submitted to a 4-month high fat diet (n=8-17/group). AUC represent the areas under the curves. **(E)** Expression levels of 26RFa and the insulin receptor (InsR) mRNA in the hypothalamus following the central administration of insulin (10 mUI, red) vs animals injected with the vehicle (black) (n=7-8/group). Values represent the mean \pm SEM. *, p<0.05; **, p<0.01 compared to mice fed a standard diet.

(Fig. 3A). Chronic i.c.v. administration of 26RFa via Alzet pumps, 10 weeks after the beginning of the HF diet, induced a significant increase in body weight as compared to the mice receiving Hepes ($p < 0.001$; Fig. 3B). Concurrently, measurement of cumulative food intake for 5 days revealed that the mice treated with 26RFa ate more than the mice receiving the Hepes chronically ($p < 0.001$; Fig. 3C). This higher food consumption observed in 26RFa-treated mice was associated with a significant increase in the meal size (Fig. S1A) whereas the meal frequency, duration and total meal time were not impaired (Fig. S1B-D). The increased food intake observed in 26RFa-treated mice was accompanied by a small increase of water intake (Fig. 3D) and a tendency to decreased energy expenditure (Fig. 3E). Concurrently, the locomotor activity (horizontal and vertical) was assessed but no significant difference between the HF mice receiving 26RFa and those chronically injected with Hepes was observed (Fig. S1E, F).

Evaluation of basal glycemia and other metabolic parameters in Hepes- or 26RFa-treated mice did not reveal any significant difference between the two groups during the chronic treatment (Fig. 3F, Table 2). In contrast, evaluation of insulinemia at the same time showed higher (although not significant) plasma insulin levels in 26RFa-treated mice (Fig. 3G). Body fat mass also tended to be higher in 26RFa-chronically injected mice (Fig. 3H) whereas the biochemical parameters were similar between the 26RFa-treated mice and the Hepes-treated animals (Table 2).

The impact of chronic i.c.v. administration of 26RFa on the “glycemic” phenotype of the HF mice was investigated using complementary *in vivo* tests performed during the last week of treatment. A IPGTT revealed a slight increase of glucose-induced hyperglycemia in the 26RFa-treated mice ($p = 0.07$) that was associated with slightly higher plasma insulin levels during the first 15 mins of the test as compared to Hepes-treated animals (Fig. 4A, B). However, calculation of the glucose/insulin ratio during the first 30 mins of the IPGTT did not reveal any

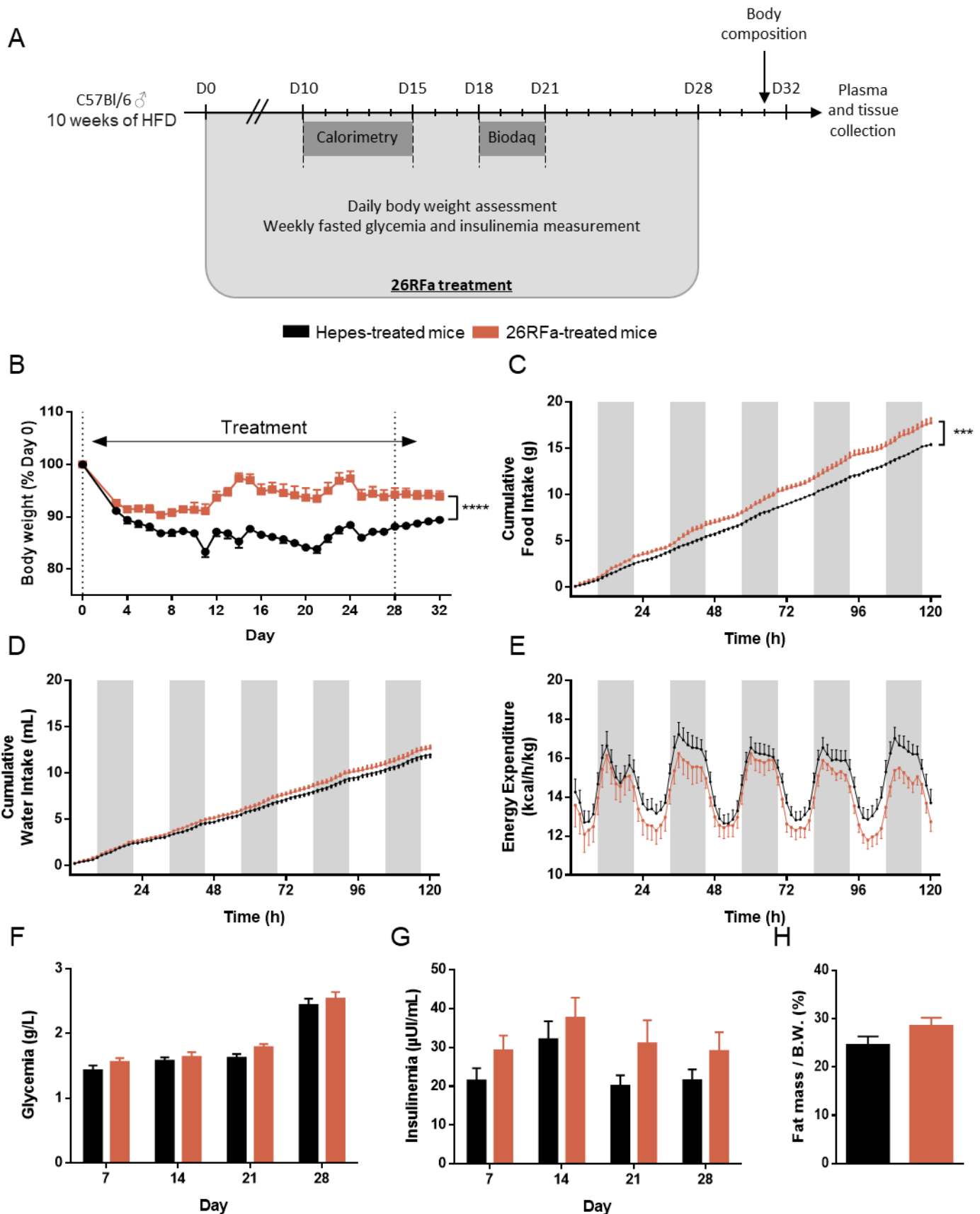


Figure 3. Effects of chronic i.c.v. administration of 26RFa on the metabolic and glycemic phenotype of the obese/diabetic mice. **(A)** Schematic representation of the experimental protocol used to evaluate the impact of 26RFa, injected chronically (25 μ g/day), on various metabolic and glycemic parameters during a 4-month high fat diet. **(B)** Evolution of the body weight of the high fat mice for 28 days after the implantation of the Alzet pumps filled with 26RFa (red) or the vehicle (black) ($n=7-9$ /groups). **(C-E)** Evolution of food intake (C), water intake (D) and energy expenditure (E) for 5 days in 26RFa-treated mice (red) vs hepes-treated mice (black) ($n=8$ /groups). **(F, G)** Evolution of basal glycemia (F) and insulinemia (G) in high fat mice during the chronic treatment with 26RFa (red) or the vehicle (black) ($n=8$). **(H)** Fat mass/body weight ratio measured after a 28 day chronic treatment with 26RFa (red) or the vehicle (black) ($n=7-8$ /group). Values represent the mean \pm SEM. ***, $p<0.001$; ****, $p<0.0001$ compared to mice injected with the vehicle.

difference between the two groups (Fig. 4C). ITT showed that insulin tolerance was not significantly altered in 26RFa-injected mice (Fig. 4D). An OGTT revealed that the glycemic profile following the oral glucose load was not impaired in 26RFa-treated mice *vs* mice receiving Hepes (Fig. 4E). Finally, a Q-PCR experiment indicated that hypothalamic expression of the 26RFa receptor was not impaired by the chronic treatment with its ligand (Fig. 4F).

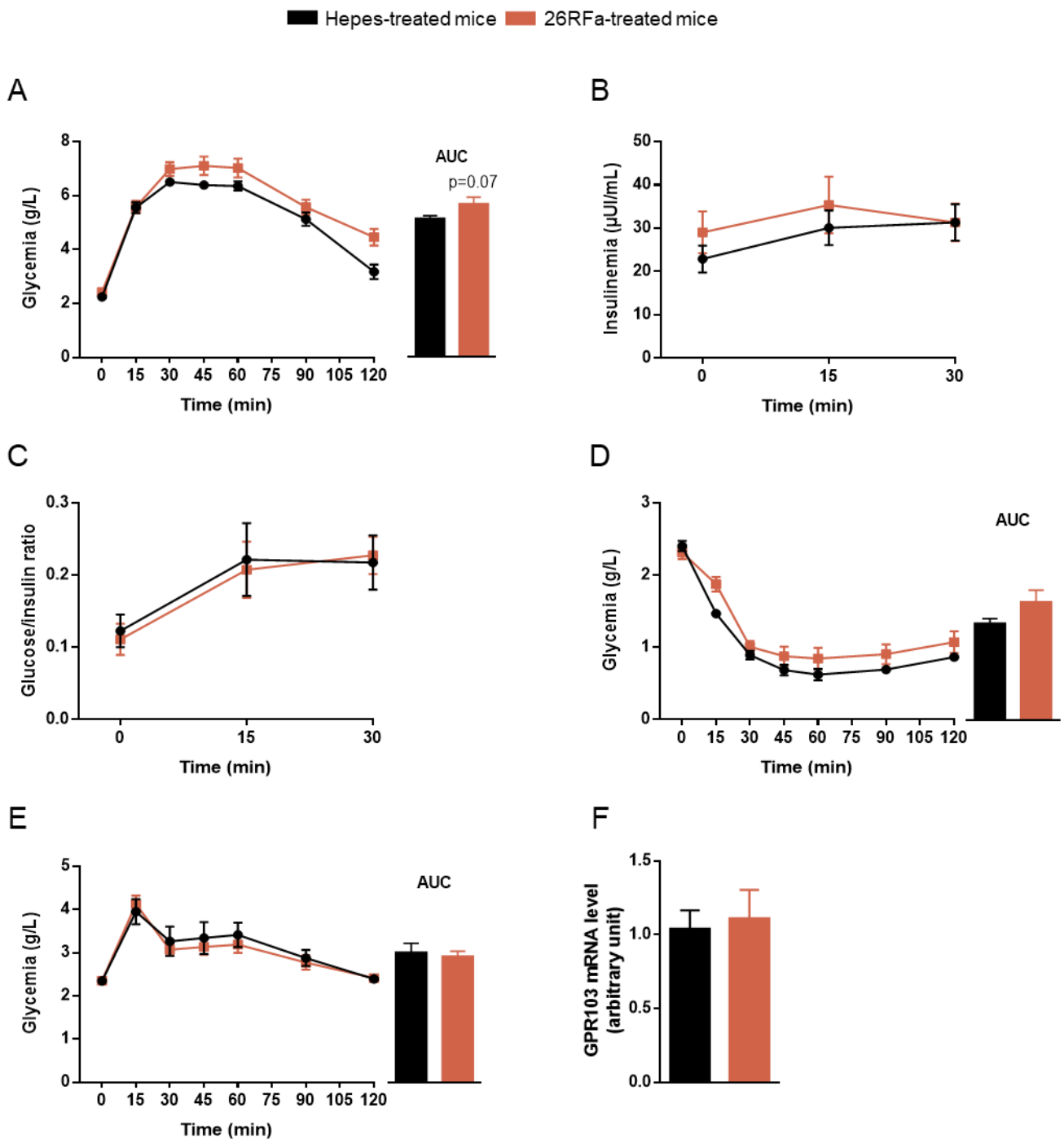


Figure 4. Effects of chronic i.c.v. administration of 26RFa on the glucose homeostasis of the obese/diabetic mice. **(A)** i.p. glucose tolerance test performed the last week of the chronic administration of 26RFa (red) or the vehicle (black) (n=7-9/group). **(B)** Acute glucose-stimulated insulin secretion test performed the last week of the chronic administration of 26RFa (red) or the vehicle (black) (n=7-9/group). **(C)** Glucose/insulin ratio measured during the first phase of the IPGTT in (A). **(D)** Insulin tolerance test performed the last week of the chronic administration of 26RFa (red) or the vehicle (black) (n=7-9/group). **(E)** Oral glucose tolerance test performed the last week of the chronic administration of 26RFa (red) or the vehicle (black) (n=7-9/group). **(F)** Hypothalamic expression of GPR103 mRNA measured the last week of the chronic administration of 26RFa (red) or the vehicle (black) (n=7-9/group). Values represent the mean \pm SEM.

Discussion/Conclusion

During the last decade, a number of studies revealed that the 26RFa/GPR103 neuropeptidergic system is a key player in the regulation of energy and glucose metabolism. Indeed, 26RFa produced by neurons of the hypothalamus regulates feeding behavior, and at the periphery, the neuropeptide produced by the gut and the pancreatic islets regulates glucose homeostasis by acting as an incretin [14, 22, 27]. However in obese/diabetic mice, the anti-hyperglycemic effect of 26RFa is significantly blunted due, at least in part, to a decreased expression of its receptor (GPR103) both in beta cells and in insulin target tissues such as the adipose tissue and the muscles [25]. More recently, we found that the 26RFa neuronal system of the hypothalamus was also able to promote Glucose-Stimulated Insulin Secretion (GSIS) and could be considered as a mediator for central insulin effects on glucose tolerance [26]. With regard to these recent data, we thought important to evaluate the central effect of the 26RFa on glucose metabolism in a diabetogenic context.

In the present study, we show for the first time that an acute central administration of 26RFa in HF mice is still able to attenuate glucose-induced hyperglycemia by enhancing GSIS. This favorable central effect of 26RFa on insulin secretion in this hyperglycemic model is therefore preserved and very similar in terms of amplitude and kinetic to that observed in euglycemic mice [26]. The dose we used for the acute i.c.v. administration of 26RFa (3 μ g) is very low compared to that used for peripheral administration in our previous works and does not alter glucose tolerance when administered i.p [22]. It is thus unlikely that the effects of 26RFa after an i.c.v. administration could be due to an infusion of the neuropeptide to the systemic circulation.

We also show that the obese/diabetogenic status of the mice does not impair the hypothalamic expression of 26RFa and GPR103, contrasting to what we observed at the periphery [25]. Supporting this observation, we also found that the expression of the 26RFa

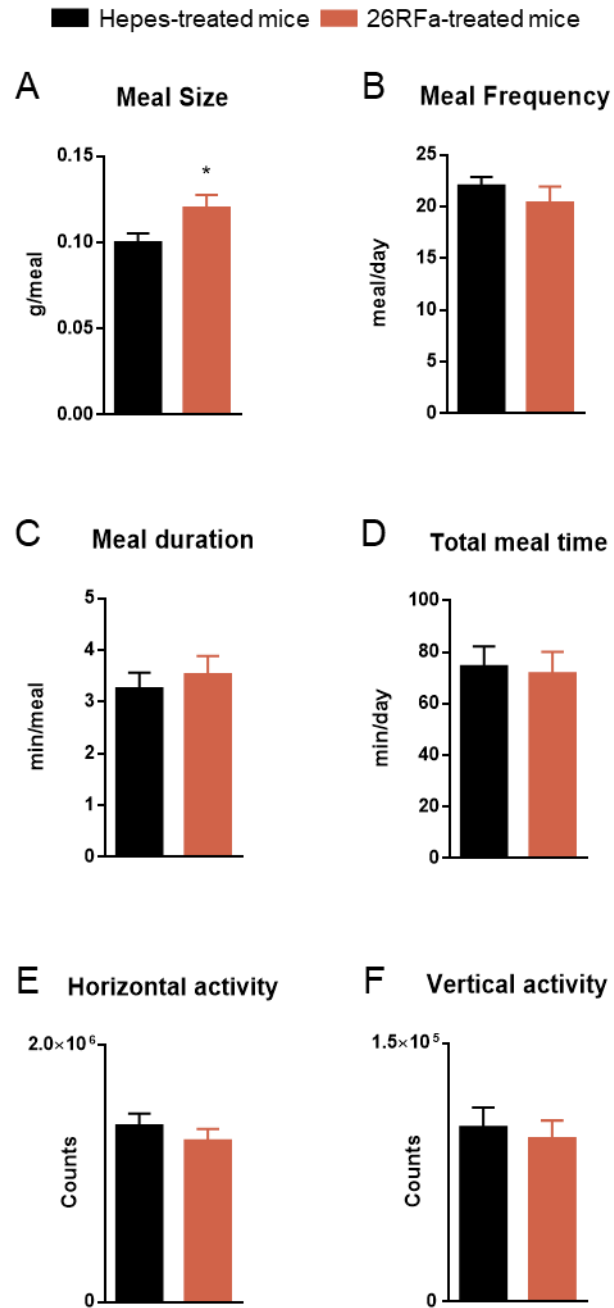


Figure S1. Effects of chronic i.c.v. administration of 26RFa on various metabolic parameters of the obese/diabetic mice. Measurement of meal size (A), meal frequency (B), meal duration (C), total meal size (D), and horizontal (E) and vertical (F) locomotor activity in high fat mice during the chronic treatment with 26RFa (red) or the vehicle (black) (n=8/group). Values represent the mean ± SEM.

and GPR103 in the neuronal hypothalamic cell line mhypoA-59 is not altered under lipotoxic culture condition. It thus appears that the hypothalamic 26RFa/GPR103 system is protected from high fat-induced defects and allows to maintain the anti-hyperglycemic effect of 26RFa whereas the same peptidergic system is profoundly altered at the periphery, resulting in a loss of the incretin effect during of 26RFa.

However, we observed that, in these HF mice, central insulin administration was not able to promote 26RFa hypothalamic expression whereas we previously found that, in euglycemic mice, brain insulin induced hypothalamic 26RFa expression and secretion during a glucose load [26]. In the same study, we also promoted the evidence that the 26RFa/GPR103 neuronal system mediates the central anti-hyperglycemic effect of insulin [26]. Altogether these observations support the idea that the inability of insulin to trigger the 26RFa/GPR103 system in hyperglycemic condition is an additional consequence of the well-known central insulin resistance observed in obesity/diabetes, and probably participates to the glucose intolerance developed by the HF mice.

In addition, while the HFD does not impair the hypothalamic 26RFA/GPR103 system, our data reveal that the age influences the expression of this peptidergic system. Indeed, plasma 26RFa as well as hypothalamic expression of GPR103 and 26RFa are up regulated over time in our protocol both in normal and HFD mice. To our knowledge, it is the first time that evolution of the 26RFa peptidergic system is described over time. By contrast, previous studies reported stable or decreasing hypothalamic expression of other neuropeptides regulating energy metabolism such as NPY or AgRP over time, but the experimental conditions were different with extreme age analysis or long fasting period [28, 29]. Because of the limited length of our analysis, we speculate the observed up-regulation of the 26RFa/GPR103 system may correspond to a maturation of this neuropeptidergic system rather than a sign of ageing. However, further studies with extreme age analyses are warranted to confirm this hypothesis.

Table 2 Measurement of metabolic parameters in high fat mice chronically treated or not with 26RFa

	Hepes-treated mice	26RFa-treated mice	p.value
GLU (g/l)	2,44 ± 0,10	2,54 ± 0,10	0,51
INS (µUI/mL)	21,54 ± 2,79	29,08 ± 4,81	0,22
CHOL (g/L)	1,53 ± 0,07	1,57 ± 0,07	0,79
TRIG (g/L)	0,87 ± 0,05	0,93 ± 0,04	0,46
ALT (U/L)	48 ± 7	58 ± 7	0,39
AST (U/L)	171 ± 18	189 ± 16	0,57
ALKP (U/L)	40 ± 1	40 ± 3	0,90
LIPA (U/L)	555 ± 20	549 ± 13	0,68

GLU, glucose; INS, Insulin; CHOL, Cholesterol; TRIG, Triglycerides; ALT, Alanine Aminotransferase; AST, Aspartate Aminotransferase; ALKP, Alkaline Phosphatase; LIPA, Lipase.

Given the beneficial effects of acute administration of 26RFa on glucose metabolism in HF mice, it was tempting to evaluate the impact of chronic administration of the peptide on metabolic parameters in an obese/hyperglycemic pathophysiological context. By using osmotic minipumps, 26RFa was chronically administered i.c.v. for 28 days and the stability of the peptide was checked all along the protocol by coupling HPLC analysis with mass spectrometry detection (data not shown). In 26RFa-treated mice, a significant increase of the body weight was observed during the experimental protocol that was accompanied with an enhanced food intake and a slight decrease of energy expenditure. Despite this increase of body weight, fasting blood glucose levels of the 26RFa-treated mice were not significantly different as compared to mice that did not receive the peptide. In addition, fasting insulinemia tended to be higher all along the protocol in the 26RFa-treated mice. However, the IPGTT and ITT tests revealed a slightly more pronounced glucose intolerance in 26RFa-treated mice, whereas GSIS was not improved, in contrast to what we observed after an acute administration of 26RFa. Considering the weight gain, our data are in agreement with previous results observed with the elongated form of 26RFa, 43RFa [19]. Indeed, this study reports that central chronic infusion of 43RFa for 13 days is associated with a significant increase of body weight and fat mass. Similarly to what we found, in this study, food intake was enhanced and energy expenditure was decreased because of a reduction of thermogenesis [19]. Considering the metabolic parameters, our results are not consistent with those of Moriya et al. [19], as these authors report higher fasting glucose levels as well as insulinemia in 43RFa-treated mice. However, no data concerning insulin sensitivity or GSIS was available in this study. Supporting our findings, a previous study reports that acute administration of another incretin, GLP-1, enhances GSIS whereas a three day icv infusion of the peptide does not affect insulin secretion stimulation [30].

Altogether, these observations indicate that central chronic infusion of 26RFa or 43RFa stimulates appetite, leading to a significant increase of body weight and adiposity. In addition, the two peptides are able to promote fasting insulin secretion that may also represent a major determinant for adiposity. Our results also suggest that fasting hyperinsulinemia results from a direct effect of the peptide on insulin secretion rather than from an indirect effect simply due to the insulin resistance caused by 26RFa-induced adiposity. Indeed, we did not find any significant difference in insulin sensitivity during ITT between the 26RFa-treated mice and the control group. Nevertheless, it appears that, in the context of chronic central infusion of 26RFa in HF mice, the sustained orexigenic activity of the neuropeptide system leading to a significant weight gain exceeds the expected benefits of the peptide on glucose metabolism which is altered, especially considering the GSIS results. A decrease of GPR103 activity may be discarded as hypothalamic expression of the 26RFa receptor is not impaired in 26RFa-treated mice. However, further studies are warranted to understand whether the attenuation of the GSIS associated with chronic 26RFa treatment is linked to a central dysfunction of the 26RFa pathway rather than a beta cell failure. An alternative explanation, which has been suggested for GLP-1, would be that brain 26RFa might be specifically involved in the short term regulation of glucose metabolism (especially post prandial) whereas its effects on the long term control of glucose homeostasis would be mainly related to changes in body weight [30].

In conclusion, the present study provide the first evidence that in obese/diabetic condition, the 26RFa/GPR103 neuropeptidergic system is not altered in the hypothalamus, in contrast to the periphery. Indeed, the beneficial effect of 26RFa on glucose homeostasis, by potentiating GSIS, is preserved in HF mice. However, chronic central administration of the neuropeptide is unable to balance glycemia in these pathophysiological conditions, suggesting that the hypothalamic 26RFa/GPR103 neuropeptidergic system mainly affects short term regulation of glucose metabolism.

Conflict of Interest Statement

The authors have no competing interests to declare.

Funding Sources

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) (grant number : U1239), the University of Rouen, the Institute for Research and Innovation in Biomedecine (IRIB) (recurrent funding), the “Fondation pour la Recherche Médicale” (grant number: DEA 20140629966), the “Société Francophone du Diabète” (grant number: R16038EE). The present study was also co-funded by European Union and Normandie Regional Council. Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Fund (ERDF).

Author Contributions

MA.LS., N.C., A.A. and G.P. contributed to the study design and interpretation, and wrote the manuscript. MA.LS. S.T., A.A., J.M. M.D., JL.DO and JC.DO. performed the in vivo experiments on mice. MA.LS., J.R., H.B. and M.D. contributed to the PCR experiments. A. B. and E. N. performed the insulin assays. B.L. and J. L. produced synthetic 26RFa. J.L., M.P. and Y. A. revised and approved the final version of the manuscript. N.C. and G.P. are the guarantors of this work and, as such, had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Data Availability Statement

All data relevant to the study are included in the article or uploaded as supplementary information.

References

1. Schwartz MW, Seeley RJ, Tschöp MH, Woods SC, Morton GJ, Myers MG, et al. Cooperation between brain and islet in glucose homeostasis and diabetes. *Nature*. 2013; 503(7474):59-66.
2. Pozo M, Claret M. Hypothalamic Control of Systemic Glucose Homeostasis: The Pancreas Connection. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;29(8):581-594.
3. Rosario W, Singh I, Wautlet A, Patterson C, Flak J, Becker TC, et al. The Brain-to-Pancreatic Islet Neuronal Map Reveals Differential Glucose Regulation From Distinct Hypothalamic Regions. *Diabetes*. 2016;65(9):2711-23.
4. Thorens B. Central control of glucose homeostasis: the brain--endocrine pancreas axis. *Diabetes Metab*. 2010;36 Suppl 3:S45-9.
5. Shimazu T, Fukuda A, Ban T. Reciprocal influences of the ventromedial and lateral hypothalamic nuclei on blood glucose level and liver glycogen content. *Nature*. 1966;210(5041):1178-9.
6. Meek TH, Nelson JT, Matsen ME, Dorfman MD, Guyenet SJ, Damian V, et al. Functional identification of a neurocircuit regulating blood glucose. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(14):E2073-82.
7. Steculorum SM, Ruud J, Karakasilioti I, Backes H, Engström Ruud L, Timper K, et al. AgRP Neurons Control Systemic Insulin Sensitivity via Myostatin Expression in Brown Adipose Tissue. *Cell*. 2016;165(1):125-138.
8. Fujikawa T, Berglund ED, Patel VR, Ramadori G, Vianna CR, Vong L, et al. Leptin engages a hypothalamic neurocircuitry to permit survival in the absence of insulin. *Cell Metab*. 2013;18(3):431-44.

9. Scarlett JM, Rojas JM, Matsen ME, Kaiyala KJ, Stefanovski D, Bergman RN, et al. Central injection of fibroblast growth factor 1 induces sustained remission of diabetic hyperglycemia in rodents. *Nat Med.* 2016;22(7):800-806.
10. Scarlett JM, Muta K, Brown JM, Rojas JM, Matsen ME, Acharya NK, et al. Peripheral Mechanisms Mediating the Sustained Antidiabetic Action of FGF1 in the Brain. *Diabetes.* 2019;68(3):654-664.
11. Chartrel N, Dujardin C, Anouar Y, Leprince J, Decker A, Clerens S, et al. Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(25):15247-52.
12. Fukusumi S, Yoshida H, Fujii R, Maruyama M, Komatsu H, Habata Y, et al. A new peptidic ligand and its receptor regulating adrenal function in rats. *J Biol Chem.* 2003;278(47):46387-95.
13. Jiang Y, Luo L, Gustafson EL, Yadav D, Lavery M, Murgolo N, et al. Identification and characterization of a novel RF-amide peptide ligand for orphan G-protein-coupled receptor SP9155. *J Biol Chem.* 2003;278(30):27652-7.
14. Chartrel N, Alonzeau J, Alexandre D, Jeandel L, Alvear-Perez R, Leprince J, et al. The RFamide neuropeptide 26RFa and its role in the control of neuroendocrine functions. *Front Neuroendocrinol.* 2011;32(4):387-97.
15. Takayasu S, Sakurai T, Iwasaki S, Teranishi H, Yamanaka A, Williams SC, et al. A neuropeptide ligand of the G protein-coupled receptor GPR103 regulates feeding, behavioral arousal, and blood pressure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(19):7438-43.
16. Leprince J, Bagnol D, Bureau R, Fukusumi S, Granata R, Hinuma S, et al. The Arg-Phe-amide peptide 26RFa/glutamine RF-amide peptide and its receptor: IUPHAR Review 24. *Br J Pharmacol.* 2017;174(20):3573-3607.

17. Bruzzone F, Lectez B, Tollemer H, Leprince J, Dujardin C, Rachidi W, et al. Anatomical distribution and biochemical characterization of the novel RFamide peptide 26RFa in the human hypothalamus and spinal cord. *J Neurochem.* 2006;99(2):616-27.
18. Bruzzone F, Lectez B, Alexandre D, Jégou S, Mounien L, Tollemer H, et al. Distribution of 26RFa binding sites and GPR103 mRNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol.* 2007;503(4):573-91.
19. Moriya R, Sano H, Umeda T, Ito M, Takahashi Y, Matsuda M, et al. RFamide peptide QRFP43 causes obesity with hyperphagia and reduced thermogenesis in mice. *Endocrinology.* 2006;147(6):2916-22.
20. Lectez B, Jeandel L, El-Yamani FZ, Arthaud S, Alexandre D, Mardargent A, et al. The orexigenic activity of the hypothalamic neuropeptide 26RFa is mediated by the neuropeptide Y and proopiomelanocortin neurons of the arcuate nucleus. *Endocrinology.* 2009;150(5):2342-50.
21. Granata R, Settanni F, Trovato L, Gallo D, Gesmundo I, Nano R, et al. RFamide peptides 43RFa and 26RFa both promote survival of pancreatic β -cells and human pancreatic islets but exert opposite effects on insulin secretion. *Diabetes.* 2014;63(7):2380-93.
22. Prévost G, Jeandel L, Arabo A, Coëffier M, El Ouahli M, Picot M, et al. Hypothalamic Neuropeptide 26RFa Acts as an Incretin to Regulate Glucose Homeostasis. *Diabetes.* 2015;64(8):2805-16.
23. Prévost G, Picot M, Le Solliec MA, Arabo A, Berrahmoune H, El Mehdi M, et al. The neuropeptide 26RFa in the human gut and pancreas: potential involvement in glucose homeostasis. *Endocr Connect.* 2019;8(7):941-951.
24. El-Mehdi M, Takhlidjt S, Khlar F, Prévost G, do Rego JL, do Rego JC, et al. Glucose homeostasis is impaired in mice deficient in the neuropeptide 26RFa (QRFP). *BMJ Open Diabetes Res Care.* 2020;8(1):e000942.

25. Prévost G, Arabo A, Le Solliec MA, Bons J, Picot M, Maucotel J, et al. Neuropeptide 26RFa (QRFP) is a key regulator of glucose homeostasis and its activity is markedly altered in obese/hyperglycemic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2019;317(1):E147-E157.
26. El Mehdi M, Takhlidjt S, Devère M, Arabo A, Le Solliec MA, Maucotel, et al. Identification of a discrete neuronal circuit that relays insulin signaling into the brain to regulate glucose homeostasis. 2021; Preprint. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.09.13.460055>
27. Chartrel N, Picot M, El Medhi M, Arabo A, Berrahmoune H, Alexandre D, et al. The Neuropeptide 26RFa (QRFP) and Its Role in the Regulation of Energy Homeostasis: A Mini-Review. *Front Neurosci.* 2016;10:549.
28. Gruenewald DA, Marck BT, Matsumoto AM. Fasting-induced increases in food intake and neuropeptide Y gene expression are attenuated in aging male brown Norway rats. *Endocrinology.* 1996;137(10):4460-7.
29. Kaneda T, Makino S, Nishiyama M, Asaba K, Hashimoto K. Differential neuropeptide responses to starvation with ageing. *J Neuroendocrinol.* 2001;13(12):1066-75.
30. Tudurí E, Beiroa D, Porteiro B, López M, Diéguez C, Nogueiras R. Acute but not chronic activation of brain glucagon-like peptide-1 receptors enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Diabetes Obes Metab.* 2015;17(8):789-99.

DISCUSSION GENERALE

L'obésité et le diabète de type 2 connaissent une augmentation préoccupante au cours de ces trente dernières années. Face à ce constat, et grâce à une recherche intensive, les connaissances de la physiopathologie du DT2 et de l'obésité se sont considérablement enrichies. Comme le souligne DeFronzo en 2009, il est important de reconsidérer la physiopathologie du DT2 (DeFronzo 2009). Alors que celle-ci était jusqu'alors centrée sur 3 protagonistes (la production hépatique de glucose, la captation de glucose par le muscle et la cellule β pancréatique), des données récentes ont permis de déterminer au moins 8 acteurs dans le DT2 dont le rein, le tissu adipeux, les incrétines et le système nerveux central. Ce dernier, comme le souligne l'auteur « constitue peut-être le plus important des acteurs impliqués dans la physiopathologie du diabète de type 2 » (Traduit de l'anglais (DeFronzo 2009)). Ainsi, depuis une dizaine d'années, de nombreuses études supportent l'idée d'une l'implication du système nerveux central et des neuropeptides dans la régulation de la glycémie (Roh *et al.* 2016). L'élargissement de la compréhension de la physiopathologie du DT2 a favorisé le développement de nouvelles thérapeutiques dont les traitements peptidiques. En effet, les analogues des incrétines occupent aujourd'hui une place déterminante dans les algorithmes thérapeutiques du DT2, de nombreuses études rapportent des effets bénéfiques des analogues du GLP-1 et plus récemment encore des co-agonistes GLP-1/GIP sur l'homéostasie glucidique (Hope *et al.* 2021; Rosenstock *et al.* 2021; Wilding *et al.* 2021).

Le 26RFa, peptide récemment décrit comme insulino-trope par une action à la fois périphérique et centrale, s'inscrit alors parfaitement dans le contexte de recherche actuelle et apparaît comme une cible potentielle dans le traitement du DT2 cependant jusqu'alors, aucune étude n'avait encore évalué précisément le système 26RFa/GPR103 dans ce contexte physiopathologique.

1. Caractérisation de l'effet du 26RFa endogène par l'utilisation d'un antagoniste du GPR103

Une première étude réalisée au sein de notre laboratoire a caractérisé les effets d'une injection périphérique de 26RFa dans la régulation de la glycémie. Le 26RFa exerce un effet anti-hyperglycémiant qui est associé à une augmentation de la sécrétion d'insuline ainsi qu'une augmentation de la sensibilité à l'insuline (Prévost *et al.* 2015). Le peptide, sécrété par le duodénum

après une charge orale en glucose, active directement son récepteur pancréatique afin de stimuler la sécrétion d'insuline. En conséquence, le 26RFa est considéré comme une nouvelle incrétine. Cependant, cette première étude n'a pas quantifié l'effet incrétine et insulino-sensibilisateur du 26RFa endogène.

Dans cet objectif, nous avons utilisé un antagoniste du GPR103 afin de compléter ces résultats. L'antagoniste utilisé nommé 25e fourni par le laboratoire AstraZeneca a été développé en 2014 (Georgsson *et al.* 2014). Celui-ci permet d'inhiber la signalisation du GPR103 humain et celle du GPR103A/B murin par une inhibition compétitive avec les ligands endogènes (26RFa/43RFa). L'injection périphérique de cet antagoniste chez la souris diminue significativement et de façon dose-dépendante la prise alimentaire (Georgsson *et al.* 2014). Dans notre étude, l'inhibition du 26RFa endogène par l'antagoniste 25e induit une augmentation significative de l'hyperglycémie au cours d'une charge orale en glucose. Cet effet hyperglycémiant de l'antagoniste du GPR103 est expliqué par une augmentation de l'insulino-résistance responsable de l'hyperinsulinisme observé mais qui semble toutefois limité puisque celui-ci n'est pas suffisant pour maintenir une tolérance au glucose comparable à celle observée chez les souris traitées par PBS. Ces résultats confortent les données précédemment obtenues avec le 26RFa et confirment l'effet double du peptide sur la sécrétion d'insuline d'une part et sur l'insulino-sensibilité d'autre part.

En outre, toujours en complément des résultats de notre première étude de 2015, nous avons montré que l'injection ip de 26RFa au cours d'une charge orale en glucose induit un effet anti-hyperglycémiant sans toutefois augmenter significativement la sécrétion d'insuline. Ces résultats suggèrent que les effets du 26RFa endogène, sécrété par l'intestin au cours d'une charge orale en glucose, peuvent être amplifiés par l'administration exogène du peptide via une augmentation de la sensibilité à l'insuline et non par une stimulation potentialisée du 26RFa exogène et endogène sur la cellule β .

Au total, ces résultats complémentaires obtenus chez la souris normo-pondérale confirment et caractérisent les effets du 26RFa endogène. Le système 26RFa/GPR103 fait partie intégrante du système gluco-régulateur et la perte de son effet (via l'antagoniste 25e) induit un dysfonctionnement de l'homéostasie du glucose. Ces observations sont tout à fait concordantes avec les résultats obtenus récemment chez les souris invalidées pour le gène du 26RFa. En effet, ces souris se caractérisent par une intolérance au glucose en lien avec une diminution de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (El-Mehdi *et al.* 2020).

Cependant, même si le 26RFa répond à la définition classique d'une incrétine, l'analyse des données publiées sur les souris doublement invalidées pour les récepteurs aux deux incrétines principales GLP-1 et GIP (modèle DIRKO), laissent peu de place pour d'autres incrétines (Hansotia *et al.* 2004; Preitner *et al.* 2004; Ahrén *et al.* 2020). En effet, l'aire sous la courbe de sécrétion d'insuline lors de la charge orale en glucose chez ces souris doublement invalidées est strictement superposable à celle obtenue lors de l'administration intra veineuse du glucose. Cependant, le 26RFa se distingue du GIP et du GLP-1 par sa cinétique de sécrétion. En effet, les résultats obtenus chez la souris et chez l'homme montrent un pic de sécrétion du 26RFa respectivement à 30 et 120 min après la charge au glucose, contrairement à un pic de sécrétion précoce inférieur à 15 min pour le GIP et GLP-1. Aussi, il serait intéressant d'évaluer les tests de charge en glucose sur des périodes prolongées chez les souris doublement invalidées DIRKO pour mieux analyser le rôle possible du 26RFa

2. Les dysfonctionnements du système 26RFa/GPR103 périphérique chez la souris HFD

L'objectif principal de ce travail de thèse était de déterminer les effets du 26RFa dans la régulation de la glycémie chez la souris HFD. Alors que les actions du 26RFa dans la régulation périphérique de la glycémie sont aujourd'hui bien caractérisées, les effets du peptide dans la régulation de la glycémie dans le contexte d'obésité et d'hyperglycémie chronique ne sont pas connus.

2.1. Mise en évidence d'un dysfonctionnement du système 26RFa/GPR103 endogène

L'utilisation d'un antagoniste du GPR103 nous a permis précédemment de démontrer que le 26RFa endogène participait à la régulation de la glycémie par un effet insulino-trope anti-hyperglycémiant et insulino-sensibilisateur. En revanche, chez la souris HFD, nous avons montré que l'injection du 25e durant un test de charge en glucose n'augmente pas significativement l'hyperglycémie. Ainsi, ce premier résultat suggère une perte d'effet du 26RFa endogène dans ce modèle physiopathologique.

Parallèlement, nous avons soumis des souris invalidées pour le gène du 26RFa au régime HFD afin de déterminer les conséquences d'un déficit en 26RFa en condition d'exposition à un régime « pro-diabétogène ». L'ensemble des résultats de cette étude suggère que le déficit en

26RFa n'impacte ni le phénotype obèse ni l'homéostasie du glucose. En effet, ces souris ne présentent pas de modification significative de leur poids corporel, de leur glycémie ou insulinémie à jeun. En outre, au cours des différents tests métaboliques, les souris 26RFa^{-/-} soumises au régime HFD se comportent sur le plan métabolique de façon comparable aux souris 26RFa^{+/+}. De même, la sécrétion d'insuline induite par le glucose n'est pas altérée par le déficit en 26RFa. Au total, dans cette étude, aucune modification phénotypique ou métabolique n'a été constatée chez les souris déficientes en 26RFa soumises au régime HFD. Il convient toutefois de rappeler que ce modèle transgénique génère un déficit constitutif en 26RFa avec en conséquence de possibles mécanismes compensatoires comme cela est décrit dans d'autres modèles transgéniques notamment chez les souris déficientes pour le NPY ou pour la ghréline (Palmiter *et al.* 1998; Sun *et al.* 2003). Des modèles avec un déficit inductible et/ou tissu spécifiques en 26RFa sont en cours d'étude pour s'affranchir de ces potentiels mécanismes compensatoires.

Globalement, l'ensemble de ces résultats suggère que la perte du signal du 26RFa chez la souris HFD, consécutive à l'utilisation d'un antagoniste du peptide ou d'un modèle murin transgénique n'altère pas significativement l'homéostasie du glucose. Ceci soutient alors l'hypothèse d'un dysfonctionnement du système 26RFa/GPR103 chez les souris HFD.

2.2. Perte de l'effet incrétine et insulino-sensibilisateur du 26RFa chez la souris HFD

Confirmant le dysfonctionnement du système peptidergique en situation d'obésité et d'hyperglycémie chronique, nous rapportons que l'effet insulino-trope anti-hyperglycémiant d'une injection périphérique de 26RFa est totalement aboli chez la souris HFD lors d'un test de tolérance au glucose. De plus, l'augmentation de la sensibilité à l'insuline induite par une injection de 26RFa au cours du test de tolérance à l'insuline est fortement atténuée chez la souris HFD. Ainsi, dans ces conditions d'obésité associée au DT2, le 26RFa n'est plus capable ni de stimuler la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques ni de potentialiser les effets de l'insuline, effets que nous avons rapportés comme dans l'étude *princeps* (Prévost *et al.* 2015).

Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus *in vitro* dans une lignée de cellules β pancréatiques humaines cultivées en conditions de lipotoxicité (palmitate) dans lesquelles la sécrétion d'insuline n'est plus stimulée par le 26RFa. Il apparaît alors que les mécanismes de lipotoxicité pourraient expliquer en partie la perte d'effet incrétine du 26RFa dans le modèle de souris HFD. En revanche, les effets du 26RFa sur la captation du glucose par les myocytes et/ou

les adipocytes en condition de lipotoxicité ne sont pas connus. Ainsi, nous ne pouvons conclure à ce stade si la perte de l'effet insulino-sensibilisateur du 26RFa que nous avons observé est lié à une diminution de son action directe sur la captation de glucose et de lipides par le muscle et le tissu adipeux (Mulumba *et al.* 2010; Allerton & Primeaux 2015).

2.3. La diminution de l'expression du GPR103 est potentiellement responsable de la perte de l'effet du 26RFa chez la souris HFD

Pour expliquer la perte d'effet du 26RFa sur la sécrétion et la sensibilité à l'insuline, nous avons émis l'hypothèse qu'un défaut de sécrétion ou de signalisation pouvait altérer l'effet du peptide sur ces tissus cibles.

Tout d'abord, nous avons rapporté que le 26RFa est fortement sécrété par l'intestin lors d'une charge orale en glucose à la fois chez l'Homme et chez la souris normo-pondérale (Prévost *et al.* 2015). Chez la souris obèse et hyperglycémique, les immunomarquages et les RT-qPCR que nous avons effectués en condition basale à jeun, montrent une diminution de l'expression et de la production du 26RFa par le duodénum. En revanche, lors d'une charge orale en glucose, la sécrétion de 26RFa par le duodénum s'élève chez la souris HFD en comparaison avec les souris contrôles. Par conséquent, il est difficile d'envisager un défaut de sécrétion de 26RFa responsable de la perte des effets du 26RFa chez la souris HFD notamment lors des tests en charge en glucose. Ainsi, l'autre hypothèse résidait dans une diminution de la sensibilité au peptide.

Le tissu cible du 26RFa sont nombreux. Nous avons précédemment montré que le 26RFa activait directement le GPR103 présent sur les cellules β pancréatiques afin de stimuler la sécrétion d'insuline (Prévost *et al.* 2015). De plus, deux études ont rapporté que le 26RFa favorisait la captation de glucose et de lipides par le muscle et le tissu adipeux respectivement rendant compte ainsi de l'effet insulino-sensibilisateur du 26RFa (Mulumba *et al.* 2010; Allerton & Primeaux 2015). Les études d'immun marquage et de RT-qPCR que nous avons effectuées chez les souris HFD révèlent une diminution de la production de GPR103 dans les îlots pancréatiques ainsi qu'une diminution de l'expression du GPR103 dans le muscle et le tissu adipeux.

Au total, l'ensemble des résultats de cette étude montrent qu'en condition d'obésité associée à l'hyperglycémie chronique, le 26RFa perd totalement son activité incrétine, son effet insulino-

sensibilisateur est drastiquement diminué. La diminution de la production et de l'expression du GPR103 dans les tissus cibles du 26RFa (pancréas, muscle et tissu adipeux) contribue à la perte des effets du 26RFa périphérique dans la régulation de la glycémie. Ainsi, malgré une augmentation significative de la sécrétion de 26RFa par le duodénum au cours de charge en glucose, le peptide ne peut stimuler sa voie de signalisation et exercer son rôle anti-hyperglycémiant et insulino-sensibilisateur. **Figure 38**

De façon intéressante, ces résultats s'apparentent à ceux observés avec le GIP. En effet, chez les patients diabétiques de type 2, en dépit d'une augmentation de la sécrétion de GIP lors d'une charge orale en glucose (Chia *et al.* 2017), la sécrétion d'insuline n'est plus stimulée par le peptide (Krarup *et al.* 1987; Elahi *et al.* 1994; Kjemis *et al.* 2003; Nauck *et al.* 2021). La diminution de l'expression du récepteur du GIP et de sa voie de signalisation dans les cellules β rendent compte de la perte de l'effet incrétine (Younan & Rashed 2007). Plusieurs études ont démontré que les concentrations élevées de glucose et d'acides gras libres observées au cours de la pathologie contribuent à la perte du signal de GIP ainsi qu'à la diminution de l'expression de son récepteur. A noter qu'un retour aux conditions normo-glycémiques permet une restauration de l'effet insulino-trope du GIP (Piteau *et al.* 2007; Xu *et al.* 2007; Pathak *et al.* 2014). Plusieurs mécanismes liés à l'excès de glucose sont envisagés pour expliquer l'altération du système peptidergique. Tout d'abord, l'excès de glucose conduit à une augmentation de l'ubiquitinylation du récepteur du GIP ce qui favorise sa dégradation (Zhou *et al.* 2007). En outre, la formation de produits finaux de glycation induite par l'hyperglycémie réduit l'action de GIP sur la cellule β (Puddu *et al.* 2015). Enfin, la désensibilisation des récepteurs consécutive aux concentrations élevées de GIP observées à la fois à jeun et lors d'une charge orale en glucose est également décrite pour expliquer la perte de l'effet incrétine du GIP (Tseng *et al.* 1996).

Ainsi à l'instar des mécanismes décrits pour la perte d'effet du GIP dans les situations d'hyperglycémie chronique, des études complémentaires sont indispensables pour préciser les processus de perte d'effet du 26RFa en lien avec la perte d'expression de son récepteur GPR103.

Parallèlement au système 26RFa/GPR103 périphérique que nous venons de décrire en situations physiologique et pathologique, des données récentes du laboratoire ont montré que le 26RFa est aussi impliqué dans la régulation centrale de la glycémie. En effet, une injection icv de 26RFa induit un effet anti-hyperglycémiant et insulino-trope au cours d'une charge en glucose. En outre, une injection icv de l'antagoniste 25e réduit l'effet hypoglycémiant de

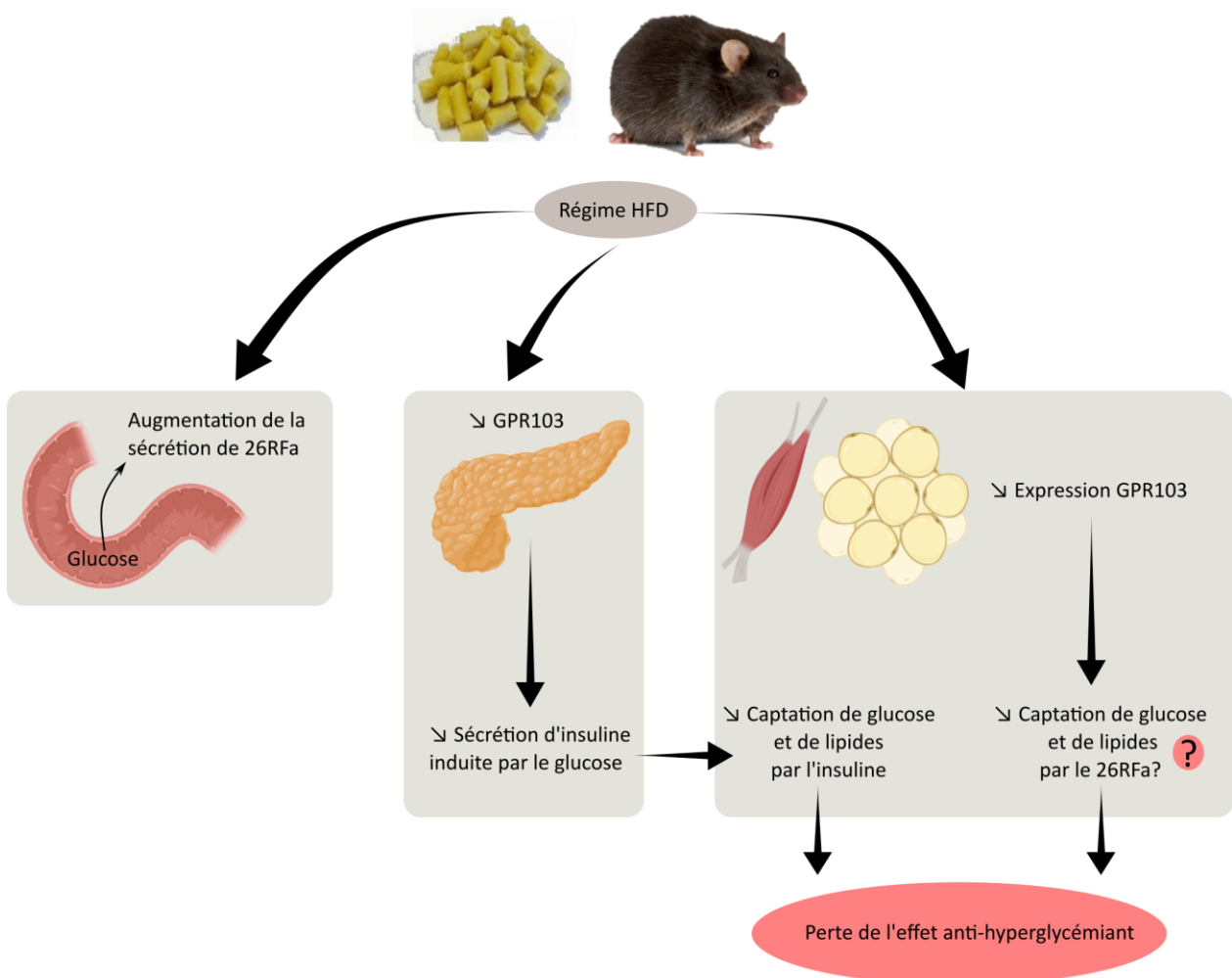


Figure 38. Dysfonctionnement du système 26RFa/GPR103 périphérique chez la souris HFD

Bien que le 26RFa soit hypersécrété par le duodénum après une charge orale en glucose chez la souris HFD, le 26RFa perd totalement son effet incrétine. La diminution de l'expression du GPR103 dans le pancréas empêcherait le 26RFa d'augmenter la sécrétion d'insuline induite par le glucose ce qui, de ce fait, diminue la captation de glucose et de lipides par le muscle et le tissu adipeux. Parallèlement, la diminution de l'expression du GPR103 dans le muscle et le tissu adipeux diminuerait l'action du 26RFa sur la captation de glucose et de lipide. Cependant des études complémentaires sont aujourd'hui nécessaires afin de déterminer les effets du peptide dans ces tissus en condition de lipotoxicité. L'ensemble de ces mécanismes permettrait d'expliquer la perte de l'effet anti-hyperglycémiant observée.

l'insuline centrale, enfin une injection icv d'insuline lors d'une charge en glucose stimule l'expression de 26RFa ainsi que sa sécrétion hypothalamique. L'ensemble de ces résultats suggère que le 26RFa pourrait constituer un relai de l'action centrale de l'insuline (El Mehdi *et al.* 2021). Parallèlement au dysfonctionnement du système 26RFa/GPR103 périphérique que nous avons décrit, il paraissait important de compléter notre travail par l'analyse du système 26RFa/GPR103 central en situation d'exposition au régime HFD.

2.4. Les effets du 26RFa central sur la régulation de la glycémie chez la souris HFD

Comme nous le rapportons dans ce travail, chez la souris HFD, l'injection icv aiguë de 26RFa au cours d'une charge en glucose est associée à un effet anti-hyperglycémiant via un effet insulino-trope du peptide. Ce résultat est similaire à celui observé chez la souris normo-pondérale et normo-glycémique (El Mehdi *et al.* 2021). Il suggère alors que les effets centraux du peptide sont maintenus en situation d'obésité et d'hyperglycémie chronique et contraste avec les résultats obtenus pour le système 26RFa/GPR103 périphérique chez la souris HFD. Cette discordance pourrait trouver son explication dans les niveaux d'expression du récepteur GPR103. En effet, cette dernière est diminuée dans les tissus cibles du 26RFa (tissu adipeux, muscle, cellule β), cependant, l'étude de l'expression hypothalamique du GPR103 que nous avons menée à différents temps d'exposition au régime HFD, n'a pas montré de différence significative comparativement aux souris exposées à un régime standard. Parallèlement, des cellules hypothalamiques mHypoA cultivées en condition de lipotoxicité ne présentent pas de diminution d'expression de GPR103. Globalement, ces premiers résultats suggèrent que le système 26RFa/GPR103 hypothalamique est peu sensible aux conséquences d'un régime HFD contrastant avec les résultats obtenus à la périphérie.

2.5. Effet de l'insulino-résistance centrale sur le 26RFa chez la souris HFD

Des données récentes issues de notre laboratoire indiquent que le 26RFa constitue un relai de l'action centrale de l'insuline (El Mehdi *et al.* 2021). En condition d'obésité associée au DT2, la signalisation centrale de l'insuline est fortement perturbée. En effet, l'activation des voies pro-inflammatoires en réponse à l'excès calorique telles que les voies médiées par NF κ B, JNK et le TLR-4 contribue à une perte du signal insulinique central (Scherer *et al.* 2021). Dans ces conditions, l'insuline est incapable d'activer la voie de signalisation PI3K/AKT et donc d'activer la transcription des gènes cibles de l'insuline.

Dans ce contexte, nous avons déterminé l'effet de l'insuline sur la sécrétion hypothalamique de 26RFa chez la souris HFD. Nous avons tout d'abord montré que les souris obèses présentaient comme attendu une résistance centrale à l'insuline avec perte de l'effet hypoglycémiant au cours d'une charge en glucose. En outre, nous avons observé que, dans ces conditions, l'injection centrale d'insuline lors d'une charge en glucose n'entraîne plus d'effet positif sur l'expression hypothalamique de 26RFa. Ainsi, le rôle de l'activation des voies pro-inflammatoires centrales en conditions d'obésité, potentiellement responsable de la perte d'effet de l'insuline centrale sur le système 26RFa/GPR103, devra faire l'objet d'études complémentaires. **Figure 39**

3. Le 26RFa central : un acteur dans le traitement du diabète de type 2

Le système 26RFa central ne semble donc pas impacté directement par le régime HFD contrairement à ce que nous avons montré à la périphérie. L'effet anti-hyperglycémiant et insulinothéropique central du peptide est préservé chez la souris HFD. Même si l'insuline ne stimule plus la sécrétion hypothalamique de 26RFa des injections aiguës de 26RFa permettent d'outrepasser cette anomalie et d'améliorer l'homéostasie du glucose chez la souris HFD. Au regard de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse qu'un traitement chronique central de 26RFa pourrait améliorer le phénotype obèse et diabétique des souris HFD.

Pour ce faire, nous avons utilisé des mini pompes osmotiques afin de délivrer le 26RFa en continu directement dans le ventricule latéral des souris obèses et diabétiques (10 semaines de régime HFD). Durant les 4 semaines de traitement, nous avons déterminé précisément l'impact du traitement chronique au 26RFa à la fois sur le phénotype obèse des souris mais aussi sur l'homéostasie du glucose.

3.1. Effet du traitement chronique sur l'obésité des souris HFD

Notre étude a permis de mettre en évidence que les souris traitées par le 26RFa présentaient un poids corporel supérieur à celui des souris ayant reçu l'HEPES associé à une augmentation de la masse grasse. Cette différence de poids corporel s'observe dès les premiers jours de traitement et se maintient tout au long de l'étude. Cette augmentation pondérale est associée à une forte augmentation de la prise alimentaire et de la taille des repas. Ces résultats sont

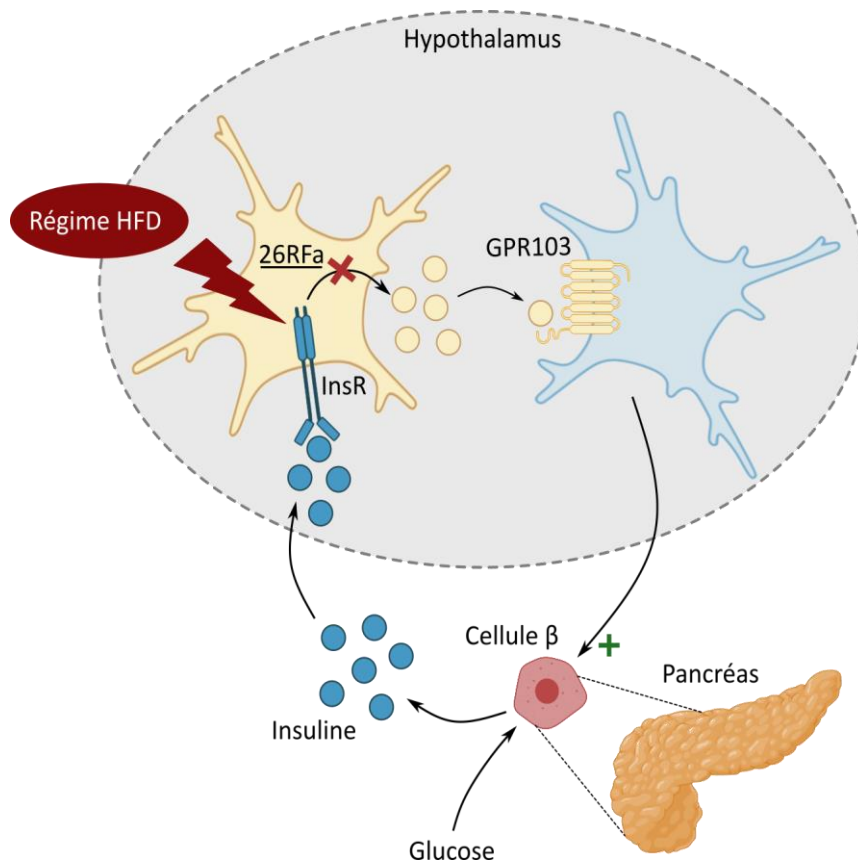


Figure 39. Impact du régime HFD sur le système 26RFa/GPR103 central

Le régime HFD favorise le développement d'une insulino résistance centrale. Dans ce contexte, l'insuline ne stimule plus l'expression de 26RFa par les neurones hypothalamiques lors d'une charge en glucose. En revanche, chez la souris HFD, le 26RFa central est toujours capable d'activer ces cibles hypothalamiques afin de stimuler la sécrétion périphérique d'insuline.

cohérents avec l'effet orexigène du 26RFa précédemment décrit (Chartrel *et al.* 2011) ainsi qu'avec les résultats obtenus lors d'une infusion chronique icv de 43RFa chez la souris HFD (Moriya *et al.* 2006).

Par ailleurs, la dépense énergétique tend à être inférieure chez les souris traitées par le 26RFa ce qui naturellement peut contribuer également à la prise de poids chez les souris. Moriya *et coll* ont rapporté que l'infusion chronique centrale de 43RFa à l'aide de pompes osmotiques durant 14 jours réduisait la thermogénèse de façon indépendante de l'effet orexigène du 43RFa. Ainsi une modification de la thermogénèse ne peut être écartée pour expliquer les résultats que nous avons obtenus. Enfin, la modification de la dépense énergétique que nous avons observée dans notre étude est difficilement attribuable à une diminution de l'activité locomotrice puisque qu'aucune différence n'a été observée entre les souris traitées et les souris contrôles.

3.2. Effet du traitement chronique sur l'homéostasie du glucose

Compte tenu de l'ensemble des résultats concernant l'implication du 26RFa dans la régulation centrale de la glycémie, l'un des objectifs de cette étude était d'évaluer l'impact d'une infusion icv chronique de 26RFa sur l'homéostasie du glucose chez la souris obèse et hyperglycémique. Durant l'ensemble du protocole d'expérimentation, nous avons mesuré itérativement la glycémie ainsi que l'insulinémie à jeun. En dépit d'un poids corporel significativement supérieur chez les souris traitées, celles-ci ne présentent pas de modification significative de la glycémie à jeun. Cependant, ce maintien de la glycémie à jeun se réalise au prix d'une insulinémie plus élevée (bien que non significative) chez les souris traitées 26RFa. Compte tenu de l'étroite relation entre l'obésité et l'insulinémie (Kim *et al.* 2017), nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse que l'augmentation de l'insulinémie relève d'une conséquence indirecte de l'augmentation du poids corporel observée chez les souris traitées. Il faut cependant noter que dans le travail de Moriya, les souris traitées avec le 43RFa présentaient une augmentation similaire de l'insulinémie à 14 jours de traitement et ce malgré une restriction alimentaire imposée pour limiter les conséquences de l'effet orexigène du 43RFa (Moriya *et al.* 2006). Il est donc possible que cette légère augmentation d'insuline soit effectivement liée au 26RFa bien que pas suffisante pour améliorer significativement la glycémie à jeun chez les souris traitées. L'exploration métabolique complète réalisée à l'issue de l'infusion chronique de 4 semaines de 26RFa n'objective pas d'amélioration de l'homéostasie du glucose.

Au total, cette étude montre que les effets centraux du 26RFa observés chez la souris normopondérale sont maintenus chez la souris HFD. Les injections aiguës de 26RFa améliorent la tolérance au glucose en stimulant la sécrétion d'insuline. En revanche, l'administration chronique icv de 26RFa ne permet pas d'améliorer significativement le phénotype obèse et hyperglycémique des souris HFD. Le rôle du 26RFa pourrait s'inscrire plutôt dans les processus de régulation de la glycémie à court terme en opposition à l'absence d'effet sur la régulation sur le long court. Des résultats similaires sont décrits pour le GLP-1. Des injections aiguës icv de GLP-1 augmentent la sécrétion d'insuline cependant l'administration centrale chronique de GLP-1 ne permet pas d'améliorer l'homéostasie du glucose (Tudurí *et al.* 2015).

Dans notre étude, l'effet orexigène du 26RFa semble prépondérant, provoque une prise de poids chez les souris traitées qui pourrait masquer les potentiels effets bénéfiques du peptide sur l'homéostasie du glucose. Pour s'affranchir de cet effet orexigène du 26RFa, il faudrait envisager un groupe *per fed* avec une restriction alimentaire imposée pour les souris traitées par le 26RFa pour maintenir des poids identiques entre les groupes traités et contrôles. Cette étude permettrait de séparer les effets relevant de l'activité orexigène du 26RFa des effets purement glycémiques.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'ensemble de ces travaux de thèse a permis de mieux caractériser le fonctionnement du système 26RFa/GPR103 dans les conditions d'obésité associée à l'hyperglycémie chronique. Il apparaît alors que le système 26RFa/GPR103 peut se concevoir en deux systèmes distincts : le système périphérique et le système central.

Tout d'abord, on peut concevoir un système 26RFa/GPR103 périphérique dont les effets anti-hyperglycémiant, insulino-trope et insulino-sensibilisateur sont totalement abolis en condition d'obésité et d'hyperglycémie chronique chez la souris HFD. D'autre part, on pourrait individualiser le système 26RFa/GPR103 central où l'effet anti-hyperglycémiant et insulino-trope des injections aiguës de 26RFa est maintenu. En fin de compte, les effets centraux du 26RFa semblent préservés des conséquences délétères du régime HFD là où les effets périphériques semblent être directement abolis par la lipotoxicité induite par le régime.

La description des possibles liens entre la périphérie et le central ouvre de larges perspectives d'étude. Ainsi, des résultats préliminaires obtenus dans notre équipe suggèrent que le 26RFa ne traverse pas la BHE. L'étude réalisée à l'aide de 26RFa couplé à un fluorochrome chez la souris normo-pondérale pourra être complétée par l'utilisation de 26RFa radiomarqué. La caractérisation du passage, ou non, du 26RFa au travers de la BHE constitue un élément clé de compréhension de la physiologie du peptide. De plus, de nombreuses études suggèrent que la fonction et la structure de la BHE sont altérées en condition de lipotoxicité et de glucotoxicité (Van Dyken & Lacoste 2018). Il conviendra alors de déterminer le passage du 26RFa à la fois chez la souris contrôle et chez la souris HFD. Par ailleurs, toujours dans la perspective de décrire les liens entre le système périphérique et central, des études de vagotomie permettraient de déterminer si le 26RFa sécrété par l'intestin active le système nerveux entérique et/ou hépatoportal **Figure 40**. Ces protocoles d'expérimentation pourraient théoriquement répondre à ces questions qui sont sans réponse aujourd'hui :

- Le 26RFa sécrété à la périphérie par le duodénum après une charge orale en glucose est-il capable de rejoindre le compartiment central pour activer des cibles hypothalamiques ?
- Le 26RFa est-il capable d'activer le système nerveux entérique ou hépatoportal afin de transmettre des informations sur l'état énergétique de l'organisme à l'instar du GIP et le GLP-1 ?

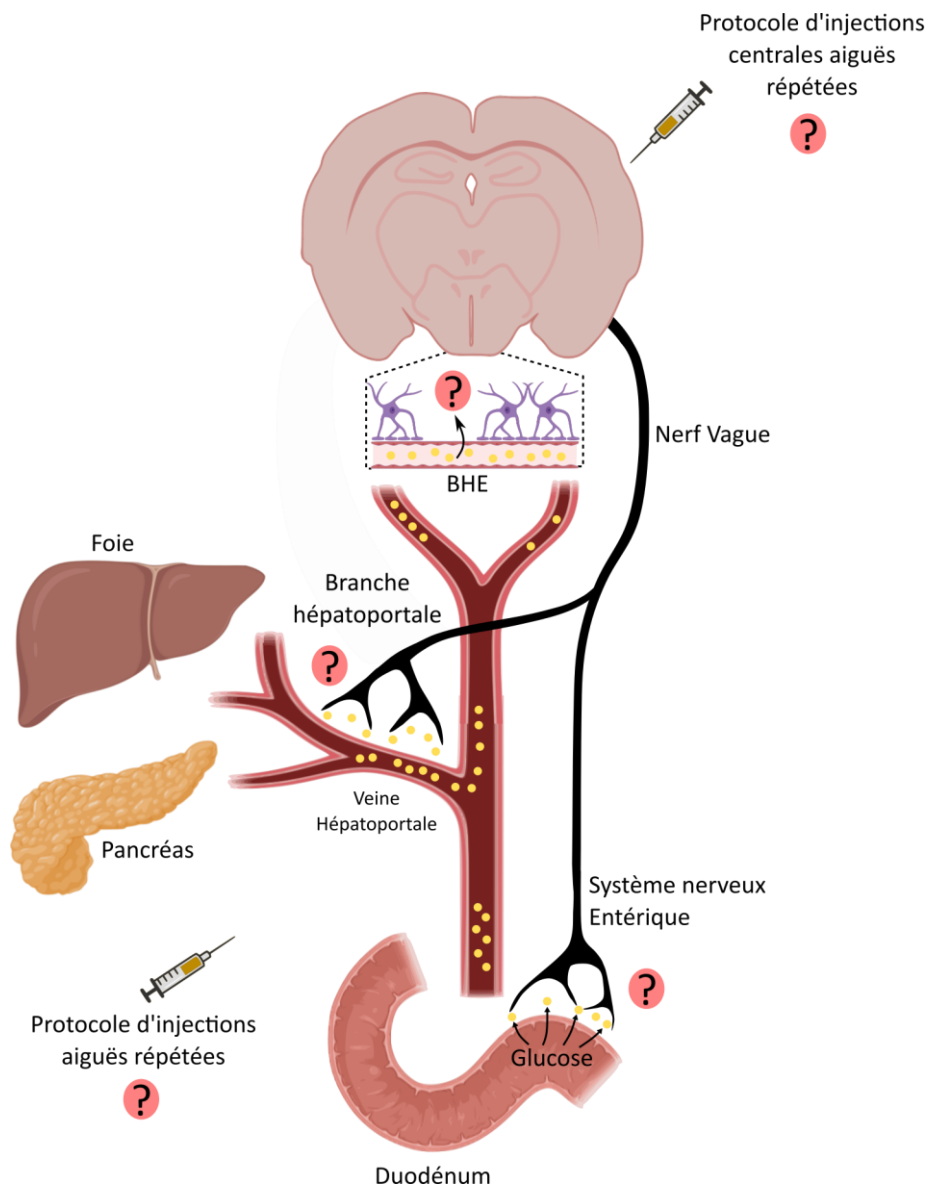


Figure 40. Perspectives de recherche

- Comment cette communication, si elle existe, s'effectue en condition d'obésité et d'hyperglycémie chronique ?

Finalement, pouvons-nous envisager le 26RFa en tant que cible potentielle dans le traitement du DT2 ?

La première étude que nous avons réalisée a caractérisé un dysfonctionnement du système 26RFa/GPR103 périphérique chez la souris HFD. A noter que nous avons testé l'effet d'une injection aiguë et non chronique ou séquentielle et dans un modèle déjà avancé d'obésité et d'hyperglycémie. Un protocole expérimental avec injections répétées de 26RFa peut être envisagé au cours de l'induction du phénotype, c'est-à-dire durant les toutes premières semaines de régime afin d'évaluer un éventuel effet préventif du 26RFa sur les dysfonctionnements de la régulation de la glycémie observés chez les souris HFD.

La seconde étude que nous avons effectuée avec l'infusion centrale du peptide a confirmé l'effet orexigène responsable d'une prise de poids. Afin de mieux comprendre les effets d'un tel traitement sur le métabolisme du glucose, il apparaît nécessaire d'envisager un protocole d'étude avec un groupe *per fed*. Outre l'intérêt de ce groupe pour l'étude du métabolisme glucidique, il permettrait également de mieux décrire le rôle du traitement par 26RFa sur la lipogenèse.

Enfin, cette étude a suggéré que la 26RFa semble plus particulièrement impliqué dans la régulation à court terme de la glycémie. Parallèlement, la sécrétion de 26RFa n'est pas continue mais rythmée par la prise alimentaire et les périodes de jeûne. Ainsi, le 26RFa est fortement sécrété par l'intestin après une charge orale en glucose (Prévoist *et al.* 2015), et l'expression hypothalamique est augmentée après un jeûne prolongé (Takayasu *et al.* 2006). Dans ce contexte, l'injection continue de 26RFa ne correspond probablement pas à la physiologie du peptide et des injections aiguës mais répétées mériteraient d'être testées.

Pour compléter les études que nous avons menées, nous projetons d'évaluer le système 26RFa au cours des traitements par des analogues du GLP-1 et/ou des doubles-agonistes GLP1/GIP à la fois chez le rongeur mais aussi chez les patients traités via un dosage sérique EIA que nous venons de mettre au point.

Pour conclure, le champ d'investigations du ^{26}Rf a reste encore extrêmement large tant en physiologie que dans les modèles physiopathologiques ; dans les compartiments central et périphérique. Aussi, son utilisation thérapeutique reste évidemment attractive même si elle soulève encore de nombreuses interrogations auxquelles il faudra répondre préalablement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abel, E.D., Peroni, O., Kim, J.K., Kim, Y.B., Boss, O., Hadro, E., Minnemann, T., Shulman, G.I. & Kahn, B.B. (2001). Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*, 409 (6821), 729–733. <https://doi.org/10.1038/35055575>
- Accili, D., Talchai, S.C., Kim-Muller, J.Y., Cinti, F., Ishida, E., Ordelheide, A.M., Kuo, T., Fan, J. & Son, J. (2016). When β -cells fail: lessons from dedifferentiation. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 18 Suppl 1, 117–122. <https://doi.org/10.1111/dom.12723>
- Adachi, A., Shimizu, N., Oomura, Y. & Kobáshi, M. (1984). Convergence of hepatoportal glucose-sensitive afferent signals to glucose-sensitive units within the nucleus of the solitary tract. *Neuroscience Letters*, 46 (2), 215–218. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(84\)90444-0](https://doi.org/10.1016/0304-3940(84)90444-0)
- Adriaenssens, A.E., Gribble, F.M. & Reimann, F. (2020). The glucose-dependent insulinotropic polypeptide signaling axis in the central nervous system. *Peptides*, 125, 170194. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.170194>
- Aguirre, V., Werner, E.D., Giraud, J., Lee, Y.H., Shoelson, S.E. & White, M.F. (2002). Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (2), 1531–1537. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101521200>
- Ahrén, B., Taborsky, G.J. & Porte, D. (1986). Neuropeptidergic versus cholinergic and adrenergic regulation of islet hormone secretion. *Diabetologia*, 29 (12), 827–836. <https://doi.org/10.1007/BF00870137>
- Ahrén, B., Yamada, Y. & Seino, Y. (2020). The Incretin Effect in Female Mice With Double Deletion of GLP-1 and GIP Receptors. *Journal of the Endocrine Society*, 4 (2), bvz036. <https://doi.org/10.1210/jendso/bvz036>
- Allerton, T.D. & Primeaux, S.D. (2015). QRFP-26 enhances insulin's effects on glucose uptake in rat skeletal muscle cells. *Peptides*, 69, 77–79. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.006>
- American Diabetes Association (2017). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*, 40 (Suppl 1), S11–S24. <https://doi.org/10.2337/dc17-S005>
- Anand, B.K., Chhina, G.S., Sharma, K.N., Dua, S. & Singh, B. (1964). Activity of single neurons in the hypothalamic feeding centers: effect of glucose. *The American Journal of Physiology*, 207, 1146–1154. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1964.207.5.1146>
- de Andrade, I.S., Zemdegs, J.C.S., de Souza, A.P., Watanabe, R.L.H., Telles, M.M., Nascimento, C.M.O., Oyama, L.M. & Ribeiro, E.B. (2015). Diet-induced obesity impairs hypothalamic glucose sensing but not glucose hypothalamic extracellular levels, as measured by microdialysis. *Nutrition & Diabetes*, 5, e162. <https://doi.org/10.1038/nutd.2015.12>
- Argaw, A.T., Gurfein, B.T., Zhang, Y., Zameer, A. & John, G.R. (2009). VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (6), 1977–1982. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808698106>
- Arluison, M., Quignon, M., Nguyen, P., Thorens, B., Leloup, C. & Penicaud, L. (2004). Distribution and anatomical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain--an immunohistochemical study. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 28 (3), 117–136. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2004.05.009>
- Ashford, M.L., Boden, P.R. & Treherne, J.M. (1990). Glucose-induced excitation of hypothalamic neurones is mediated by ATP-sensitive K⁺ channels. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 415 (4), 479–483. <https://doi.org/10.1007/BF00373626>

- Bagger, J.I., Knop, F.K., Lund, A., Vestergaard, H., Holst, J.J. & Vilsbøll, T. (2011). Impaired regulation of the incretin effect in patients with type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96 (3), 737–745. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-2435>
- Baggio, L.L. & Drucker, D.J. (2007). Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, 132 (6), 2131–2157. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.03.054>
- Balland, E., Dam, J., Langlet, F., Caron, E., Steculorum, S., Messina, A., Rasika, S., Falluel-Morel, A., Anouar, Y., Dehouck, B., Trinquet, E., Jockers, R., Bouret, S.G. & Prévot, V. (2014). Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell metabolism*, 19 (2), 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.12.015>
- Banks, W.A., Kastin, A.J., Huang, W., Jaspan, J.B. & Maness, L.M. (1996). Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides*, 17 (2), 305–311. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(96\)00025-3](https://doi.org/10.1016/0196-9781(96)00025-3)
- Barahona, M.J., Llanos, P., Recabal, A., Escobar-Acuña, K., Elizondo-Vega, R., Salgado, M., Ordenes, P., Uribe, E., Sepúlveda, F.J., Araneda, R.C. & García-Robles, M.A. (2018). Glial hypothalamic inhibition of GLUT2 expression alters satiety, impacting eating behavior. *Glia*, 66 (3), 592–605. <https://doi.org/10.1002/glia.23267>
- Baron, A.D., Brechtel, G., Wallace, P. & Edelman, S.V. (1988). Rates and tissue sites of non-insulin- and insulin-mediated glucose uptake in humans. *The American Journal of Physiology*, 255 (6 Pt 1), E769-774. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1988.255.6.E769>
- Bar-Tana, J. (2020). Type 2 diabetes – unmet need, unresolved pathogenesis, mTORC1-centric paradigm. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 21 (4), 613–629. <https://doi.org/10.1007/s11154-020-09545-w>
- Baura, G.D., Foster, D.M., Porte, D., Kahn, S.E., Bergman, R.N., Cobelli, C. & Schwartz, M.W. (1993). Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *The Journal of Clinical Investigation*, 92 (4), 1824–1830. <https://doi.org/10.1172/JCI116773>
- Bechtold, D.A. & Luckman, S.M. (2007). The role of RFamide peptides in feeding. *The Journal of Endocrinology*, 192 (1), 3–15. <https://doi.org/10.1677/JOE-06-0069>
- Beck, B. & Richy, S. (2009). Suppression of QRFP 43 in the hypothalamic ventromedial nucleus of Long-Evans rats fed a high-fat diet. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 383 (1), 78–82. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.03.132>
- Bence, K.K., Delibegovic, M., Xue, B., Gorgun, C.Z., Hotamisligil, G.S., Neel, B.G. & Kahn, B.B. (2006). Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. *Nature Medicine*, 12 (8), 917–924. <https://doi.org/10.1038/nm1435>
- Benoit, S.C., Air, E.L., Coolen, L.M., Strauss, R., Jackman, A., Clegg, D.J., Seeley, R.J. & Woods, S.C. (2002). The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22 (20), 9048–9052. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-20-09048.2002>
- Benoit, S.C., Kemp, C.J., Elias, C.F., Abplanalp, W., Herman, J.P., Migrenne, S., Lefevre, A.-L., Cruciani-Guglielmacci, C., Magnan, C., Yu, F., Niswender, K., Irani, B.G., Holland, W.L. & Clegg, D.J. (2009). Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC- θ subcellular localization in rodents. *The Journal of Clinical Investigation*, 119 (9), 2577–2589. <https://doi.org/10.1172/JCI36714>
- Bentsen, M.A., Mirzadeh, Z. & Schwartz, M.W. (2019). Revisiting How the Brain Senses Glucose-And Why. *Cell Metabolism*, 29 (1), 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.11.001>
- Berger, J.J. & Barnard, R.J. (1999). Effect of diet on fat cell size and hormone-sensitive lipase activity. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 87 (1), 227–232. <https://doi.org/10.1152/jappl.1999.87.1.227>

- Berkseth, K.E., Guyenet, S.J., Melhorn, S.J., Lee, D., Thaler, J.P., Schur, E.A. & Schwartz, M.W. (2014). Hypothalamic gliosis associated with high-fat diet feeding is reversible in mice: a combined immunohistochemical and magnetic resonance imaging study. *Endocrinology*, 155 (8), 2858–2867. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1121>
- Berthoud, H.R., Bereiter, D.A., Trimble, E.R., Siegel, E.G. & Jeanrenaud, B. (1981). Cephalic phase, reflex insulin secretion neuroanatomical and physiological characterization. *Diabetologia*, 20 (Suppl 1), 393–401. <https://doi.org/10.1007/BF00254508>
- Berthoud, H.R. & Powley, T.L. (1990). Identification of vagal preganglionics that mediate cephalic phase insulin response. *The American Journal of Physiology*, 258 (2 Pt 2), R523-530. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1990.258.2.R523>
- Bigot, L., Beets, I., Dubos, M.-P., Boudry, P., Schoofs, L. & Favrel, P. (2014). Functional characterization of a short neuropeptide F-related receptor in a lophotrochozoan, the mollusk *Crassostrea gigas*. *The Journal of Experimental Biology*, 217 (Pt 16), 2974–2982. <https://doi.org/10.1242/jeb.104067>
- Bloom, S.R. & Edwards, A.V. (1984). Characteristics of the neuroendocrine responses to stimulation of the splanchnic nerves in bursts in the conscious calf. *The Journal of Physiology*, 346, 533–545. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1984.sp015039>
- Blüher, M. (2010). The distinction of metabolically “healthy” from “unhealthy” obese individuals. *Current Opinion in Lipidology*, 21 (1), 38–43. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3283346ccc>
- Bock, T., Pakkenberg, B. & Buschard, K. (2003). Increased islet volume but unchanged islet number in ob/ob mice. *Diabetes*, 52 (7), 1716–1722. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.7.1716>
- Borg, M.A., Sherwin, R.S., Borg, W.P., Tamborlane, W.V. & Shulman, G.I. (1997). Local ventromedial hypothalamus glucose perfusion blocks counterregulation during systemic hypoglycemia in awake rats. *The Journal of Clinical Investigation*, 99 (2), 361–365. <https://doi.org/10.1172/JCI119165>
- Borg, W.P., During, M.J., Sherwin, R.S., Borg, M.A., Brines, M.L. & Shulman, G.I. (1994). Ventromedial hypothalamic lesions in rats suppress counterregulatory responses to hypoglycemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 93 (4), 1677–1682. <https://doi.org/10.1172/JCI117150>
- Borg, W.P., Sherwin, R.S., During, M.J., Borg, M.A. & Shulman, G.I. (1995). Local ventromedial hypothalamus glucopenia triggers counterregulatory hormone release. *Diabetes*, 44 (2), 180–184. <https://doi.org/10.2337/diab.44.2.180>
- Borgmann, D., Ciglieri, E., Biglari, N., Brandt, C., Cremer, A.L., Backes, H., Tittgemeyer, M., Wunderlich, F.T., Brüning, J.C. & Fenselau, H. (2021). Gut-brain communication by distinct sensory neurons differently controls feeding and glucose metabolism. *Cell Metabolism*, 33 (7), 1466-1482.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.05.002>
- Boucsein, A., Kamstra, K. & Tups, A. (2021). Central signalling cross-talk between insulin and leptin in glucose and energy homeostasis. *Journal of Neuroendocrinology*, 33 (4), e12944. <https://doi.org/10.1111/jne.12944>
- Bouzakri, K., Zachrisson, A., Al-Khalili, L., Zhang, B.B., Koistinen, H.A., Krook, A. & Zierath, J.R. (2006). siRNA-based gene silencing reveals specialized roles of IRS-1/Akt2 and IRS-2/Akt1 in glucose and lipid metabolism in human skeletal muscle. *Cell Metabolism*, 4 (1), 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.04.008>
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J. & Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 96 (6), 857–868. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80595-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80595-4)

- Bruzzone, F., Lectez, B., Alexandre, D., Jégou, S., Mounien, L., Tollemer, H., Chatenet, D., Leprince, J., Vallarino, M., Vaudry, H. & Chartrel, N. (2007). Distribution of 26RFa binding sites and GPR103 mRNA in the central nervous system of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 503 (4), 573–591. <https://doi.org/10.1002/cne.21400>
- Bruzzone, F., Lectez, B., Tollemer, H., Leprince, J., Dujardin, C., Rachidi, W., Chatenet, D., Baroncini, M., Beauvillain, J.-C., Vallarino, M., Vaudry, H. & Chartrel, N. (2006). Anatomical distribution and biochemical characterization of the novel RFamide peptide 26RFa in the human hypothalamus and spinal cord. *Journal of Neurochemistry*, 99 (2), 616–627. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04090.x>
- Buchanan, T.A., Metzger, B.E., Freinkel, N. & Bergman, R.N. (1990). Insulin sensitivity and B-cell responsiveness to glucose during late pregnancy in lean and moderately obese women with normal glucose tolerance or mild gestational diabetes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 162 (4), 1008–1014. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(90\)91306-w](https://doi.org/10.1016/0002-9378(90)91306-w)
- Burcelin, R., Da Costa, A., Drucker, D. & Thorens, B. (2001). Glucose competence of the hepatoportal vein sensor requires the presence of an activated glucagon-like peptide-1 receptor. *Diabetes*, 50 (8), 1720–1728. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.8.1720>
- Burmeister, M.A., Ayala, J.E., Smouse, H., Landivar-Rocha, A., Brown, J.D., Drucker, D.J., Stoffers, D.A., Sandoval, D.A., Seeley, R.J. & Ayala, J.E. (2017). The Hypothalamic Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Is Sufficient but Not Necessary for the Regulation of Energy Balance and Glucose Homeostasis in Mice. *Diabetes*, 66 (2), 372–384. <https://doi.org/10.2337/db16-1102>
- Buteau, J., Roduit, R., Susini, S. & Prentki, M. (1999). Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells. *Diabetologia*, 42 (7), 856–864. <https://doi.org/10.1007/s001250051238>
- Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A. & Butler, P.C. (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*, 52 (1), 102–110. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.1.102>
- Calanna, S., Christensen, M., Holst, J.J., Laferrère, B., Glud, L.L., Vilsbøll, T. & Knop, F.K. (2013). Secretion of glucagon-like peptide-1 in patients with type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analyses of clinical studies. *Diabetologia*, 56 (5), 965–972. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2841-0>
- Chartrel, N., Alonzeau, J., Alexandre, D., Jeandel, L., Alvear-Perez, R., Leprince, J., Boutin, J., Vaudry, H., Anouar, Y. & Llorens-Cortes, C. (2011). The RFamide neuropeptide 26RFa and its role in the control of neuroendocrine functions. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 32 (4), 387–397. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2011.04.001>
- Chartrel, N., Dujardin, C., Anouar, Y., Leprince, J., Decker, A., Clerens, S., Do-Régo, J.-C., Vandessande, F., Llorens-Cortes, C., Costentin, J., Beauvillain, J.-C. & Vaudry, H. (2003). Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the RFamide peptide family with orexigenic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (25), 15247–15252. <https://doi.org/10.1073/pnas.2434676100>
- Chartrel, N., Picot, M., El Medhi, M., Arabo, A., Berrahmoune, H., Alexandre, D., Maucotel, J., Anouar, Y. & Prévost, G. (2016). The Neuropeptide 26RFa (QRFP) and Its Role in the Regulation of Energy Homeostasis: A Mini-Review. *Frontiers in Neuroscience*, 10, 549. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00549>
- Cehade, J.M., Haas, M.J. & Mooradian, A.D. (2002). Diabetes-related changes in rat cerebral occludin and zonula occludens-1 (ZO-1) expression. *Neurochemical Research*, 27 (3), 249–252. <https://doi.org/10.1023/a:1014892706696>
- Chen, A., Chiu, C.N., Mosser, E.A., Kahn, S., Spence, R. & Prober, D.A. (2016). QRFP and Its Receptors Regulate Locomotor Activity and Sleep in Zebrafish. *The Journal of Neuroscience*:

- The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 36 (6), 1823–1840.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2579-15.2016>
- Chen, C., Cohrs, C.M., Stertmann, J., Bozsak, R. & Speier, S. (2017). Human beta cell mass and function in diabetes: Recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis. *Molecular Metabolism*, 6 (9), 943–957.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.06.019>
- Chen, C., Hosokawa, H., Bumbalo, L.M. & Leahy, J.L. (1994). Regulatory effects of glucose on the catalytic activity and cellular content of glucokinase in the pancreatic beta cell. Study using cultured rat islets. *The Journal of Clinical Investigation*, 94 (4), 1616–1620.
<https://doi.org/10.1172/JCI117503>
- Chen, M., Woods, S.C. & Porte, D. (1975). Effect of cerebral intraventricular insulin on pancreatic insulin secretion in the dog. *Diabetes*, 24 (10), 910–914. <https://doi.org/10.2337/diab.24.10.910>
- Cheung, C.C., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. (1997). Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology*, 138 (10), 4489–4492.
<https://doi.org/10.1210/endo.138.10.5570>
- Chia, C.W., Carlson, O.D., Liu, D.D., González-Mariscal, I., Santa-Cruz Calvo, S. & Egan, J.M. (2017). Incretin secretion in humans is under the influence of cannabinoid receptors. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 313 (3), E359–E366.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00080.2017>
- Chowers, I., Lavy, S. & Halpern, L. (1966). Effect of insulin administered intracisternally on the glucose level of the blood and the cerebrospinal fluid in vagotomized dogs. *Experimental Neurology*, 14 (3), 383–389. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(66\)90122-1](https://doi.org/10.1016/0014-4886(66)90122-1)
- Ciriello, J., McMurray, J.C., Babic, T. & de Oliveira, C.V.R. (2003). Collateral axonal projections from hypothalamic hypocretin neurons to cardiovascular sites in nucleus ambiguus and nucleus tractus solitarius. *Brain Research*, 991 (1–2), 133–141.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.08.016>
- Clark, A., Wells, C.A., Buley, I.D., Cruickshank, J.K., Vanhegan, R.I., Matthews, D.R., Cooper, G.J., Holman, R.R. & Turner, R.C. (1988). Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Research (Edinburgh, Scotland)*, 9 (4), 151–159
- Clegg, D.J., Gotoh, K., Kemp, C., Wortman, M.D., Benoit, S.C., Brown, L.M., D’Alessio, D., Tso, P., Seeley, R.J. & Woods, S.C. (2011). Consumption of a high-fat diet induces central insulin resistance independent of adiposity. *Physiology & Behavior*, 103 (1), 10–16.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.01.010>
- Coomans, C.P., Geerling, J.J., Guigas, B., van den Hoek, A.M., Parlevliet, E.T., Ouwens, D.M., Pijl, H., Voshol, P.J., Rensen, P.C.N., Havekes, L.M. & Romijn, J.A. (2011). Circulating insulin stimulates fatty acid retention in white adipose tissue via KATP channel activation in the central nervous system only in insulin-sensitive mice. *Journal of Lipid Research*, 52 (9), 1712–1722.
<https://doi.org/10.1194/jlr.M015396>
- Coppari, R., Ichinose, M., Lee, C.E., Pullen, A.E., Kenny, C.D., McGovern, R.A., Tang, V., Liu, S.M., Ludwig, T., Chua, S.C., Lowell, B.B. & Elmquist, J.K. (2005). The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin’s effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell Metabolism*, 1 (1), 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2004.12.004>
- Copps, K.D., Hancer, N.J., Opore-Ado, L., Qiu, W., Walsh, C. & White, M.F. (2010). Irs1 serine 307 promotes insulin sensitivity in mice. *Cell Metabolism*, 11 (1), 84–92.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.11.003>
- Corp, E.S., Woods, S.C., Porte, D., Dorsa, D.M., Figlewicz, D.P. & Baskin, D.G. (1986). Localization of 125I-insulin binding sites in the rat hypothalamus by quantitative autoradiography. *Neuroscience Letters*, 70 (1), 17–22. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(86\)90430-1](https://doi.org/10.1016/0304-3940(86)90430-1)

- Coskun, T., Sloop, K.W., Loghin, C., Alsina-Fernandez, J., Urva, S., Bokvist, K.B., Cui, X., Briere, D.A., Cabrera, O., Roell, W.C., Kuchibhotla, U., Moyers, J.S., Benson, C.T., Gimeno, R.E., D'Alessio, D.A. & Haupt, A. (2018). LY3298176, a novel dual GIP and GLP-1 receptor agonist for the treatment of type 2 diabetes mellitus: From discovery to clinical proof of concept. *Molecular Metabolism*, 18, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.09.009>
- Couillard, C., Mauriège, P., Imbeault, P., Prud'homme, D., Nadeau, A., Tremblay, A., Bouchard, C. & Després, J.P. (2000). Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 24 (6), 782–788. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801227>
- Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdán, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D. & Low, M.J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, 411 (6836), 480–484. <https://doi.org/10.1038/35078085>
- Cuschieri, S. (2019). The genetic side of type 2 diabetes - A review. *Diabetes & Metabolic Syndrome*, 13 (4), 2503–2506. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.07.012>
- Davies, J., Chen, J., Pink, R., Carter, D., Saunders, N., Sotiriadis, G., Bai, B., Pan, Y., Howlett, D., Payne, A., Randevara, H. & Karteris, E. (2015). Orexin receptors exert a neuroprotective effect in Alzheimer's disease (AD) via heterodimerization with GPR103. *Scientific Reports*, 5, 12584. <https://doi.org/10.1038/srep12584>
- De Souza, C.T., Araujo, E.P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R.L., Boschero, A.C., Saad, M.J.A. & Velloso, L.A. (2005). Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*, 146 (10), 4192–4199. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1520>
- De Vos, A., Heimberg, H., Quartier, E., Huypens, P., Bouwens, L., Pipeleers, D. & Schuit, F. (1995). Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *Journal of Clinical Investigation*, 96 (5), 2489–2495
- Deeney, J.T., Gromada, J., Høy, M., Olsen, H.L., Rhodes, C.J., Prentki, M., Berggren, P.O. & Corkey, B.E. (2000). Acute stimulation with long chain acyl-CoA enhances exocytosis in insulin-secreting cells (HIT T-15 and NMRI beta-cells). *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (13), 9363–9368. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.13.9363>
- DeFronzo, R.A. (1979). Glucose intolerance and aging: evidence for tissue insensitivity to insulin. *Diabetes*, 28 (12), 1095–1101. <https://doi.org/10.2337/diab.28.12.1095>
- DeFronzo, R.A. (2009). From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes*, 58 (4), 773–795. <https://doi.org/10.2337/db09-9028>
- DeFronzo, R.A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R.R., Herman, W.H., Holst, J.J., Hu, F.B., Kahn, C.R., Raz, I., Shulman, G.I., Simonson, D.C., Testa, M.A. & Weiss, R. (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews. Disease Primers*, 1, 15019. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.19>
- Deng, S., Vatamaniuk, M., Huang, X., Doliba, N., Lian, M.-M., Frank, A., Velidedeoglu, E., Desai, N.M., Koeberlein, B., Wolf, B., Barker, C.F., Naji, A., Matschinsky, F.M. & Markmann, J.F. (2004). Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. *Diabetes*, 53 (3), 624–632. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.3.624>
- Do Rego, J.-C., Leprince, J., Chartrel, N., Vaudry, H. & Costentin, J. (2006). Behavioral effects of 26RFamide and related peptides. *Peptides*, 27 (11), 2715–2721. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.04.017>
- Donovan, C.M. & Bohland, M. (2009). Hypoglycemic detection at the portal vein: absent in humans or yet to be elucidated? *Diabetes*, 58 (1), 21–23. <https://doi.org/10.2337/db08-1437>
- Dresner, A., Laurent, D., Marcucci, M., Griffin, M.E., Dufour, S., Cline, G.W., Slezak, L.A., Andersen, D.K., Hundal, R.S., Rothman, D.L., Petersen, K.F. & Shulman, G.I. (1999). Effects of free fatty

- acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *The Journal of Clinical Investigation*, 103 (2), 253–259. <https://doi.org/10.1172/JCI5001>
- Dube, M.G., Horvath, T.L., Kalra, P.S. & Kalra, S.P. (2000). Evidence of NPY Y5 receptor involvement in food intake elicited by orexin A in sated rats. *Peptides*, 21 (10), 1557–1560. [https://doi.org/10.1016/s0196-9781\(00\)00311-9](https://doi.org/10.1016/s0196-9781(00)00311-9)
- Dunn-Meynell, A.A., Routh, V.H., Kang, L., Gaspers, L. & Levin, B.E. (2002). Glucokinase is the likely mediator of glucosensing in both glucose-excited and glucose-inhibited central neurons. *Diabetes*, 51 (7), 2056–2065. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.7.2056>
- Duttaroy, A., Zimlik, C.L., Gautam, D., Cui, Y., Mears, D. & Wess, J. (2004). Muscarinic stimulation of pancreatic insulin and glucagon release is abolished in m3 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. *Diabetes*, 53 (7), 1714–1720. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.7.1714>
- Eckel, R.H., Fujimoto, W.Y. & Brunzell, J.D. (1979). Gastric inhibitory polypeptide enhanced lipoprotein lipase activity in cultured preadipocytes. *Diabetes*, 28 (12), 1141–1142. <https://doi.org/10.2337/diab.28.12.1141>
- Egan, J.M., Bulotta, A., Hui, H. & Perfetti, R. (2003). GLP-1 receptor agonists are growth and differentiation factors for pancreatic islet beta cells. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 19 (2), 115–123. <https://doi.org/10.1002/dmrr.357>
- El Mehdi, M., Takhlidjt, S., Devère, M., Arabo, A., Sollic, M.-A.L., Maucotel, J., Bénani, A., Nedelec, E., Duparc, C., Lefranc, B., Leprince, J., Anouar, Y., Prévost, G., Chartrel, N. & Picot, M. (2021). *Identification of a discrete neuronal circuit that relays insulin signaling into the brain to regulate glucose homeostasis*. <https://doi.org/10.1101/2021.09.13.460055>
- El Ouaamari, A., Dirice, E., Gedeon, N., Hu, J., Zhou, J.-Y., Shirakawa, J., Hou, L., Goodman, J., Karampelias, C., Qiang, G., Boucher, J., Martinez, R., Gritsenko, M.A., De Jesus, D.F., Kahraman, S., Bhatt, S., Smith, R.D., Beer, H.-D., Jungtrakoon, P., Gong, Y., Goldfine, A.B., Liew, C.W., Doria, A., Andersson, O., Qian, W.-J., Remold-O'Donnell, E. & Kulkarni, R.N. (2016). SerpinB1 Promotes Pancreatic β Cell Proliferation. *Cell Metabolism*, 23 (1), 194–205. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.001>
- Elahi, D., Egan, J.M., Shannon, R.P., Meneilly, G.S., Khatri, A., Habener, J.F. & Andersen, D.K. (2008). GLP-1 (9-36) amide, cleavage product of GLP-1 (7-36) amide, is a gluoregulatory peptide. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 16 (7), 1501–1509. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.229>
- Elahi, D., McAloon-Dyke, M., Fukagawa, N.K., Meneilly, G.S., Sclater, A.L., Minaker, K.L., Habener, J.F. & Andersen, D.K. (1994). The insulinotropic actions of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (7-37) in normal and diabetic subjects. *Regulatory Peptides*, 51 (1), 63–74. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(94\)90136-8](https://doi.org/10.1016/0167-0115(94)90136-8)
- Elhabazi, K., Humbert, J.-P., Bertin, I., Schmitt, M., Bihel, F., Bourguignon, J.-J., Bucher, B., Becker, J.A.J., Sorg, T., Meziane, H., Petit-Demoulière, B., Ilien, B. & Simonin, F. (2013). Endogenous mammalian RF-amide peptides, including PrRP, kisspeptin and 26RFa, modulate nociception and morphine analgesia via NPPF receptors. *Neuropharmacology*, 75, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.07.012>
- El-Mehdi, M., Takhlidjt, S., Khiar, F., Prévost, G., do Rego, J.-L., do Rego, J.-C., Benani, A., Nedelec, E., Godefroy, D., Arabo, A., Lefranc, B., Leprince, J., Anouar, Y., Chartrel, N. & Picot, M. (2020). Glucose homeostasis is impaired in mice deficient in the neuropeptide 26RFa (QRFP). *BMJ Open Diabetes Research & Care*, 8 (1). <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2019-000942>
- Elmqvist, J.K., Coppari, R., Balthasar, N., Ichinose, M. & Lowell, B.B. (2005). Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. *The Journal of Comparative Neurology*, 493 (1), 63–71. <https://doi.org/10.1002/cne.20786>
- Færch, K., Torekov, S.S., Vistisen, D., Johansen, N.B., Witte, D.R., Jonsson, A., Pedersen, O., Hansen, T., Lauritzen, T., Sandbæk, A., Holst, J.J. & Jørgensen, M.E. (2015). GLP-1 Response to Oral Glucose Is Reduced in Prediabetes, Screen-Detected Type 2 Diabetes, and Obesity and

- Influenced by Sex: The ADDITION-PRO Study. *Diabetes*, 64 (7), 2513–2525. <https://doi.org/10.2337/db14-1751>
- Fan, W., Dinulescu, D.M., Butler, A.A., Zhou, J., Marks, D.L. & Cone, R.D. (2000). The central melanocortin system can directly regulate serum insulin levels. *Endocrinology*, 141 (9), 3072–3079. <https://doi.org/10.1210/endo.141.9.7665>
- Farese, R.V., Yost, T.J. & Eckel, R.H. (1991). Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity by insulin/glucose in normal-weight humans. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 40 (2), 214–216. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(91\)90178-y](https://doi.org/10.1016/0026-0495(91)90178-y)
- Fasshauer, M. & Blüher, M. (2015). Adipokines in health and disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36 (7), 461–470. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.014>
- Fehmann, H.C. & Habener, J.F. (1992). Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma beta TC-1 cells. *Endocrinology*, 130 (1), 159–166. <https://doi.org/10.1210/endo.130.1.1309325>
- Felber, J.-P. & Golay, A. (2002). Pathways from obesity to diabetes. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 26 Suppl 2, S39-45. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802126>
- Ferrannini, E., Gastaldelli, A., Miyazaki, Y., Matsuda, M., Mari, A. & DeFronzo, R.A. (2005). beta-Cell function in subjects spanning the range from normal glucose tolerance to overt diabetes: a new analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90 (1), 493–500. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1133>
- Finan, B., Ma, T., Ottaway, N., Müller, T.D., Habegger, K.M., Heppner, K.M., Kirchner, H., Holland, J., Hembree, J., Raver, C., Lockie, S.H., Smiley, D.L., Gelfanov, V., Yang, B., Hofmann, S., Bruemmer, D., Drucker, D.J., Pfluger, P.T., Perez-Tilve, D., Gidda, J., Vignati, L., Zhang, L., Hauptman, J.B., Lau, M., Brecheisen, M., Uhles, S., Riboulet, W., Hainaut, E., Sebokova, E., Conde-Knape, K., Konkar, A., DiMarchi, R.D. & Tschöp, M.H. (2013). Unimolecular Dual Incretins Maximize Metabolic Benefits in Rodents, Monkeys, and Humans. *Science Translational Medicine*, 5 (209), 209ra151-209ra151. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007218>
- Franklin, I., Gromada, J., Gjinovci, A., Theander, S. & Wollheim, C.B. (2005). Beta-cell secretory products activate alpha-cell ATP-dependent potassium channels to inhibit glucagon release. *Diabetes*, 54 (6), 1808–1815. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1808>
- Frias, J.P., Bastyr, E.J., Vignati, L., Tschöp, M.H., Schmitt, C., Owen, K., Christensen, R.H. & DiMarchi, R.D. (2017). The Sustained Effects of a Dual GIP/GLP-1 Receptor Agonist, NNC0090-2746, in Patients with Type 2 Diabetes. *Cell Metabolism*, 26 (2), 343-352.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.07.011>
- Frias, J.P., Nauck, M.A., Van, J., Kutner, M.E., Cui, X., Benson, C., Urva, S., Gimeno, R.E., Milicevic, Z., Robins, D. & Haupt, A. (2018). Efficacy and safety of LY3298176, a novel dual GIP and GLP-1 receptor agonist, in patients with type 2 diabetes: a randomised, placebo-controlled and active comparator-controlled phase 2 trial. *Lancet (London, England)*, 392 (10160), 2180–2193. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32260-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32260-8)
- Fuente-Martín E, Jm, M.-G., N, C.-V., A, M.-M., Sy, R.-Z., I, D.C., A, H., B, S., F, M.B., Jc, R., Fj, B.-S., Pi, L. & Br, G. (2019). Dissecting the Brain/Islet Axis in Metabesity. *Genes*, 10 (5), 350. <https://doi.org/10.3390/genes10050350>
- Fuente-Martín, E., Mellado-Gil, J.M., Cobo-Vuilleumier, N., Martín-Montalvo, A., Romero-Zerbo, S.Y., Diaz Contreras, I., Hmadcha, A., Soria, B., Martín Bermudo, F., Reyes, J.C., Bermúdez-Silva, F.J., Lorenzo, P.I. & Gauthier, B.R. (2019). Dissecting the Brain/Islet Axis in Metabesity. *Genes*, 10 (5), E350. <https://doi.org/10.3390/genes10050350>
- Fujisaka, S., Usui, I., Icutani, M., Aminuddin, A., Takikawa, A., Tsuneyama, K., Mahmood, A., Goda, N., Nagai, Y., Takatsu, K. & Tobe, K. (2013). Adipose tissue hypoxia induces inflammatory

- M1 polarity of macrophages in an HIF-1 α -dependent and HIF-1 α -independent manner in obese mice. *Diabetologia*, 56 (6), 1403–1412. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2885-1>
- Fukuda, M. (2021). The Role of GIP Receptor in the CNS for the Pathogenesis of Obesity. *Diabetes*, 70 (9), 1929–1937. <https://doi.org/10.2337/dbi21-0001>
- Fukusumi, S., Yoshida, H., Fujii, R., Maruyama, M., Komatsu, H., Habata, Y., Shintani, Y., Hinuma, S. & Fujino, M. (2003). A new peptidic ligand and its receptor regulating adrenal function in rats. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (47), 46387–46395. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305270200>
- Galusca, B., Jeandel, L., Germain, N., Alexandre, D., Leprince, J., Anouar, Y., Estour, B. & Chartrel, N. (2012). Orexigenic neuropeptide 26RFa: new evidence for an adaptive profile of appetite regulation in anorexia nervosa. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97 (6), 2012–2018. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-3396>
- García, M.A., Millán, C., Balmaceda-Aguilera, C., Castro, T., Pastor, P., Montecinos, H., Reinicke, K., Zúñiga, F., Vera, J.C., Oñate, S.A. & Nualart, F. (2003). Hypothalamic ependymal-glia cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *Journal of Neurochemistry*, 86 (3), 709–724. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01892.x>
- Gasbjerg, L.S., Helsted, M.M., Hartmann, B., Jensen, M.H., Gabe, M.B.N., Sparre-Ulrich, A.H., Veedfald, S., Stensen, S., Lanng, A.R., Bergmann, N.C., Christensen, M.B., Vilsbøll, T., Holst, J.J., Rosenkilde, M.M. & Knop, F.K. (2019). Separate and Combined Glucometabolic Effects of Endogenous Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide and Glucagon-like Peptide 1 in Healthy Individuals. *Diabetes*, 68 (5), 906–917. <https://doi.org/10.2337/db18-1123>
- Gautam, D., Han, S.-J., Hamdan, F.F., Jeon, J., Li, B., Li, J.H., Cui, Y., Mears, D., Lu, H., Deng, C., Heard, T. & Wess, J. (2006). A critical role for beta cell M3 muscarinic acetylcholine receptors in regulating insulin release and blood glucose homeostasis in vivo. *Cell Metabolism*, 3 (6), 449–461. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.04.009>
- Geerling, J.C., Shin, J.-W., Chimenti, P.C. & Loewy, A.D. (2010). Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem. *The Journal of Comparative Neurology*, 518 (9), 1460–1499. <https://doi.org/10.1002/cne.22283>
- Georgsson, J., Bergström, F., Nordqvist, A., Watson, M.J., Blundell, C.D., Johansson, M.J., Petersson, A.U., Yuan, Z.-Q., Zhou, Y., Kristensson, L., Kakol-Palm, D., Tyrchan, C., Wellner, E., Bauer, U., Brodin, P. & Svensson Henriksson, A. (2014). GPR103 antagonists demonstrating anorexigenic activity in vivo: design and development of pyrrolo[2,3-c]pyridines that mimic the C-terminal Arg-Phe motif of QRFP26. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57 (14), 5935–5948. <https://doi.org/10.1021/jm401951t>
- Gerber, P.A. & Rutter, G.A. (2017). The Role of Oxidative Stress and Hypoxia in Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Antioxidants & Redox Signaling*, 26 (10), 501–518. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6755>
- German, J., Kim, F., Schwartz, G.J., Havel, P.J., Rhodes, C.J., Schwartz, M.W. & Morton, G.J. (2009). Hypothalamic leptin signaling regulates hepatic insulin sensitivity via a neurocircuit involving the vagus nerve. *Endocrinology*, 150 (10), 4502–4511. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0445>
- Getty-Kaushik, L., Song, D.H., Boylan, M.O., Corkey, B.E. & Wolfe, M.M. (2006). Glucose-dependent insulinotropic polypeptide modulates adipocyte lipolysis and reesterification. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 14 (7), 1124–1131. <https://doi.org/10.1038/oby.2006.129>
- Glaser, B., Kesavan, P., Heyman, M., Davis, E., Cuesta, A., Buchs, A., Stanley, C.A., Thornton, P.S., Permutt, M.A., Matschinsky, F.M. & Herold, K.C. (1998). Familial hyperinsulinism caused by an activating glucokinase mutation. *The New England Journal of Medicine*, 338 (4), 226–230. <https://doi.org/10.1056/NEJM199801223380404>
- Gorboulev, V., Schürmann, A., Vallon, V., Kipp, H., Jaschke, A., Klessen, D., Friedrich, A., Scherneck, S., Rieg, T., Cunard, R., Veyhl-Wichmann, M., Srinivasan, A., Balen, D., Breljak, D., Rexhepaj,

- R., Parker, H.E., Gribble, F.M., Reimann, F., Lang, F., Wiese, S., Sabolic, I., Sendtner, M. & Koepsell, H. (2012). Na(+)-D-glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion. *Diabetes*, 61 (1), 187–196. <https://doi.org/10.2337/db11-1029>
- Gouardères, C., Mazarguil, H., Mollereau, C., Chartrel, N., Leprince, J., Vaudry, H. & Zajac, J.-M. (2007). Functional differences between NPPF1 and NPPF2 receptor coupling: high intrinsic activities of RFamide-related peptides on stimulation of [35S]GTPgammaS binding. *Neuropharmacology*, 52 (2), 376–386. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.07.034>
- Granata, R., Settanni, F., Trovato, L., Gallo, D., Gesmundo, I., Nano, R., Gallo, M.P., Bergandi, L., Volante, M., Alloatti, G., Piemonti, L., Leprince, J., Papotti, M., Vaudry, H., Ong, H. & Ghigo, E. (2014). RFamide Peptides 43RFa and 26RFa Both Promote Survival of Pancreatic β -Cells and Human Pancreatic Islets but Exert Opposite Effects on Insulin Secretion. *Diabetes*, 63 (7), 2380–2393. <https://doi.org/10.2337/db13-1522>
- Gray, S.M., Aylor, K.W. & Barrett, E.J. (2017). Unravelling the regulation of insulin transport across the brain endothelial cell. *Diabetologia*, 60 (8), 1512–1521. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4285-4>
- Gray, S.M. & Barrett, E.J. (2018). Insulin transport into the brain. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 315 (2), C125–C136. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00240.2017>
- Guillemot-Legrès, O. & Muccioli, G.G. (2017). Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus. *Trends in Neurosciences*, 40 (4), 237–253. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.02.005>
- Guillod-Maximin, E., Lorsignol, A., Alquier, T. & 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 (5), 464–471. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2004.01185.x>
- Gupta, N.A., Mells, J., Dunham, R.M., Grakoui, A., Handy, J., Saxena, N.K. & Anania, F.A. (2010). Glucagon-like peptide-1 receptor is present on human hepatocytes and has a direct role in decreasing hepatic steatosis in vitro by modulating elements of the insulin signaling pathway. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 51 (5), 1584–1592. <https://doi.org/10.1002/hep.23569>
- Gupta, S., Knight, A.G., Gupta, S., Keller, J.N. & Bruce-Keller, A.J. (2012). Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 120 (6), 1060–1071. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07660.x>
- Haeusler, R.A., McGraw, T.E. & Accili, D. (2018). Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19 (1), 31–44. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.89>
- Halaas, J.L., Boozer, C., Blair-West, J., Fidahusein, N., Denton, D.A. & Friedman, J.M. (1997). Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (16), 8878–8883. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.16.8878>
- Hallschmid, M., Benedict, C., Schultes, B., Born, J. & Kern, W. (2008). Obese men respond to cognitive but not to catabolic brain insulin signaling. *International Journal of Obesity (2005)*, 32 (2), 275–282. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803722>
- Hansotia, T., Baggio, L.L., Delmeire, D., Hinke, S.A., Yamada, Y., Tsukiyama, K., Seino, Y., Holst, J.J., Schuit, F. & Drucker, D.J. (2004). Double incretin receptor knockout (DIRKO) mice reveal an essential role for the enteroinsular axis in transducing the glucoregulatory actions of DPP-IV inhibitors. *Diabetes*, 53 (5), 1326–1335. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.5.1326>
- Hansotia, T. & Drucker, D.J. (2005). GIP and GLP-1 as incretin hormones: lessons from single and double incretin receptor knockout mice. *Regulatory Peptides*, 128 (2), 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2004.07.019>

- Hardie, D.G. & Carling, D. (1997). The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *European Journal of Biochemistry*, 246 (2), 259–273. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00259.x>
- Hardie, D.G., Hawley, S.A. & Scott, J.W. (2006). AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. *The Journal of Physiology*, 574 (Pt 1), 7–15. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.108944>
- van Harmelen, V., Dicker, A., Rydén, M., Hauner, H., Lönnqvist, F., Näslund, E. & Arner, P. (2002). Increased lipolysis and decreased leptin production by human omental as compared with subcutaneous preadipocytes. *Diabetes*, 51 (7), 2029–2036. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.7.2029>
- Harrington, L.S., Findlay, G.M., Gray, A., Tolkacheva, T., Wigfield, S., Rebholz, H., Barnett, J., Leslie, N.R., Cheng, S., Shepherd, P.R., Gout, I., Downes, C.P. & Lamb, R.F. (2004). The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *The Journal of Cell Biology*, 166 (2), 213–223. <https://doi.org/10.1083/jcb.200403069>
- Hassan, M., Eskilsson, A., Nilsson, C., Jonsson, C., Jacobsson, H., Refai, E., Larsson, S. & Efendic, S. (1999). In vivo dynamic distribution of 131I-glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in the rat studied by gamma camera. *Nuclear Medicine and Biology*, 26 (4), 413–420. [https://doi.org/10.1016/s0969-8051\(98\)00121-8](https://doi.org/10.1016/s0969-8051(98)00121-8)
- Hayes, M.R., Kanoski, S.E., De Jonghe, B.C., Lechner, T.M., Alhadeff, A.L., Fortin, S.M., Arnold, M., Langhans, W. & Grill, H.J. (2011). The common hepatic branch of the vagus is not required to mediate the glycemic and food intake suppressive effects of glucagon-like-peptide-1. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 301 (5), R1479–1485. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00356.2011>
- Heimbürger, S.M.N., Nielsen, C.N., Calanna, S., Holst, J.J., Vilsbøll, T., Knop, F.K. & Christensen, M.B. (2021). Glucose-dependent insulinotropic polypeptide induces lipolysis during stable basal insulin substitution and hyperglycaemia in men with type 1 diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover clinical trial. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, <https://doi.org/10.1111/dom.14545>
- Heni, M., Schöpfer, P., Peter, A., Sartorius, T., Fritsche, A., Synofzik, M., Häring, H.-U., Maetzler, W. & Hennige, A.M. (2014a). Evidence for altered transport of insulin across the blood-brain barrier in insulin-resistant humans. *Acta Diabetologica*, 51 (4), 679–681. <https://doi.org/10.1007/s00592-013-0546-y>
- Heni, M., Wagner, R., Kullmann, S., Veit, R., Husin, H.M., Linder, K., Benkendorff, C., Peter, A., Stefan, N., Häring, H.-U., Preissl, H. & Fritsche, A. (2014b). Central Insulin Administration Improves Whole-Body Insulin Sensitivity via Hypothalamus and Parasympathetic Outputs in Men. *Diabetes*, 63 (12), 4083–4088. <https://doi.org/10.2337/db14-0477>
- Hersom, M., Helms, H.C., Schmalz, C., Pedersen, T.Å., Buckley, S.T. & Brodin, B. (2018). The insulin receptor is expressed and functional in cultured blood-brain barrier endothelial cells but does not mediate insulin entry from blood to brain. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 315 (4), E531–E542. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00350.2016>
- Hill, J.W., Elias, C.F., Fukuda, M., Williams, K.W., Berglund, E.D., Holland, W.L., Cho, Y.-R., Chuang, J.-C., Xu, Y., Choi, M., Lauzon, D., Lee, C.E., Coppari, R., Richardson, J.A., Zigman, J.M., Chua, S., Scherer, P.E., Lowell, B.B., Brüning, J.C. & Elmquist, J.K. (2010). Direct insulin and leptin action on pro-opiomelanocortin neurons is required for normal glucose homeostasis and fertility. *Cell Metabolism*, 11 (4), 286–297. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.002>
- Holm, C. (2003). Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochemical Society Transactions*, 31 (Pt 6), 1120–1124. <https://doi.org/10.1042/bst0311120>
- Holst, J.J. (2019). The incretin system in healthy humans: The role of GIP and GLP-1. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 96, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.04.014>

- Hope, D.C.D., Vincent, M.L. & Tan, T.M.M. (2021). Striking the Balance: GLP-1/Glucagon Co-Agonism as a Treatment Strategy for Obesity. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 735019. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.735019>
- Hossain, P., Kavar, B. & El Nahas, M. (2007). Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. *The New England Journal of Medicine*, 356 (3), 213–215. <https://doi.org/10.1056/NEJMp068177>
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S. & Spiegelman, B.M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science (New York, N.Y.)*, 259 (5091), 87–91. <https://doi.org/10.1126/science.7678183>
- Hu, F.B. (2011). Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. *Diabetes Care*, 34 (6), 1249–1257. <https://doi.org/10.2337/dc11-0442>
- Hu, F.B., Li, T.Y., Colditz, G.A., Willett, W.C. & Manson, J.E. (2003). Television watching and other sedentary behaviors in relation to risk of obesity and type 2 diabetes mellitus in women. *JAMA*, 289 (14), 1785–1791. <https://doi.org/10.1001/jama.289.14.1785>
- Hu, F.B., Manson, J.E., Stampfer, M.J., Colditz, G., Liu, S., Solomon, C.G. & Willett, W.C. (2001). Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *The New England Journal of Medicine*, 345 (11), 790–797. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa010492>
- Huang, S., Rutkowsky, J.M., Snodgrass, R.G., Ono-Moore, K.D., Schneider, D.A., Newman, J.W., Adams, S.H. & Hwang, D.H. (2012). Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *Journal of Lipid Research*, 53 (9), 2002–2013. <https://doi.org/10.1194/jlr.D029546>
- Hudish, L.I., Reusch, J.E. & Sussel, L. (2019). β Cell dysfunction during progression of metabolic syndrome to type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 129 (10), 4001–4008. <https://doi.org/10.1172/JCI129188>
- Hunter, K. & Hölscher, C. (2012). Drugs developed to treat diabetes, liraglutide and lixisenatide, cross the blood brain barrier and enhance neurogenesis. *BMC neuroscience*, 13, 33. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-13-33>
- Husson, S.J., Mertens, I., Janssen, T., Lindemans, M. & Schoofs, L. (2007). Neuropeptidergic signaling in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Progress in Neurobiology*, 82 (1), 33–55. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.01.006>
- Ibrahim, N., Bosch, M.A., Smart, J.L., Qiu, J., Rubinstein, M., Rønnekleiv, O.K., Low, M.J. & Kelly, M.J. (2003). Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels. *Endocrinology*, 144 (4), 1331–1340. <https://doi.org/10.1210/en.2002-221033>
- Ikedo, H., West, D.B., Pustek, J.J., Figlewicz, D.P., Greenwood, M.R., Porte, D. & Woods, S.C. (1986). Intraventricular insulin reduces food intake and body weight of lean but not obese Zucker rats. *Appetite*, 7 (4), 381–386. [https://doi.org/10.1016/s0195-6663\(86\)80006-x](https://doi.org/10.1016/s0195-6663(86)80006-x)
- Inaishi, J., Saisho, Y., Sato, S., Kou, K., Murakami, R., Watanabe, Y., Kitago, M., Kitagawa, Y., Yamada, T. & Itoh, H. (2016). Effects of Obesity and Diabetes on α - and β -Cell Mass in Surgically Resected Human Pancreas. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 101 (7), 2874–2882. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-1374>
- Inoue, H. (2016). Central insulin-mediated regulation of hepatic glucose production [Review]. *Endocrine Journal*, 63 (1), 1–7. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ15-0540>
- Inoue, H., Ogawa, W., Asakawa, A., Okamoto, Y., Nishizawa, A., Matsumoto, M., Teshigawara, K., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R., Notohara, K., Katayose, K., Okamura, H., Kahn, C.R., Noda, T., Takeda, K., Akira, S., Inui, A. & Kasuga, M. (2006). Role of hepatic STAT3 in brain-insulin action on hepatic glucose production. *Cell Metabolism*, 3 (4), 267–275. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.02.009>

- Inoue, H., Ogawa, W., Ozaki, M., Haga, S., Matsumoto, M., Furukawa, K., Hashimoto, N., Kido, Y., Mori, T., Sakaue, H., Teshigawara, K., Jin, S., Iguchi, H., Hiramatsu, R., LeRoith, D., Takeda, K., Akira, S. & Kasuga, M. (2004). Role of STAT-3 in regulation of hepatic gluconeogenic genes and carbohydrate metabolism in vivo. *Nature Medicine*, 10 (2), 168–174. <https://doi.org/10.1038/nm980>
- Ip, W., Shao, W., Chiang, Y.-T.A. & Jin, T. (2013). GLP-1-derived nonapeptide GLP-1(28-36)amide represses hepatic gluconeogenic gene expression and improves pyruvate tolerance in high-fat diet-fed mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 305 (11), E1348–1358. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00376.2013>
- Ishigame, N., Kageyama, K., Takayasu, S., Furumai, K., Nakada, Y. & Daimon, M. (2016). Regulation of the expression of corticotropin-releasing factor gene by pyroglutamylated RFamide peptide in rat hypothalamic 4B cells. *Endocrine Journal*, 63 (10), 919–927. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ16-0172>
- Itani, S.I., Ruderman, N.B., Schmieder, F. & Boden, G. (2002). Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IκBα. *Diabetes*, 51 (7), 2005–2011. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.7.2005>
- Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., Ogi, K., Hosoya, M., Tanaka, Y., Uejima, H., Tanaka, H., Maruyama, M., Satoh, R., Okubo, S., Kizawa, H., Komatsu, H., Matsumura, F., Noguchi, Y., Shinohara, T., Hinuma, S., Fujisawa, Y. & Fujino, M. (2003). Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature*, 422 (6928), 173–176. <https://doi.org/10.1038/nature01478>
- Iwen, K.A., Scherer, T., Heni, M., Sayk, F., Wellnitz, T., Machleidt, F., Preissl, H., Häring, H.-U., Fritsche, A., Lehnert, H., Buettner, C. & Hallschmid, M. (2014). Intranasal insulin suppresses systemic but not subcutaneous lipolysis in healthy humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99 (2), E246–251. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-3169>
- Jais, A. & Brüning, J.C. (2017). Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 127 (1), 24–32. <https://doi.org/10.1172/JCI88878>
- Janah, L., Kjeldsen, S., Galsgaard, K.D., Winther-Sørensen, M., Stojanovska, E., Pedersen, J., Knop, F.K., Holst, J.J. & Wewer Albrechtsen, N.J. (2019). Glucagon Receptor Signaling and Glucagon Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (13), E3314. <https://doi.org/10.3390/ijms20133314>
- Jansen, A.S., Hoffman, J.L. & Loewy, A.D. (1997). CNS sites involved in sympathetic and parasympathetic control of the pancreas: a viral tracing study. *Brain Research*, 766 (1–2), 29–38. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)00532-5](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)00532-5)
- Jelenik, T., Kaul, K., Séquaris, G., Flögel, U., Phielix, E., Kotzka, J., Knebel, B., Fahlbusch, P., Hörbelt, T., Lehr, S., Reinbeck, A.L., Müller-Wieland, D., Esposito, I., Shulman, G.I., Szendroedi, J. & Roden, M. (2017). Mechanisms of Insulin Resistance in Primary and Secondary Nonalcoholic Fatty Liver. *Diabetes*, 66 (8), 2241–2253. <https://doi.org/10.2337/db16-1147>
- Jensen, C.C., Cnop, M., Hull, R.L., Fujimoto, W.Y., Kahn, S.E., & American Diabetes Association GENNID Study Group (2002). Beta-cell function is a major contributor to oral glucose tolerance in high-risk relatives of four ethnic groups in the U.S. *Diabetes*, 51 (7), 2170–2178. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.7.2170>
- Jessen, L., Smith, E.P., Ulrich-Lai, Y., Herman, J.P., Seeley, R.J., Sandoval, D. & D'Alessio, D. (2017). Central Nervous System GLP-1 Receptors Regulate Islet Hormone Secretion and Glucose Homeostasis in Male Rats. *Endocrinology*, 158 (7), 2124–2133. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1826>
- Jiang, Y., Luo, L., Gustafson, E.L., Yadav, D., Laverty, M., Murgolo, N., Vassileva, G., Zeng, M., Laz, T.M., Behan, J., Qiu, P., Wang, L., Wang, S., Bayne, M., Greene, J., Monsma, F. & Zhang, F.L. (2003). Identification and characterization of a novel RF-amide peptide ligand for orphan G-

- protein-coupled receptor SP9155. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (30), 27652–27657. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302945200>
- Jones, I.R., Owens, D.R., Luzio, S., Williams, S. & Hayes, T.M. (1989). The glucose dependent insulinotropic polypeptide response to oral glucose and mixed meals is increased in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 32 (9), 668–677. <https://doi.org/10.1007/BF00274255>
- Jordan, S.D., Könnner, A.C. & Brüning, J.C. (2010). Sensing the fuels: glucose and lipid signaling in the CNS controlling energy homeostasis. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 67 (19), 3255–3273. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0414-7>
- Jorge, A.S.B., Andrade, J.M.O., Paraíso, A.F., Jorge, G.C.B., Silveira, C.M., de Souza, L.R., Santos, E.P., Guimaraes, A.L.S., Santos, S.H.S. & De-Paula, A.M.B. (2018). Body mass index and the visceral adipose tissue expression of IL-6 and TNF-alpha are associated with the morphological severity of non-alcoholic fatty liver disease in individuals with class III obesity. *Obesity Research & Clinical Practice*, 12 (Suppl 2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2016.03.009>
- Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D. & Hardie, D.G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metabolism*, 1 (1), 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2004.12.003>
- Kaiyala, K.J., Prigeon, R.L., Kahn, S.E., Woods, S.C. & Schwartz, M.W. (2000). Obesity induced by a high-fat diet is associated with reduced brain insulin transport in dogs. *Diabetes*, 49 (9), 1525–1533. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.9.1525>
- Kampe, J., Wiedmer, P., Pfluger, P.T., Castaneda, T.R., Burget, L., Mondala, H., Kerr, J., Liaw, C., Oldfield, B.J., Tschöp, M.H. & Bagnol, D. (2006). Effect of central administration of QRFP(26) peptide on energy balance and characterization of a second QRFP receptor in rat. *Brain Research*, 1119 (1), 133–149. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.08.055>
- Kaneko, K., Fu, Y., Lin, H.-Y., Cordonier, E.L., Mo, Q., Gao, Y., Yao, T., Naylor, J., Howard, V., Saito, K., Xu, P., Chen, S.S., Chen, M.-H., Xu, Y., Williams, K.W., Ravn, P. & Fukuda, M. (2019). Gut-derived GIP activates central Rap1 to impair neural leptin sensitivity during overnutrition. *The Journal of Clinical Investigation*, 129 (9), 3786–3791. <https://doi.org/10.1172/JCI126107>
- Kaneto, A., Kajinuma, H. & Kosaka, K. (1975). Effect of splanchnic nerve stimulation on glucagon and insulin output in the dog. *Endocrinology*, 96 (1), 143–150. <https://doi.org/10.1210/endo-96-1-143>
- Kaneto, H. & Matsuoka, T.-A. (2013). Down-regulation of pancreatic transcription factors and incretin receptors in type 2 diabetes. *World Journal of Diabetes*, 4 (6), 263–269. <https://doi.org/10.4239/wjd.v4.i6.263>
- Kang, L., Dunn-Meynell, A.A., Routh, V.H., Gaspers, L.D., Nagata, Y., Nishimura, T., Eiki, J., Zhang, B.B. & Levin, B.E. (2006). Glucokinase is a critical regulator of ventromedial hypothalamic neuronal glucosensing. *Diabetes*, 55 (2), 412–420. <https://doi.org/10.2337/diabetes.55.02.06.db05-1229>
- Kang, L., Routh, V.H., Kuzhikandathil, E.V., Gaspers, L.D. & Levin, B.E. (2004). Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons. *Diabetes*, 53 (3), 549–559. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.3.549>
- Kaplan, A.M. & Vigna, S.R. (1994). Gastric inhibitory polypeptide (GIP) binding sites in rat brain. *Peptides*, 15 (2), 297–302. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(94\)90016-7](https://doi.org/10.1016/0196-9781(94)90016-7)
- Kavaliers, M. & Hirst, M. (1986). Inhibitory influences of FMRFamide and PLG on stress-induced opioid analgesia and activity. *Brain Research*, 372 (2), 370–374. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)91147-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)91147-9)

- Kern, W., Benedict, C., Schultes, B., Plohr, F., Moser, A., Born, J., Fehm, H.L. & Hallschmid, M. (2006). Low cerebrospinal fluid insulin levels in obese humans. *Diabetologia*, 49 (11), 2790–2792. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0409-y>
- Kiba, T. (2004). Relationships between the autonomic nervous system and the pancreas including regulation of regeneration and apoptosis: recent developments. *Pancreas*, 29 (2), e51-58. <https://doi.org/10.1097/00006676-200408000-00019>
- Killion, E.A., Wang, J., Yie, J., Shi, S.D.-H., Bates, D., Min, X., Komorowski, R., Hager, T., Deng, L., Atangan, L., Lu, S.-C., Kurzeja, R.J.M., Sivits, G., Lin, J., Chen, Q., Wang, Z., Thibault, S.A., Abbott, C.M., Meng, T., Clavette, B., Murawsky, C.M., Foltz, I.N., Rottman, J.B., Hale, C., Véniant, M.M. & Lloyd, D.J. (2018). Anti-obesity effects of GIPR antagonists alone and in combination with GLP-1R agonists in preclinical models. *Science Translational Medicine*, 10 (472), eaat3392. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat3392>
- Kim, J.K., Fillmore, J.J., Chen, Y., Yu, C., Moore, I.K., Pypaert, M., Lutz, E.P., Kako, Y., Velez-Carrasco, W., Goldberg, I.J., Breslow, J.L. & Shulman, G.I. (2001). Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (13), 7522–7527. <https://doi.org/10.1073/pnas.121164498>
- Kim, M.K., Reaven, G.M. & Kim, S.H. (2017). Dissecting the relationship between obesity and hyperinsulinemia: Role of insulin secretion and insulin clearance. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 25 (2), 378–383. <https://doi.org/10.1002/oby.21699>
- Kim, S.-J., Nian, C. & McIntosh, C.H.S. (2007). Activation of lipoprotein lipase by glucose-dependent insulinotropic polypeptide in adipocytes. A role for a protein kinase B, LKB1, and AMP-activated protein kinase cascade. *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (12), 8557–8567. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609088200>
- Kimura, K., Tanida, M., Nagata, N., Inaba, Y., Watanabe, H., Nagashimada, M., Ota, T., Asahara, S., Kido, Y., Matsumoto, M., Toshinai, K., Nakazato, M., Shibamoto, T., Kaneko, S., Kasuga, M. & Inoue, H. (2016). Central Insulin Action Activates Kupffer Cells by Suppressing Hepatic Vagal Activation via the Nicotinic Alpha 7 Acetylcholine Receptor. *Cell Reports*, 14 (10), 2362–2374. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.032>
- Kinzig, K.P., D'Alessio, D.A., Herman, J.P., Sakai, R.R., Vahl, T.P., Figueiredo, H.F., Murphy, E.K., Seeley, R.J. & Figueredo, H.F. (2003). CNS glucagon-like peptide-1 receptors mediate endocrine and anxiety responses to interoceptive and psychogenic stressors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23 (15), 6163–6170. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-15-06163.2003>
- Kitamura, T., Kitamura, Y., Kuroda, S., Hino, Y., Ando, M., Kotani, K., Konishi, H., Matsuzaki, H., Kikkawa, U., Ogawa, W. & Kasuga, M. (1999). Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Molecular and Cellular Biology*, 19 (9), 6286–6296. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.9.6286>
- Kjems, L.L., Holst, J.J., Vølund, A. & Madsbad, S. (2003). The influence of GLP-1 on glucose-stimulated insulin secretion: effects on beta-cell sensitivity in type 2 and nondiabetic subjects. *Diabetes*, 52 (2), 380–386. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.2.380>
- Klöppel, G., Löhr, M., Habich, K., Oberholzer, M. & Heitz, P.U. (1985). Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Survey and Synthesis of Pathology Research*, 4 (2), 110–125. <https://doi.org/10.1159/000156969>
- Knapper, J.M., Puddicombe, S.M., Morgan, L.M. & Fletcher, J.M. (1995). Investigations into the actions of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1(7-36)amide on lipoprotein lipase activity in explants of rat adipose tissue. *The Journal of Nutrition*, 125 (2), 183–188. <https://doi.org/10.1093/jn/125.2.183>

- Knight, Z.A., Hannan, K.S., Greenberg, M.L. & Friedman, J.M. (2010). Hyperleptinemia is required for the development of leptin resistance. *PloS One*, 5 (6), e11376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011376>
- Knop, F.K., Vilsbøll, T., Højberg, P.V., Larsen, S., Madsbad, S., Vølund, A., Holst, J.J. & Krarup, T. (2007). Reduced incretin effect in type 2 diabetes: cause or consequence of the diabetic state? *Diabetes*, 56 (8), 1951–1959. <https://doi.org/10.2337/db07-0100>
- Koch, C., Augustine, R.A., Steger, J., Ganjam, G.K., Benzler, J., Pracht, C., Lowe, C., Schwartz, M.W., Shepherd, P.R., Anderson, G.M., Grattan, D.R. & Tups, A. (2010). Leptin rapidly improves glucose homeostasis in obese mice by increasing hypothalamic insulin sensitivity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30 (48), 16180–16187. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3202-10.2010>
- Koch, L., Wunderlich, F.T., Seibler, J., Könner, A.C., Hampel, B., Irlenbusch, S., Brabant, G., Kahn, C.R., Schwenk, F. & Brüning, J.C. (2008). Central insulin action regulates peripheral glucose and fat metabolism in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 118 (6), 2132–2147. <https://doi.org/10.1172/JCI31073>
- Könner, A.C., Janoschek, R., Plum, L., Jordan, S.D., Rother, E., Ma, X., Xu, C., Enriori, P., Hampel, B., Barsh, G.S., Kahn, C.R., Cowley, M.A., Ashcroft, F.M. & Brüning, J.C. (2007). Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell Metabolism*, 5 (6), 438–449. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.004>
- Krarup, T., Saurbrey, N., Moody, A.J., Köhl, C. & Madsbad, S. (1987). Effect of porcine gastric inhibitory polypeptide on beta-cell function in type I and type II diabetes mellitus. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 36 (7), 677–682. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(87\)90153-3](https://doi.org/10.1016/0026-0495(87)90153-3)
- Krieger, J.-P., Arnold, M., Pettersen, K.G., Lossel, P., Langhans, W. & Lee, S.J. (2016). Knockdown of GLP-1 Receptors in Vagal Afferents Affects Normal Food Intake and Glycemia. *Diabetes*, 65 (1), 34–43. <https://doi.org/10.2337/db15-0973>
- Krieger, J.-P., Langhans, W. & Lee, S.J. (2015). Vagal mediation of GLP-1's effects on food intake and glycemia. *Physiology & Behavior*, 152 (Pt B), 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.06.001>
- Lancaster, G.I., Langley, K.G., Berglund, N.A., Kammoun, H.L., Reibe, S., Estevez, E., Weir, J., Mellett, N.A., Pernes, G., Conway, J.R.W., Lee, M.K.S., Timpson, P., Murphy, A.J., Masters, S.L., Gerondakis, S., Bartonicek, N., Kaczorowski, D.C., Dinger, M.E., Meikle, P.J., Bond, P.J. & Febbraio, M.A. (2018). Evidence that TLR4 Is Not a Receptor for Saturated Fatty Acids but Mediates Lipid-Induced Inflammation by Reprogramming Macrophage Metabolism. *Cell Metabolism*, 27 (5), 1096–1110.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.014>
- Larqué, C., Velasco, M., Navarro-Tableros, V., Duhne, M., Aguirre, J., Gutiérrez-Reyes, G., Moreno, J., Robles-Diaz, G., Hong, E. & Hiriart, M. (2011). Early endocrine and molecular changes in metabolic syndrome models. *IUBMB life*, 63 (10), 831–839. <https://doi.org/10.1002/iub.544>
- Larsen, P.J., Tang-Christensen, M., Holst, J.J. & Orskov, C. (1997a). Distribution of glucagon-like peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. *Neuroscience*, 77 (1), 257–270. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(96\)00434-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(96)00434-4)
- Larsen, P.J., Tang-Christensen, M. & Jessop, D.S. (1997b). Central administration of glucagon-like peptide-1 activates hypothalamic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology*, 138 (10), 4445–4455. <https://doi.org/10.1210/endo.138.10.5270>
- Lawler, H.M., Underkofler, C.M., Kern, P.A., Erickson, C., Bredbeck, B. & Rasouli, N. (2016). Adipose Tissue Hypoxia, Inflammation, and Fibrosis in Obese Insulin-Sensitive and Obese Insulin-Resistant Subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 101 (4), 1422–1428. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-4125>
- Le Marec, O., Neveu, C., Lefranc, B., Dubessy, C., Boutin, J.A., Do-Régo, J.-C., Costentin, J., Tonon, M.-C., Tena-Sempere, M., Vaudry, H. & Leprince, J. (2011). Structure-activity relationships of

- a series of analogues of the RFamide-related peptide 26RFa. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54 (13), 4806–4814. <https://doi.org/10.1021/jm200418c>
- Le Solliec, M.-A., Arabo, A., Picot, M., Leprince, J., Chartrel, N. & Prévost, G. (2021). Actualité sur l'implication du système peptidergique 26RFa/GPR103 dans la régulation de la glycémie. *Médecine des Maladies Métaboliques*,. <https://doi.org/10.1016/j.mmm.2021.02.007>
- Lectez, B., Jeandel, L., El-Yamani, F.-Z., Arthaud, S., Alexandre, D., Mardargent, A., Jégou, S., Mounien, L., Bizet, P., Magoul, R., Anouar, Y. & Chartrel, N. (2009). The Orexigenic Activity of the Hypothalamic Neuropeptide 26RFa Is Mediated by the Neuropeptide Y and Proopiomelanocortin Neurons of the Arcuate Nucleus. *Endocrinology*, 150 (5), 2342–2350. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1432>
- Lee, D.K., Nguyen, T., Lynch, K.R., Cheng, R., Vanti, W.B., Arkhitko, O., Lewis, T., Evans, J.F., George, S.R. & O'Dowd, B.F. (2001). Discovery and mapping of ten novel G protein-coupled receptor genes. *Gene*, 275 (1), 83–91. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(01\)00651-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(01)00651-5)
- Lee, Y.S., Kim, J.-W., Osborne, O., Oh, D.Y., Sasik, R., Schenk, S., Chen, A., Chung, H., Murphy, A., Watkins, S.M., Quehenberger, O., Johnson, R.S. & Olefsky, J.M. (2014). Increased adipocyte O₂ consumption triggers HIF-1 α , causing inflammation and insulin resistance in obesity. *Cell*, 157 (6), 1339–1352. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.012>
- Lehr, S., Hartwig, S., Lamers, D., Famulla, S., Müller, S., Hanisch, F.-G., Cuvelier, C., Ruige, J., Eckardt, K., Ouwens, D.M., Sell, H. & Eckel, J. (2012). Identification and validation of novel adipokines released from primary human adipocytes. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 11 (1), M111.010504. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.010504>
- Leloup, C., Arluison, M., Lepetit, N., Cartier, N., Marfaing-Jallat, P., Ferré, P. & Pénicaud, L. (1994). Glucose transporter 2 (GLUT 2): expression in specific brain nuclei. *Brain Research*, 638 (1–2), 221–226. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90653-x](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90653-x)
- Leprince, J., Bagnol, D., Bureau, R., Fukusumi, S., Granata, R., Hinuma, S., Larhammar, D., Primeaux, S., Santos, J.S.O., Tsutsui, K., Ukena, K. & Vaudry, H. (2017). The Arg–Phe-amide peptide 26RFa/glutamine RF-amide peptide and its receptor: IUPHAR Review 24. *British Journal of Pharmacology*, 174 (20), 3573–3607. <https://doi.org/10.1111/bph.13907>
- Lewis, G.F., Carpentier, A.C., Pereira, S., Hahn, M. & Giacca, A. (2021). Direct and indirect control of hepatic glucose production by insulin. *Cell Metabolism*, 33 (4), 709–720. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.03.007>
- Lin, E.-J.D., Sainsbury, A., Lee, N.J., Boey, D., Couzens, M., Enriquez, R., Slack, K., Bland, R., During, M.J. & Herzog, H. (2006). Combined deletion of Y1, Y2, and Y4 receptors prevents hypothalamic neuropeptide Y overexpression-induced hyperinsulinemia despite persistence of hyperphagia and obesity. *Endocrinology*, 147 (11), 5094–5101. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0097>
- Liu, J., Conde, K., Zhang, P., Lillascharoen, V., Xu, Z., Lim, B.K., Seeley, R.J., Zhu, J.J., Scott, M.M. & Pang, Z.P. (2017). Enhanced AMPA Receptor Trafficking Mediates the Anorexigenic Effect of Endogenous Glucagon-like Peptide-1 in the Paraventricular Hypothalamus. *Neuron*, 96 (4), 897-909.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.042>
- Liu, Y., Zhang, Y., Li, S., Huang, W., Liu, X., Lu, D., Meng, Z. & Lin, H. (2009). Molecular cloning and functional characterization of the first non-mammalian 26RFa/QRFP orthologue in Goldfish, *Carassius auratus*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 303 (1–2), 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.01.009>
- Llewellyn-Smith, I.J., Reimann, F., Gribble, F.M. & Trapp, S. (2011). Preproglucagon neurons project widely to autonomic control areas in the mouse brain. *Neuroscience*, 180, 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.02.023>
- Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., Parrillo, L., Formisano, P., Raciti, G.A., Beguinot, F. & Miele, C. (2019). Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic

- Complications. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (9), E2358. <https://doi.org/10.3390/ijms20092358>
- Lundqvist, M.H., Almby, K., Abrahamsson, N. & Eriksson, J.W. (2019). Is the Brain a Key Player in Glucose Regulation and Development of Type 2 Diabetes? *Frontiers in Physiology*, 10, 457. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00457>
- Luo, L. & Liu, M. (2016). Adipose tissue in control of metabolism. *The Journal of Endocrinology*, 231 (3), R77–R99. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0211>
- Lynch, R.M., Tompkins, L.S., Brooks, H.L., Dunn-Meynell, A.A. & Levin, B.E. (2000). Localization of glucokinase gene expression in the rat brain. *Diabetes*, 49 (5), 693–700. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.5.693>
- Lynn, F.C., Pamir, N., Ng, E.H., McIntosh, C.H., Kieffer, T.J. & Pederson, R.A. (2001). Defective glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor expression in diabetic fatty Zucker rats. *Diabetes*, 50 (5), 1004–1011. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.5.1004>
- Maekawa, F., Toyoda, Y., Torii, N., Miwa, I., Thompson, R.C., Foster, D.L., Tsukahara, S., Tsukamura, H. & Maeda, K. (2000). Localization of glucokinase-like immunoreactivity in the rat lower brain stem: for possible location of brain glucose-sensing mechanisms. *Endocrinology*, 141 (1), 375–384. <https://doi.org/10.1210/endo.141.1.7234>
- Maida, A., Hansotia, T., Longuet, C., Seino, Y. & Drucker, D.J. (2009). Differential importance of glucose-dependent insulinotropic polypeptide vs glucagon-like peptide 1 receptor signaling for beta cell survival in mice. *Gastroenterology*, 137 (6), 2146–2157. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.09.004>
- Marks, J.L., Porte, D., Stahl, W.L. & Baskin, D.G. (1990). Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology*, 127 (6), 3234–3236. <https://doi.org/10.1210/endo-127-6-3234>
- Martínez, F., Cifuentes, M., Tapia, J.C. & Nualart, F. (2019). The median eminence as the hypothalamic area involved in rapid transfer of glucose to the brain: functional and cellular mechanisms. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 97 (8), 1085–1097. <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01799-5>
- Marty, N., Dallaporta, M., Foretz, M., Emery, M., Tarussio, D., Bady, I., Binnert, C., Beermann, F. & Thorens, B. (2005). Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors. *The Journal of Clinical Investigation*, 115 (12), 3545–3553. <https://doi.org/10.1172/JCI26309>
- Mazucanti, C.H., Liu, Q.-R., Lang, D., Huang, N., O’Connell, J.F., Camandola, S. & Egan, J.M. (2019). Release of insulin produced by the choroid plexis is regulated by serotonergic signaling. *JCI insight*, 4 (23), 131682. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.131682>
- McCulloch, L.J., van de Bunt, M., Braun, M., Frayn, K.N., Clark, A. & Gloyn, A.L. (2011). GLUT2 (SLC2A2) is not the principal glucose transporter in human pancreatic beta cells: implications for understanding genetic association signals at this locus. *Molecular Genetics and Metabolism*, 104 (4), 648–653. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.08.026>
- McIntosh, C.H., Bremsak, I., Lynn, F.C., Gill, R., Hinke, S.A., Gelling, R., Nian, C., McKnight, G., Jaspers, S. & Pederson, R.A. (1999). Glucose-dependent insulinotropic polypeptide stimulation of lipolysis in differentiated 3T3-L1 cells: wortmannin-sensitive inhibition by insulin. *Endocrinology*, 140 (1), 398–404. <https://doi.org/10.1210/endo.140.1.6464>
- Meek, T.H., Nelson, J.T., Matsen, M.E., Dorfman, M.D., Guyenet, S.J., Damian, V., Allison, M.B., Scarlett, J.M., Nguyen, H.T., Thaler, J.P., Olson, D.P., Myers, M.G., Schwartz, M.W. & Morton, G.J. (2016). Functional identification of a neurocircuit regulating blood glucose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113 (14), E2073–2082. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521160113>

- Meier, J.J., Deacon, C.F., Schmidt, W.E., Holst, J.J. & Nauck, M.A. (2007). Suppression of glucagon secretion is lower after oral glucose administration than during intravenous glucose administration in human subjects. *Diabetologia*, 50 (4), 806–813. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0598-z>
- Meijer, R.I., Gray, S.M., Aylor, K.W. & Barrett, E.J. (2016). Pathways for insulin access to the brain: the role of the microvascular endothelial cell. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 311 (5), H1132–H1138. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00081.2016>
- Mercer, J.G., Hoggard, N., Williams, L.M., Lawrence, C.B., Hannah, L.T., Morgan, P.J. & Trayhurn, P. (1996). Coexpression of leptin receptor and preproneuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology*, 8 (10), 733–735. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.1996.05161.x>
- Mifsud, S., Schembri, E.L. & Gruppetta, M. (2018). Stress-induced hyperglycaemia. *British Journal of Hospital Medicine (London, England: 2005)*, 79 (11), 634–639. <https://doi.org/10.12968/hmed.2018.79.11.634>
- Milanski, M., Degasperis, G., Coope, A., Morari, J., Denis, R., Cintra, D.E., Tsukumo, D.M.L., Anhe, G., Amaral, M.E., Takahashi, H.K., Curi, R., Oliveira, H.C., Carvalheira, J.B.C., Bordin, S., Saad, M.J. & Velloso, L.A. (2009). Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29 (2), 359–370. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2760-08.2009>
- Mistry, A.M., Swick, A.G. & Romsos, D.R. (1997). Leptin rapidly lowers food intake and elevates metabolic rates in lean and ob/ob mice. *The Journal of Nutrition*, 127 (10), 2065–2072. <https://doi.org/10.1093/jn/127.10.2065>
- Mitrakou, A., Ryan, C., Veneman, T., Mokban, M., Jenssen, T., Kiss, I., Durrant, J., Cryer, P. & Gerich, J. (1991). Hierarchy of glycemic thresholds for counterregulatory hormone secretion, symptoms, and cerebral dysfunction. *The American Journal of Physiology*, 260 (1 Pt 1), E67–74. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1991.260.1.E67>
- Miyawaki, K., Yamada, Y., Ban, N., Ihara, Y., Tsukiyama, K., Zhou, H., Fujimoto, S., Oku, A., Tsuda, K., Toyokuni, S., Hiai, H., Mizunoya, W., Fushiki, T., Holst, J.J., Makino, M., Tashita, A., Kobara, Y., Tsubamoto, Y., Jinnouchi, T., Jomori, T. & Seino, Y. (2002). Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. *Nature Medicine*, 8 (7), 738–742. <https://doi.org/10.1038/nm727>
- Moran, A., Jacobs, D.R., Steinberger, J., Hong, C.P., Prineas, R., Luepker, R. & Sinaiko, A.R. (1999). Insulin resistance during puberty: results from clamp studies in 357 children. *Diabetes*, 48 (10), 2039–2044. <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.10.2039>
- Moriya, R., Sano, H., Umeda, T., Ito, M., Takahashi, Y., Matsuda, M., Ishihara, A., Kanatani, A. & Iwaasa, H. (2006). RFamide Peptide QRFP43 Causes Obesity with Hyperphagia and Reduced Thermogenesis in Mice. *Endocrinology*, 147 (6), 2916–2922. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1580>
- Mortensen, K., Christensen, L.L., Holst, J.J. & Orskov, C. (2003). GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine. *Regulatory Peptides*, 114 (2–3), 189–196. [https://doi.org/10.1016/s0167-0115\(03\)00125-3](https://doi.org/10.1016/s0167-0115(03)00125-3)
- Mortensen, K., Petersen, L.L. & Ørskov, C. (2000). Colocalization of GLP-1 and GIP in human and porcine intestine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 921, 469–472. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb07017.x>
- Motoshima, H., Wu, X., Sinha, M.K., Hardy, V.E., Rosato, E.L., Barbot, D.J., Rosato, F.E. & Goldstein, B.J. (2002). Differential regulation of adiponectin secretion from cultured human omental and subcutaneous adipocytes: effects of insulin and rosiglitazone. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87 (12), 5662–5667. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-020635>

- Mountjoy, P.D., Bailey, S.J. & Rutter, G.A. (2007). Inhibition by glucose or leptin of hypothalamic neurons expressing neuropeptide Y requires changes in AMP-activated protein kinase activity. *Diabetologia*, 50 (1), 168–177. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0473-3>
- Mroz, P.A., Finan, B., Gelfanov, V., Yang, B., Tschöp, M.H., DiMarchi, R.D. & Perez-Tilve, D. (2019). Optimized GIP analogs promote body weight lowering in mice through GIPR agonism not antagonism. *Molecular Metabolism*, 20, 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.12.001>
- Müller, T.D., Finan, B., Bloom, S.R., D’Alessio, D., Drucker, D.J., Flatt, P.R., Fritsche, A., Gribble, F., Grill, H.J., Habener, J.F., Holst, J.J., Langhans, W., Meier, J.J., Nauck, M.A., Perez-Tilve, D., Pocai, A., Reimann, F., Sandoval, D.A., Schwartz, T.W., Seeley, R.J., Stemmer, K., Tang-Christensen, M., Woods, S.C., DiMarchi, R.D. & Tschöp, M.H. (2019). Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). *Molecular Metabolism*, 30, 72–130. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.09.010>
- Müller, T.D., Finan, B., Clemmensen, C., DiMarchi, R.D. & Tschöp, M.H. (2017). The New Biology and Pharmacology of Glucagon. *Physiological Reviews*, 97 (2), 721–766. <https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2016>
- Mulumba, M., Jossart, C., Granata, R., Gallo, D., Escher, E., Ghigo, E., Servant, M.J., Marleau, S. & Ong, H. (2010). GPR103b functions in the peripheral regulation of adipogenesis. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 24 (8), 1615–1625. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0010>
- Münzberg, H., Flier, J.S. & Bjørbaek, C. (2004). Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology*, 145 (11), 4880–4889. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0726>
- Münzberg, H. & Morrison, C.D. (2015). Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism: clinical and experimental*, 64 (1), 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.09.010>
- Muroya, S., Yada, T., Shioda, S. & Takigawa, M. (1999). Glucose-sensitive neurons in the rat arcuate nucleus contain neuropeptide Y. *Neuroscience Letters*, 264 (1–3), 113–116. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(99\)00185-8](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(99)00185-8)
- Nauck, M., Stöckmann, F., Ebert, R. & Creutzfeldt, W. (1986). Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*, 29 (1), 46–52. <https://doi.org/10.1007/BF02427280>
- Nauck, M.A. & Meier, J.J. (2018). Incretin hormones: Their role in health and disease. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 20 Suppl 1, 5–21. <https://doi.org/10.1111/dom.13129>
- Nauck, M.A., Quast, D.R., Wefers, J. & Pfeiffer, A.F.H. (2021). The evolving story of incretins (GIP and GLP-1) in metabolic and cardiovascular disease: A pathophysiological update. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 23 Suppl 3, 5–29. <https://doi.org/10.1111/dom.14496>
- Nauck, M.A., Vardarli, I., Deacon, C.F., Holst, J.J. & Meier, J.J. (2011). Secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in type 2 diabetes: what is up, what is down? *Diabetologia*, 54 (1), 10–18. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1896-4>
- Navale, A.M. & Paranjape, A.N. (2016). Glucose transporters: physiological and pathological roles. *Biophysical Reviews*, 8 (1), 5–9. <https://doi.org/10.1007/s12551-015-0186-2>
- Nishizawa, M., Nakabayashi, H., Uehara, K., Nakagawa, A., Uchida, K. & Koya, D. (2013). Intraportal GLP-1 stimulates insulin secretion predominantly through the hepatoportal-pancreatic vagal reflex pathways. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 305 (3), E376–387. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00565.2012>
- Nolan, C.J., Madiraju, M.S.R., Delghingaro-Augusto, V., Peyot, M.-L. & Prentki, M. (2006). Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes*, 55 Suppl 2, S16–23. <https://doi.org/10.2337/db06-s003>
- Nørregaard, P.K., Deryabina, M.A., Tofteng Shelton, P., Fog, J.U., Daugaard, J.R., Eriksson, P.-O., Larsen, L.F. & Jessen, L. (2018). A novel GIP analogue, ZP4165, enhances glucagon-like peptide-1-induced body weight loss and improves glycaemic control in rodents. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 20 (1), 60–68. <https://doi.org/10.1111/dom.13034>

- Nyberg, J., Jacobsson, C., Anderson, M.F. & Eriksson, P.S. (2007). Immunohistochemical distribution of glucose-dependent insulintropic polypeptide in the adult rat brain. *Journal of Neuroscience Research*, 85 (10), 2099–2119. <https://doi.org/10.1002/jnr.21349>
- Obici, S., Feng, Z., Karkanias, G., Baskin, D.G. & Rossetti, L. (2002a). Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nature Neuroscience*, 5 (6), 566–572. <https://doi.org/10.1038/nn0602-861>
- Obici, S., Zhang, B.B., Karkanias, G. & Rossetti, L. (2002b). Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nature Medicine*, 8 (12), 1376–1382. <https://doi.org/10.1038/nm1202-798>
- Ogurtsova, K., da Rocha Fernandes, J.D., Huang, Y., Linnenkamp, U., Guariguata, L., Cho, N.H., Cavan, D., Shaw, J.E. & Makaroff, L.E. (2017). IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 128, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.03.024>
- Oh, Y.S., Bae, G.D., Baek, D.J., Park, E.-Y. & Jun, H.-S. (2018). Fatty Acid-Induced Lipotoxicity in Pancreatic Beta-Cells During Development of Type 2 Diabetes. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 384. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00384>
- Okamoto, K., Yamasaki, M., Takao, K., Soya, S., Iwasaki, M., Sasaki, K., Magoori, K., Sakakibara, I., Miyakawa, T., Mieda, M., Watanabe, M., Sakai, J., Yanagisawa, M. & Sakurai, T. (2016). QRFP-Deficient Mice Are Hypophagic, Lean, Hypoactive and Exhibit Increased Anxiety-Like Behavior. *PloS One*, 11 (11), e0164716. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164716>
- Olivares-Reyes, J.A., Arellano-Plancarte, A. & Castillo-Hernandez, J.R. (2009). Angiotensin II and the development of insulin resistance: implications for diabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 302 (2), 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.12.011>
- Oomura, Y., Ono, T., Ooyama, H. & Wayner, M.J. (1969). Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. *Nature*, 222 (5190), 282–284. <https://doi.org/10.1038/222282a0>
- Oprescu, A.I., Bikopoulos, G., Naassan, A., Allister, E.M., Tang, C., Park, E., Uchino, H., Lewis, G.F., Fantus, I.G., Rozakis-Adcock, M., Wheeler, M.B. & Giacca, A. (2007). Free fatty acid-induced reduction in glucose-stimulated insulin secretion: evidence for a role of oxidative stress in vitro and in vivo. *Diabetes*, 56 (12), 2927–2937. <https://doi.org/10.2337/db07-0075>
- Osundiji, M.A. & Evans, M.L. (2013). Brain control of insulin and glucagon secretion. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 42 (1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2012.11.006>
- Pais, R., Gribble, F.M. & Reimann, F. (2016). Stimulation of incretin secreting cells. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*, 7 (1), 24–42. <https://doi.org/10.1177/2042018815618177>
- Palmiter, R.D., Erickson, J.C., Hollopeter, G., Baraban, S.C. & Schwartz, M.W. (1998). Life without neuropeptide Y. *Recent Progress in Hormone Research*, 53, 163–199
- Palotai, M. & Telegdy, G. (2016). Anxiolytic effect of the GPR103 receptor agonist peptide P550 (homolog of neuropeptide 26RFa) in mice. Involvement of neurotransmitters. *Peptides*, 82, 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.05.004>
- Panjwani, N., Mulvihill, E.E., Longuet, C., Yusta, B., Campbell, J.E., Brown, T.J., Streutker, C., Holland, D., Cao, X., Baggio, L.L. & Drucker, D.J. (2013). GLP-1 receptor activation indirectly reduces hepatic lipid accumulation but does not attenuate development of atherosclerosis in diabetic male ApoE(-/-) mice. *Endocrinology*, 154 (1), 127–139. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1937>
- Papatheodorou, I., Fonseca, N.A., Keays, M., Tang, Y.A., Barrera, E., Bazant, W., Burke, M., Füllgrabe, A., Fuentes, A.M.-P., George, N., Huerta, L., Koskinen, S., Mohammed, S., Geniza, M., Preece, J., Jaiswal, P., Jarnuczak, A.F., Huber, W., Stegle, O., Vizcaino, J.A., Brazma, A. & Petryszak,

- R. (2018). Expression Atlas: gene and protein expression across multiple studies and organisms. *Nucleic Acids Research*, 46 (D1), D246–D251. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1158>
- Paranjape, S.A., Chan, O., Zhu, W., Horblitt, A.M., Grillo, C.A., Wilson, S., Reagan, L. & Sherwin, R.S. (2011). Chronic reduction of insulin receptors in the ventromedial hypothalamus produces glucose intolerance and islet dysfunction in the absence of weight gain. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 301 (5), E978–983. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00304.2011>
- Paratore, S., Ciotti, M.T., Basille, M., Vaudry, D., Gentile, A., Parenti, R., Calissano, P. & Cavallaro, S. (2011). Gastric inhibitory polypeptide and its receptor are expressed in the central nervous system and support neuronal survival. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*, 11 (3), 210–222. <https://doi.org/10.2174/187152411798047771>
- Parker, H.E., Reimann, F. & Gribble, F.M. (2010). Molecular mechanisms underlying nutrient-stimulated incretin secretion. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 12, e1. <https://doi.org/10.1017/S146239940900132X>
- 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., Elmquist, J.K., Cowley, M.A. & Lowell, B.B. (2007). Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature*, 449 (7159), 228–232. <https://doi.org/10.1038/nature06098>
- Pasarica, M., Sereda, O.R., Redman, L.M., Albarado, D.C., Hymel, D.T., Roan, L.E., Rood, J.C., Burk, D.H. & Smith, S.R. (2009). Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes*, 58 (3), 718–725. <https://doi.org/10.2337/db08-1098>
- Patel, S.R., Murphy, K.G., Thompson, E.L., Patterson, M., Curtis, A.E., Ghatei, M.A. & Bloom, S.R. (2008). Pyroglutamylated RFamide peptide 43 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis via gonadotropin-releasing hormone in rats. *Endocrinology*, 149 (9), 4747–4754. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1562>
- Pathak, V., Vasu, S., Flatt, P.R. & Irwin, N. (2014). Effects of chronic exposure of clonal β -cells to elevated glucose and free fatty acids on incretin receptor gene expression and secretory responses to GIP and GLP-1. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 16 (4), 357–365. <https://doi.org/10.1111/dom.12227>
- Pérez-Tilve, D., González-Matías, L., Aulinger, B.A., Alvarez-Crespo, M., Gil-Lozano, M., Alvarez, E., Andrade-Olivie, A.M., Tschöp, M.H., D'Alessio, D.A. & Mallo, F. (2010). Exendin-4 increases blood glucose levels acutely in rats by activation of the sympathetic nervous system. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 298 (5), E1088–1096. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00464.2009>
- Perley, M.J. & Kipnis, D.M. (1967). Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *The Journal of Clinical Investigation*, 46 (12), 1954–1962. <https://doi.org/10.1172/JCI105685>
- Perseghin, G., Scifo, P., De Cobelli, F., Pagliato, E., Battezzati, A., Arcelloni, C., Vanzulli, A., Testolin, G., Pozza, G., Del Maschio, A. & Luzi, L. (1999). Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a ^1H - ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes*, 48 (8), 1600–1606. <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.8.1600>
- Petersen, K.F., Hendler, R., Price, T., Perseghin, G., Rothman, D.L., Held, N., Amatruda, J.M. & Shulman, G.I. (1998). $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$ NMR studies on the mechanism of insulin resistance in obesity. *Diabetes*, 47 (3), 381–386. <https://doi.org/10.2337/diabetes.47.3.381>
- Petersen, M.C. & Shulman, G.I. (2018). Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiological Reviews*, 98 (4), 2133–2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>

- Piché, M.-E., Tchernof, A. & Després, J.-P. (2020). Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circulation Research*, 126 (11), 1477–1500. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316101>
- Piteau, S., Olver, A., Kim, S.-J., Winter, K., Pospisilik, J.A., Lynn, F., Manhart, S., Demuth, H.-U., Speck, M., Pederson, R.A. & McIntosh, C.H.S. (2007). Reversal of islet GIP receptor down-regulation and resistance to GIP by reducing hyperglycemia in the Zucker rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362 (4), 1007–1012. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.115>
- Popa, C., Netea, M.G., van Riel, P.L.C.M., van der Meer, J.W.M. & Stalenhoef, A.F.H. (2007). The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *Journal of Lipid Research*, 48 (4), 751–762. <https://doi.org/10.1194/jlr.R600021-JLR200>
- Pozo, M. & Claret, M. (2018). Hypothalamic Control of Systemic Glucose Homeostasis: The Pancreas Connection. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 29 (8), 581–594. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.05.001>
- Preitner, F., Ibberson, M., Franklin, I., Binnert, C., Pende, M., Gjinovci, A., Hansotia, T., Drucker, D.J., Wollheim, C., Burcelin, R. & Thorens, B. (2004). Gluco-incretins control insulin secretion at multiple levels as revealed in mice lacking GLP-1 and GIP receptors. *The Journal of Clinical Investigation*, 113 (4), 635–645. <https://doi.org/10.1172/JCI20518>
- Pretz, D., Le Foll, C., Rizwan, M.Z., Lutz, T.A. & Tups, A. (2021). Hyperleptinemia as a contributing factor for the impairment of glucose intolerance in obesity. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 35 (2), e21216. <https://doi.org/10.1096/fj.202001147R>
- Prévost, G., Arabo, A., Le Sollic, M.-A., Bons, J., Picot, M., Maucotel, J., Berrahmoune, H., El Mehdi, M., Cherifi, S., Benani, A., Nédélec, E., Coëffier, M., Leprince, J., Nordqvist, A., Brunel, V., Déchelotte, P., Lefebvre, H., Anouar, Y. & Chartrel, N. (2019a). Neuropeptide 26RFa (QRFP) is a key regulator of glucose homeostasis and its activity is markedly altered in obese/hyperglycemic mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 317 (1), E147–E157. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00540.2018>
- Prévost, G., Jeandel, L., Arabo, A., Coëffier, M., El Ouahli, M., Picot, M., Alexandre, D., Gobet, F., Leprince, J., Berrahmoune, H., Déchelotte, P., Malagon, M., Bonner, C., Kerr-Conte, J., Chigr, F., Lefebvre, H., Anouar, Y. & Chartrel, N. (2015). Hypothalamic Neuropeptide 26RFa Acts as an Incretin to Regulate Glucose Homeostasis. *Diabetes*, 64 (8), 2805–2816. <https://doi.org/10.2337/db14-1864>
- Prévost, G., Picot, M., Le Sollic, M.-A., Arabo, A., Berrahmoune, H., El Mehdi, M., Cherifi, S., Benani, A., Nédélec, E., Gobet, F., Brunel, V., Leprince, J., Lefebvre, H., Anouar, Y. & Chartrel, N. (2019b). The neuropeptide 26RFa in the human gut and pancreas: potential involvement in glucose homeostasis. *Endocrine Connections*, 8 (7), 941–951. <https://doi.org/10.1530/EC-19-0247>
- Primeaux, S.D., Blackmon, C., Barnes, M.J., Braymer, H.D. & Bray, G.A. (2008). Central administration of the RFamide peptides, QRFP-26 and QRFP-43, increases high fat food intake in rats. *Peptides*, 29 (11), 1994–2000. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.07.024>
- Puddu, A., Sanguineti, R., Montecucco, F. & Viviani, G.L. (2015). Effects of High Glucose Levels and Glycated Serum on GIP Responsiveness in the Pancreatic Beta Cell Line HIT-T15. *Journal of Diabetes Research*, 2015, 326359. <https://doi.org/10.1155/2015/326359>
- Purkayastha, S., Zhang, H., Zhang, G., Ahmed, Z., Wang, Y. & Cai, D. (2011). Neural dysregulation of peripheral insulin action and blood pressure by brain endoplasmic reticulum stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (7), 2939–2944. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006875108>

- Quelven, I., Roussin, A. & Zajac, J.-M. (2004). Functional consequences of neuropeptide FF receptors stimulation in mouse: a cerebral glucose uptake study. *Neuroscience*, 126 (2), 441–449. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.03.052>
- Quesada, I., Tudurí, E., Ripoll, C. & Nadal, A. (2008). Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *The Journal of Endocrinology*, 199 (1), 5–19. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0290>
- Rabhi, N., Salas, E., Froguel, P. & Annicotte, J.-S. (2014). Role of the unfolded protein response in β cell compensation and failure during diabetes. *Journal of Diabetes Research*, 2014, 795171. <https://doi.org/10.1155/2014/795171>
- Rahier, J., Guiot, Y., Goebbels, R.M., Sempoux, C. & Henquin, J.C. (2008). Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 10 Suppl 4, 32–42. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2008.00969.x>
- Rahman, M.S., Hossain, K.S., Das, S., Kundu, S., Adegoke, E.O., Rahman, M.A., Hannan, M.A., Uddin, M.J. & Pang, M.-G. (2021). Role of Insulin in Health and Disease: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (12), 6403. <https://doi.org/10.3390/ijms22126403>
- Ramanjaneya, M., Karteris, E., Chen, J., Rucinski, M., Ziolkowska, A., Ahmed, N., Kagerer, S., Jöhren, O., Lehnert, H., Malendowicz, L.K. & Randevara, H.S. (2013). QRFP induces aldosterone production via PKC and T-type calcium channel-mediated pathways in human adrenocortical cells: evidence for a novel role of GPR103. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 305 (9), E1049–1058. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00191.2013>
- Remedi, M.S. & Emfinger, C. (2016). Pancreatic β -cell identity in diabetes. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 18 Suppl 1, 110–116. <https://doi.org/10.1111/dom.12727>
- Rhea, E.M., Rask-Madsen, C. & Banks, W.A. (2018). Insulin transport across the blood–brain barrier can occur independently of the insulin receptor. *The Journal of Physiology*, 596 (19), 4753–4765. <https://doi.org/10.1113/JP276149>
- Richards, P., Parker, H.E., Adriaenssens, A.E., Hodgson, J.M., Cork, S.C., Trapp, S., Gribble, F.M. & Reimann, F. (2014). Identification and characterization of GLP-1 receptor-expressing cells using a new transgenic mouse model. *Diabetes*, 63 (4), 1224–1233. <https://doi.org/10.2337/db13-1440>
- Roden, M., Price, T.B., Perseghin, G., Petersen, K.F., Rothman, D.L., Cline, G.W. & Shulman, G.I. (1996). Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 97 (12), 2859–2865. <https://doi.org/10.1172/JCI118742>
- Röder, P.V., Wu, B., Liu, Y. & Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & Molecular Medicine*, 48 (3), e219. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.6>
- Roh, E., Song, D.K. & Kim, M.-S. (2016). Emerging role of the brain in the homeostatic regulation of energy and glucose metabolism. *Experimental & Molecular Medicine*, 48, e216. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.4>
- Romanatto, T., Cesquini, M., Amaral, M.E., Roman, E.A., Moraes, J.C., Torsoni, M.A., Cruz-Neto, A.P. & Velloso, L.A. (2007). TNF-alpha acts in the hypothalamus inhibiting food intake and increasing the respiratory quotient--effects on leptin and insulin signaling pathways. *Peptides*, 28 (5), 1050–1058. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.03.006>
- Rondinone, C.M., Carvalho, E., Rahn, T., Manganiello, V.C., Degerman, E. & Smith, U.P. (2000). Phosphorylation of PDE3B by phosphatidylinositol 3-kinase associated with the insulin receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (14), 10093–10098. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.14.10093>
- Rorsman, P. & Braun, M. (2013). Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annual Review of Physiology*, 75, 155–179. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183754>

- Rosenstock, J., Wysham, C., Frías, J.P., Kaneko, S., Lee, C.J., Fernández Landó, L., Mao, H., Cui, X., Karanikas, C.A. & Thieu, V.T. (2021). Efficacy and safety of a novel dual GIP and GLP-1 receptor agonist tirzepatide in patients with type 2 diabetes (SURPASS-1): a double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, 398 (10295), 143–155. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01324-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01324-6)
- Rushakoff, R.J., Goldfine, I.D., Carter, J.D. & Liddle, R.A. (1987). Physiological concentrations of cholecystokinin stimulate amino acid-induced insulin release in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 65 (3), 395–401. <https://doi.org/10.1210/jcem-65-3-395>
- Ruud, J., Steculorum, S.M. & Brüning, J.C. (2017). Neuronal control of peripheral insulin sensitivity and glucose metabolism. *Nature Communications*, 8, 15259. <https://doi.org/10.1038/ncomms15259>
- Sabio, G., Cavanagh-Kyros, J., Barrett, T., Jung, D.Y., Ko, H.J., Ong, H., Morel, C., Mora, A., Reilly, J., Kim, J.K. & Davis, R.J. (2010). Role of the hypothalamic–pituitary–thyroid axis in metabolic regulation by JNK1. *Genes & Development*, 24 (3), 256–264. <https://doi.org/10.1101/gad.1878510>
- Sainsbury, A., Rohner-Jeanrenaud, F., Cusin, I., Zakrzewska, K.E., Halban, P.A., Gaillard, R.C. & Jeanrenaud, B. (1997). Chronic central neuropeptide Y infusion in normal rats: status of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis, and vagal mediation of hyperinsulinaemia. *Diabetologia*, 40 (11), 1269–1277. <https://doi.org/10.1007/s001250050820>
- Sajja, R.K., Prasad, S. & Cucullo, L. (2014). Impact of altered glycaemia on blood-brain barrier endothelium: an in vitro study using the hCMEC/D3 cell line. *Fluids and barriers of the CNS*, 11 (1), 8. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-11-8>
- Sakuraba, H., Mizukami, H., Yagihashi, N., Wada, R., Hanyu, C. & Yagihashi, S. (2002). Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia*, 45 (1), 85–96. <https://doi.org/10.1007/s125-002-8248-z>
- Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R.M., Tanaka, H., Williams, S.C., Richardson, J.A., Kozlowski, G.P., Wilson, S., Arch, J.R., Buckingham, R.E., Haynes, A.C., Carr, S.A., Annan, R.S., McNulty, D.E., Liu, W.S., Terrett, J.A., Elshourbagy, N.A., Bergsma, D.J. & Yanagisawa, M. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92 (4), 573–585. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80949-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80949-6)
- Salera, M., Giacomoni, P., Pironi, L., Cornia, G., Capelli, M., Marini, A., Benfenati, F., Miglioli, M. & Barbara, L. (1982). Gastric inhibitory polypeptide release after oral glucose: relationship to glucose intolerance, diabetes mellitus, and obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 55 (2), 329–336. <https://doi.org/10.1210/jcem-55-2-329>
- Saltiel, A.R. (2016). Insulin Signaling in the Control of Glucose and Lipid Homeostasis. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 233, 51–71. https://doi.org/10.1007/164_2015_14
- Samuel, V.T., Liu, Z.-X., Qu, X., Elder, B.D., Bilz, S., Befroy, D., Romanelli, A.J. & Shulman, G.I. (2004). Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (31), 32345–32353. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313478200>
- Samuel, V.T., Liu, Z.-X., Wang, A., Beddow, S.A., Geisler, J.G., Kahn, M., Zhang, X., Monia, B.P., Bhanot, S. & Shulman, G.I. (2007). Inhibition of protein kinase Cepsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 117 (3), 739–745. <https://doi.org/10.1172/JCI30400>
- Samuel, V.T. & Shulman, G.I. (2016). The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *The Journal of Clinical Investigation*, 126 (1), 12–22. <https://doi.org/10.1172/JCI77812>

- Sandoval, D.A., Bagnol, D., Woods, S.C., D'Alessio, D.A. & Seeley, R.J. (2008). Arcuate glucagon-like peptide 1 receptors regulate glucose homeostasis but not food intake. *Diabetes*, 57 (8), 2046–2054. <https://doi.org/10.2337/db07-1824>
- Sarkar, S., Fekete, C., Légrádi, G. & Lechan, R.M. (2003). Glucagon like peptide-1 (7-36) amide (GLP-1) nerve terminals densely innervate corticotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Research*, 985 (2), 163–168. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(03\)03117-2](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)03117-2)
- Scheen, A.J. (2017). Pharmacotherapy of “treatment resistant” type 2 diabetes. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 18 (5), 503–515. <https://doi.org/10.1080/14656566.2017.1297424>
- Scherer, P.E. (2006). Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes*, 55 (6), 1537–1545. <https://doi.org/10.2337/db06-0263>
- Scherer, T., O'Hare, J., Diggs-Andrews, K., Schweiger, M., Cheng, B., Lindtner, C., Zielinski, E., Vempati, P., Su, K., Dighe, S., Milsom, T., Puchowicz, M., Scheja, L., Zechner, R., Fisher, S.J., Previs, S.F. & Buettner, C. (2011). Brain insulin controls adipose tissue lipolysis and lipogenesis. *Cell Metabolism*, 13 (2), 183–194. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.01.008>
- Scherer, T., Sakamoto, K. & Buettner, C. (2021). Brain insulin signalling in metabolic homeostasis and disease. *Nature Reviews. Endocrinology*, 17 (8), 468–483. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00498-x>
- Schiller, J.S., Lucas, J.W., Ward, B.W. & Peregoy, J.A. (2012). Summary health statistics for U.S. adults: National Health Interview Survey, 2010. *Vital and Health Statistics. Series 10, Data from the National Health Survey*, (252), 1–207
- Schirra, J., Katschinski, M., Weidmann, C., Schäfer, T., Wank, U., Arnold, R. & Göke, B. (1996). Gastric emptying and release of incretin hormones after glucose ingestion in humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 97 (1), 92–103. <https://doi.org/10.1172/JCI118411>
- Schreiber, A.L., Arceneaux, K.P., Malbrue, R.A., Mouton, A.J., Chen, C.S., Bench, E.M., Braymer, H.D. & Primeaux, S.D. (2016). The effects of high fat diet and estradiol on hypothalamic prepro-QRFP mRNA expression in female rats. *Neuropeptides*, 58, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2016.01.004>
- Schwartz, M.W., Bergman, R.N., Kahn, S.E., Taborsky, G.J., Fisher, L.D., Sipols, A.J., Woods, S.C., Steil, G.M. & Porte, D. (1991). Evidence for entry of plasma insulin into cerebrospinal fluid through an intermediate compartment in dogs. Quantitative aspects and implications for transport. *The Journal of Clinical Investigation*, 88 (4), 1272–1281. <https://doi.org/10.1172/JCI115431>
- Schwartz, M.W., Sipols, A., Kahn, S.E., Lattemann, D.F., Taborsky, G.J., Bergman, R.N., Woods, S.C. & Porte, D. (1990). Kinetics and specificity of insulin uptake from plasma into cerebrospinal fluid. *The American Journal of Physiology*, 259 (3 Pt 1), E378-383. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1990.259.3.E378>
- Seeley, R.J., van Dijk, G., Campfield, L.A., Smith, F.J., Burn, P., Nelligan, J.A., Bell, S.M., Baskin, D.G., Woods, S.C. & Schwartz, M.W. (1996). Intraventricular leptin reduces food intake and body weight of lean rats but not obese Zucker rats. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme*, 28 (12), 664–668. <https://doi.org/10.1055/s-2007-979874>
- Seghieri, M., Rebelos, E., Gastaldelli, A., Astiarraga, B.D., Casolaro, A., Barsotti, E., Pocai, A., Nauck, M., Muscelli, E. & Ferrannini, E. (2013). Direct effect of GLP-1 infusion on endogenous glucose production in humans. *Diabetologia*, 56 (1), 156–161. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2738-3>
- Shah, V.N., DuBose, S.N., Li, Z., Beck, R.W., Peters, A.L., Weinstock, R.S., Kruger, D., Tansey, M., Sparling, D., Woerner, S., Vendrame, F., Bergenstal, R., Tamborlane, W.V., Watson, S.E. & Sherr, J. (2019). Continuous Glucose Monitoring Profiles in Healthy Nondiabetic Participants:

- A Multicenter Prospective Study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 104 (10), 4356–4364. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-02763>
- Shi, X., Chacko, S., Li, F., Li, D., Burrin, D., Chan, L. & Guan, X. (2017). Acute activation of GLP-1-expressing neurons promotes glucose homeostasis and insulin sensitivity. *Molecular Metabolism*, 6 (11), 1350–1359. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.08.009>
- Shimizu, R., Sakazaki, F., Okuno, T., Nakamuro, K. & Ueno, H. (2012). Difference in glucose intolerance between C57BL/6J and ICR strain mice with streptozotocin/nicotinamide-induced diabetes. *Biomedical Research (Tokyo, Japan)*, 33 (1), 63–66. <https://doi.org/10.2220/biomedres.33.63>
- Shin, A.C., Filatova, N., Lindtner, C., Chi, T., Degann, S., Oberlin, D. & Buettner, C. (2017). Insulin Receptor Signaling in POMC, but Not AgRP, Neurons Controls Adipose Tissue Insulin Action. *Diabetes*, 66 (6), 1560–1571. <https://doi.org/10.2337/db16-1238>
- Shirakawa, J., Fernandez, M., Takatani, T., El Ouaamari, A., Jungtrakoon, P., Okawa, E.R., Zhang, W., Yi, P., Doria, A. & Kulkarni, R.N. (2017). Insulin Signaling Regulates the FoxM1/PLK1/CENP-A Pathway to Promote Adaptive Pancreatic β Cell Proliferation. *Cell Metabolism*, 25 (4), 868–882.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.02.004>
- Siddle, K. (2011). Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *Journal of Molecular Endocrinology*, 47 (1), R1–10. <https://doi.org/10.1530/JME-11-0022>
- Sisley, S., Gutierrez-Aguilar, R., Scott, M., D'Alessio, D.A., Sandoval, D.A. & Seeley, R.J. (2014). Neuronal GLP1R mediates liraglutide's anorectic but not glucose-lowering effect. *The Journal of Clinical Investigation*, 124 (6), 2456–2463. <https://doi.org/10.1172/JCI72434>
- Skoglund, G., Lundquist, I. & Ahrén, B. (1988). Selective alpha 2-adrenoceptor activation by clonidine: effects on 45Ca^{2+} efflux and insulin secretion from isolated rat islets. *Acta Physiologica Scandinavica*, 132 (3), 289–296. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1988.tb08332.x>
- Song, B., Scheuner, D., Ron, D., Pennathur, S. & Kaufman, R.J. (2008). Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 118 (10), 3378–3389. <https://doi.org/10.1172/JCI34587>
- Song, Z. & Routh, V.H. (2005). Differential effects of glucose and lactate on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes*, 54 (1), 15–22. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.1.15>
- Stahl, A., Evans, J.G., Pattel, S., Hirsch, D. & Lodish, H.F. (2002). Insulin causes fatty acid transport protein translocation and enhanced fatty acid uptake in adipocytes. *Developmental Cell*, 2 (4), 477–488. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00143-0](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00143-0)
- Stanhope, K.L. & Havel, P.J. (2010). Fructose consumption: recent results and their potential implications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1190, 15–24. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05266.x>
- Stein, L.J., Dorsa, D.M., Baskin, D.G., Figlewicz, D.P., Porte, D. & Woods, S.C. (1987). Reduced effect of experimental peripheral hyperinsulinemia to elevate cerebrospinal fluid insulin concentrations of obese Zucker rats. *Endocrinology*, 121 (5), 1611–1615. <https://doi.org/10.1210/endo-121-5-1611>
- Stoffel, M., Patel, P., Lo, Y.M., Hattersley, A.T., Lucassen, A.M., Page, R., Bell, J.I., Bell, G.I., Turner, R.C. & Wainscoat, J.S. (1992). Missense glucokinase mutation in maturity-onset diabetes of the young and mutation screening in late-onset diabetes. *Nature Genetics*, 2 (2), 153–156. <https://doi.org/10.1038/ng1092-153>
- Stoffers, D.A., Kieffer, T.J., Hussain, M.A., Drucker, D.J., Bonner-Weir, S., Habener, J.F. & Egan, J.M. (2000). Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain

- protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes*, 49 (5), 741–748. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.5.741>
- Straub, S.G. & Sharp, G.W. (1996). A wortmannin-sensitive signal transduction pathway is involved in the stimulation of insulin release by vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *The Journal of Biological Chemistry*, 271 (3), 1660–1668. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.3.1660>
- Sun, Y., Ahmed, S. & Smith, R.G. (2003). Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Molecular and Cellular Biology*, 23 (22), 7973–7981. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.22.7973-7981.2003>
- Supale, S., Li, N., Brun, T. & Maechler, P. (2012). Mitochondrial dysfunction in pancreatic β cells. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 23 (9), 477–487. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.06.002>
- Sylow, L., Tokarz, V.L., Richter, E.A. & Klip, A. (2021). The many actions of insulin in skeletal muscle, the paramount tissue determining glycemia. *Cell Metabolism*, 33 (4), 758–780. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.03.020>
- Szendroedi, J., Yoshimura, T., Phielix, E., Koliaki, C., Marcucci, M., Zhang, D., Jelenik, T., Müller, J., Herder, C., Nowotny, P., Shulman, G.I. & Roden, M. (2014). Role of diacylglycerol activation of PKC θ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111 (26), 9597–9602. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409229111>
- Tak, P.P. & Firestein, G.S. (2001). NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Investigation*, 107 (1), 7–11. <https://doi.org/10.1172/JCI11830>
- Takayasu, S., Sakurai, T., Iwasaki, S., Teranishi, H., Yamanaka, A., Williams, S.C., Iguchi, H., Kawasawa, Y.I., Ikeda, Y., Sakakibara, I., Ohno, K., Ioka, R.X., Murakami, S., Dohmae, N., Xie, J., Suda, T., Motoike, T., Ohuchi, T., Yanagisawa, M. & Sakai, J. (2006). A neuropeptide ligand of the G protein-coupled receptor GPR103 regulates feeding, behavioral arousal, and blood pressure in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (19), 7438–7443. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602371103>
- Talchai, C., Xuan, S., Lin, H.V., Sussel, L. & Accili, D. (2012). Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure. *Cell*, 150 (6), 1223–1234. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.029>
- Thaler, J.P., Yi, C.-X., Schur, E.A., Guyenet, S.J., Hwang, B.H., Dietrich, M.O., Zhao, X., Sarruf, D.A., Izgur, V., Maravilla, K.R., Nguyen, H.T., Fischer, J.D., Matsen, M.E., Wisse, B.E., Morton, G.J., Horvath, T.L., Baskin, D.G., Tschöp, M.H. & Schwartz, M.W. (2012). Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 122 (1), 153–162. <https://doi.org/10.1172/JCI59660>
- Thirone, A.C.P., Huang, C. & Klip, A. (2006). Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 17 (2), 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.01.005>
- Thorens, B. (2011). Brain glucose sensing and neural regulation of insulin and glucagon secretion. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 13 Suppl 1, 82–88. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2011.01453.x>
- Thorens, B. & Larsen, P.J. (2004). Gut-derived signaling molecules and vagal afferents in the control of glucose and energy homeostasis. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 7 (4), 471–478. <https://doi.org/10.1097/01.mco.0000134368.91900.84>
- Thul, P.J., Åkesson, L., Wiking, M., Mahdessian, D., Geladaki, A., Ait Blal, H., Alm, T., Asplund, A., Björk, L., Breckels, L.M., Bäckström, A., Danielsson, F., Fagerberg, L., Fall, J., Gatto, L., Gnann, C., Hober, S., Hjelmare, M., Johansson, F., Lee, S., Lindskog, C., Mulder, J., Mulvey, C.M., Nilsson, P., Oksvold, P., Rockberg, J., Schutten, R., Schwenk, J.M., Sivertsson, Å.,

- Sjöstedt, E., Skogs, M., Stadler, C., Sullivan, D.P., Tegel, H., Winsnes, C., Zhang, C., Zwahlen, M., Mardinoglu, A., Pontén, F., von Feilitzen, K., Lilley, K.S., Uhlén, M. & Lundberg, E. (2017). A subcellular map of the human proteome. *Science (New York, N.Y.)*, 356 (6340), eaal3321. <https://doi.org/10.1126/science.aal3321>
- Timper, K. & Brüning, J.C. (2017). Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. *Disease Models & Mechanisms*, 10 (6), 679–689. <https://doi.org/10.1242/dmm.026609>
- Timper, K., Grisouard, J., Sauter, N.S., Herzog-Radimerski, T., Dembinski, K., Peterli, R., Frey, D.M., Zulewski, H., Keller, U., Müller, B. & Christ-Crain, M. (2013). Glucose-dependent insulinotropic polypeptide induces cytokine expression, lipolysis, and insulin resistance in human adipocytes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 304 (1), E1-13. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00100.2012>
- Toft-Nielsen, M.B., Damholt, M.B., Madsbad, S., Hilsted, L.M., Hughes, T.E., Michelsen, B.K. & Holst, J.J. (2001). Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86 (8), 3717–3723. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.8.7750>
- Tomas, E., Stanojevic, V. & Habener, J.F. (2010). GLP-1 (9-36) amide metabolite suppression of glucose production in isolated mouse hepatocytes. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme*, 42 (9), 657–662. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1253421>
- Tomas, E., Stanojevic, V. & Habener, J.F. (2011a). GLP-1-derived nonapeptide GLP-1(28-36)amide targets to mitochondria and suppresses glucose production and oxidative stress in isolated mouse hepatocytes. *Regulatory Peptides*, 167 (2–3), 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2011.01.003>
- Tomas, E., Wood, J.A., Stanojevic, V. & Habener, J.F. (2011b). GLP-1-derived nonapeptide GLP-1(28-36)amide inhibits weight gain and attenuates diabetes and hepatic steatosis in diet-induced obese mice. *Regulatory Peptides*, 169 (1–3), 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2011.04.006>
- Tseng, C.C., Boylan, M.O., Jarboe, L.A., Usdin, T.B. & Wolfe, M.M. (1996). Chronic desensitization of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor in diabetic rats. *The American Journal of Physiology*, 270 (4 Pt 1), E661-666. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1996.270.4.E661>
- Tudurí, E., Beiroa, D., Porteiro, B., López, M., Diéguez, C. & Nogueiras, R. (2015). Acute but not chronic activation of brain glucagon-like peptide-1 receptors enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 17 (8), 789–799. <https://doi.org/10.1111/dom.12488>
- Tups, A., Benzler, J., Sergi, D., Ladyman, S.R. & Williams, L.M. (2017). Central Regulation of Glucose Homeostasis. *Comprehensive Physiology*, 7 (2), 741–764. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160015>
- Turton, M.D., O’Shea, D., Gunn, I., Beak, S.A., Edwards, C.M., Meeran, K., Choi, S.J., Taylor, G.M., Heath, M.M., Lambert, P.D., Wilding, J.P., Smith, D.M., Ghatei, M.A., Herbert, J. & Bloom, S.R. (1996). A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*, 379 (6560), 69–72. <https://doi.org/10.1038/379069a0>
- Ukena, K., Osugi, T., Leprince, J., Vaudry, H. & Tsutsui, K. (2014). Molecular evolution of GPCRs: 26RFa/GPR103. *Journal of Molecular Endocrinology*, 52 (3), T119-131. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0207>
- Ukena, K., Tachibana, T., Iwakoshi-Ukena, E., Saito, Y., Minakata, H., Kawaguchi, R., Osugi, T., Tobarí, Y., Leprince, J., Vaudry, H. & Tsutsui, K. (2010). Identification, localization, and function of a novel avian hypothalamic neuropeptide, 26RFa, and its cognate receptor, G

- protein-coupled receptor-103. *Endocrinology*, 151 (5), 2255–2264. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1478>
- Vahl, T.P., Tauchi, M., Durler, T.S., Elfers, E.E., Fernandes, T.M., Bitner, R.D., Ellis, K.S., Woods, S.C., Seeley, R.J., Herman, J.P. & D'Alessio, D.A. (2007). Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors expressed on nerve terminals in the portal vein mediate the effects of endogenous GLP-1 on glucose tolerance in rats. *Endocrinology*, 148 (10), 4965–4973. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0153>
- Van Dyken, P. & Lacoste, B. (2018). Impact of Metabolic Syndrome on Neuroinflammation and the Blood-Brain Barrier. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 930. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00930>
- Vella, A., Shah, P., Basu, R., Basu, A., Camilleri, M., Schwenk, F.W., Holst, J.J. & Rizza, R.A. (2001). Effect of glucagon-like peptide-1(7-36)-amide on initial splanchnic glucose uptake and insulin action in humans with type 1 diabetes. *Diabetes*, 50 (3), 565–572. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.3.565>
- Vella, A., Shah, P., Reed, A.S., Adkins, A.S., Basu, R. & Rizza, R.A. (2002). Lack of effect of exendin-4 and glucagon-like peptide-1-(7,36)-amide on insulin action in non-diabetic humans. *Diabetologia*, 45 (10), 1410–1415. <https://doi.org/10.1007/s00125-002-0924-4>
- Vilsbøll, T., Krarup, T., Madsbad, S. & Holst, J.J. (2003). Both GLP-1 and GIP are insulinotropic at basal and postprandial glucose levels and contribute nearly equally to the incretin effect of a meal in healthy subjects. *Regulatory Peptides*, 114 (2–3), 115–121. [https://doi.org/10.1016/s0167-0115\(03\)00111-3](https://doi.org/10.1016/s0167-0115(03)00111-3)
- Virtanen, K.A., Lönnroth, P., Parkkola, R., Peltoniemi, P., Asola, M., Viljanen, T., Tolvanen, T., Knuuti, J., Rönnemaa, T., Huupponen, R. & Nuutila, P. (2002). Glucose uptake and perfusion in subcutaneous and visceral adipose tissue during insulin stimulation in nonobese and obese humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87 (8), 3902–3910. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.8.8761>
- Vrang, N. & Larsen, P.J. (2010). Preproglucagon derived peptides GLP-1, GLP-2 and oxyntomodulin in the CNS: role of peripherally secreted and centrally produced peptides. *Progress in Neurobiology*, 92 (3), 442–462. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.07.003>
- Wallum, B.J., Taborsky, G.J., Porte, D., Figlewicz, D.P., Jacobson, L., Beard, J.C., Ward, W.K. & Dorsa, D. (1987). Cerebrospinal fluid insulin levels increase during intravenous insulin infusions in man. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 64 (1), 190–194. <https://doi.org/10.1210/jcem-64-1-190>
- Wang, B., Wood, I.S. & Trayhurn, P. (2007). Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 455 (3), 479–492. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0301-8>
- Wang, Z., York, N.W., Nichols, C.G. & Remedi, M.S. (2014). Pancreatic β cell dedifferentiation in diabetes and redifferentiation following insulin therapy. *Cell Metabolism*, 19 (5), 872–882. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.010>
- Ward, W.K., Bolgiano, D.C., McKnight, B., Halter, J.B. & Porte, D. (1984). Diminished B cell secretory capacity in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation*, 74 (4), 1318–1328. <https://doi.org/10.1172/JCI111542>
- Weaver, R.E., Donnelly, D., Wabitsch, M., Grant, P.J. & Balmforth, A.J. (2008). Functional expression of glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptors is coupled to differentiation in a human adipocyte model. *International Journal of Obesity (2005)*, 32 (11), 1705–1711. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.148>
- Werther, G.A., Hogg, A., Oldfield, B.J., McKinley, M.J., Figdor, R., Allen, A.M. & Mendelsohn, F.A. (1987). Localization and characterization of insulin receptors in rat brain and pituitary gland

- using in vitro autoradiography and computerized densitometry. *Endocrinology*, 121 (4), 1562–1570. <https://doi.org/10.1210/endo-121-4-1562>
- Wilding, J.P.H., Batterham, R.L., Calanna, S., Davies, M., Van Gaal, L.F., Lingvay, I., McGowan, B.M., Rosenstock, J., Tran, M.T.D., Wadden, T.A., Wharton, S., Yokote, K., Zeuthen, N., Kushner, R.F., & STEP 1 Study Group (2021). Once-Weekly Semaglutide in Adults with Overweight or Obesity. *The New England Journal of Medicine*, 384 (11), 989. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2032183>
- Woods, S.C. & Porte, D. (1975). Effect of intracisternal insulin on plasma glucose and insulin in the dog. *Diabetes*, 24 (10), 905–909. <https://doi.org/10.2337/diab.24.10.905>
- Wuest, S., Rapold, R.A., Rytka, J.M., Schoenle, E.J. & Konrad, D. (2009). Basal lipolysis, not the degree of insulin resistance, differentiates large from small isolated adipocytes in high-fat fed mice. *Diabetologia*, 52 (3), 541–546. <https://doi.org/10.1007/s00125-008-1223-5>
- Xu, G., Kaneto, H., Laybutt, D.R., Duvivier-Kali, V.F., Trivedi, N., Suzuma, K., King, G.L., Weir, G.C. & Bonner-Weir, S. (2007). Downregulation of GLP-1 and GIP receptor expression by hyperglycemia: possible contribution to impaired incretin effects in diabetes. *Diabetes*, 56 (6), 1551–1558. <https://doi.org/10.2337/db06-1033>
- Xu, Z., Zeng, W., Sun, J., Chen, W., Zhang, R., Yang, Z., Yao, Z., Wang, L., Song, L., Chen, Y., Zhang, Y., Wang, C., Gong, L., Wu, B., Wang, T., Zheng, J. & Gao, F. (2017). The quantification of blood-brain barrier disruption using dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in aging rhesus monkeys with spontaneous type 2 diabetes mellitus. *NeuroImage*, 158, 480–487. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.07.017>
- Yamamoto, T., Miyazaki, R. & Yamada, T. (2009). Intracerebroventricular administration of 26RFa produces an analgesic effect in the rat formalin test. *Peptides*, 30 (9), 1683–1688. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.05.027>
- Yamamoto, T., Miyazaki, R., Yamada, T. & Shinozaki, T. (2011). Anti-allodynic effects of intrathecally and intracerebroventricularly administered 26RFa, an intrinsic agonist for GRP103, in the rat partial sciatic nerve ligation model. *Peptides*, 32 (6), 1262–1269. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.03.008>
- Yamanaka, A., Kunii, K., Nambu, T., Tsujino, N., Sakai, A., Matsuzaki, I., Miwa, Y., Goto, K. & Sakurai, T. (2000). Orexin-induced food intake involves neuropeptide Y pathway. *Brain Research*, 859 (2), 404–409. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02043-6](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02043-6)
- Yavropoulou, M.P., Kotsa, K., Anastasiou, O., O’Dorisio, T.M., Pappas, T.N. & Yovos, J.G. (2009). Effect of intracerebroventricular infusion of insulin on glucose-dependent insulinotropic peptide in dogs. *Neuroscience Letters*, 460 (2), 148–151. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.05.052>
- Yi, C.-X., Gericke, M., Krüger, M., Alkemade, A., Kabra, D.G., Hanske, S., Filosa, J., Pfluger, P., Bingham, N., Woods, S.C., Herman, J., Kalsbeek, A., Baumann, M., Lang, R., Stern, J.E., Bechmann, I. & Tschöp, M.H. (2012). High calorie diet triggers hypothalamic angiopathy. *Molecular Metabolism*, 1 (1–2), 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2012.08.004>
- Yip, R.G., Boylan, M.O., Kieffer, T.J. & Wolfe, M.M. (1998). Functional GIP receptors are present on adipocytes. *Endocrinology*, 139 (9), 4004–4007. <https://doi.org/10.1210/endo.139.9.6288>
- Yoo, D.Y., Yim, H.S., Jung, H.Y., Nam, S.M., Kim, J.W., Choi, J.H., Seong, J.K., Yoon, Y.S., Kim, D.W. & Hwang, I.K. (2016). Chronic type 2 diabetes reduces the integrity of the blood-brain barrier by reducing tight junction proteins in the hippocampus. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 78 (6), 957–962. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0589>
- Yoon, N.A. & Diano, S. (2021). Hypothalamic glucose-sensing mechanisms. *Diabetologia*, 64 (5), 985–993. <https://doi.org/10.1007/s00125-021-05395-6>
- Yoshida, K., Nonaka, T., Nakamura, S., Araki, M. & Yamamoto, T. (2019). Microinjection of 26RFa, an endogenous ligand for the glutamine RF-amide peptide receptor (QRFP receptor), into the

- rostral ventromedial medulla (RVM), locus coeruleus (LC), and periaqueductal grey (PAG) produces an analgesic effect in rats. *Peptides*, 115, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.02.003>
- Younan, S.M. & Rashed, L.A. (2007). Impairment of the insulinotropic effect of gastric inhibitory polypeptide (GIP) in obese and diabetic rats is related to the down-regulation of its pancreatic receptors. *General Physiology and Biophysics*, 26 (3), 181–193
- Yu, C., Chen, Y., Cline, G.W., Zhang, D., Zong, H., Wang, Y., Bergeron, R., Kim, J.K., Cushman, S.W., Cooney, G.J., Atcheson, B., White, M.F., Kraegen, E.W. & Shulman, G.I. (2002). Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (52), 50230–50236. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200958200>
- Zabolotny, J.M., Kim, Y.-B., Welsh, L.A., Kershaw, E.E., Neel, B.G. & Kahn, B.B. (2008). Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 283 (21), 14230–14241. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800061200>
- Zarjevski, N., Cusin, I., Vettor, R., Rohner-Jeanrenaud, F. & Jeanrenaud, B. (1993). Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology*, 133 (4), 1753–1758. <https://doi.org/10.1210/endo.133.4.8404618>
- Zhang, X., Zhang, G., Zhang, H., Karin, M., Bai, H. & Cai, D. (2008). Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*, 135 (1), 61–73. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.043>
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. & Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372 (6505), 425–432. <https://doi.org/10.1038/372425a0>
- Zhao, S., Zhu, Y., Schultz, R.D., Li, N., He, Z., Zhang, Z., Caron, A., Zhu, Q., Sun, K., Xiong, W., Deng, H., Sun, J., Deng, Y., Kim, M., Lee, C.E., Gordillo, R., Liu, T., Odle, A.K., Childs, G.V., Zhang, N., Kusminski, C.M., Elmquist, J.K., Williams, K.W., An, Z. & Scherer, P.E. (2019). Partial Leptin Reduction as an Insulin Sensitization and Weight Loss Strategy. *Cell Metabolism*, 30 (4), 706–719.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.08.005>
- Zhao, Y., Li, G., Li, Y., Wang, Y. & Liu, Z. (2017). Knockdown of Tlr4 in the Arcuate Nucleus Improves Obesity Related Metabolic Disorders. *Scientific Reports*, 7 (1), 7441. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07858-6>
- Zheng, Y., Ley, S.H. & Hu, F.B. (2018). Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nature Reviews. Endocrinology*, 14 (2), 88–98. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.151>
- Zhou, J., Li, H., Ran, X., Yang, W., Li, Q., Peng, Y., Li, Y., Gao, X., Luan, X., Wang, W. & Jia, W. (2009). Reference Values for Continuous Glucose Monitoring in Chinese Subjects. *Diabetes Care*, 32 (7), 1188–1193. <https://doi.org/10.2337/dc09-0076>
- Zhou, J., Livak, M.F.A., Bernier, M., Muller, D.C., Carlson, O.D., Elahi, D., Maudsley, S. & Egan, J.M. (2007). Ubiquitination is involved in glucose-mediated downregulation of GIP receptors in islets. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 293 (2), E538–547. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00070.2007>

ROLE DU SYSTEME 26RFA/GPR103 DANS LA REGULATION DE LA GLYCEMIE DANS UN MODELE MURIN D'OBESITE ET D'HYPERGLYCEMIE CHRONIQUE

FR : Le neuropeptide 26RFA ainsi que son récepteur GPR103 constituent un système peptidergique impliqué dans la régulation de la glycémie. En effet, il a récemment été montré que le 26RFA exerce une activité de type incrétine. Le 26RFA est sécrété par le duodénum après une charge orale en glucose et active directement son récepteur pancréatique afin de stimuler la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Parallèlement, le 26RFA augmente la sensibilité à l'insuline. Enfin, les dernières études de notre laboratoire ont montré que le 26RFA était aussi impliqué dans la régulation centrale de la glycémie. En effet, il a été mis en évidence que ce peptide constituait un des relais de l'insuline centrale, il exerce un effet anti-hyperglycémiant associé à une augmentation de la sécrétion d'insuline. Alors que la régulation de la glycémie est fortement altérée dans certaines pathologies telles que l'obésité associée au diabète de type 2, aucune étude n'a évalué le fonctionnement du système 26RFA/GPR103 dans ces conditions. Dans ce contexte, nous avons voulu déterminer l'impact d'un régime riche en graisse (régime high fat diet – HFD) sur les effets du 26RFA dans la régulation de la glycémie. La première étude de cette thèse décrit l'impact du régime HFD sur les effets périphériques du 26RFA en particulier son action incrétine. La seconde caractérise les effets centraux du 26RFA dans ce contexte physiopathologique. Enfin, la dernière étude précise les effets d'une infusion chronique centrale de 26RFA sur le phénotype obèse et hyperglycémique des souris HFD.

Dans un premier temps, nous avons soumis des souris à un régime HFD auxquelles nous avons injecté par voie intra-péritonéale du 26RFA durant différents tests métaboliques. L'ensemble des résultats obtenus nous a permis de mettre en évidence que les effets anti-hyperglycémiant du 26RFA sont totalement abolis chez les souris HFD. En effet, dans ce contexte, le 26RFA ne semble plus capable de stimuler la sécrétion d'insuline par le pancréas et l'effet insulino-sensibilisateur du peptide est fortement réduit. Ces résultats ont été confirmés dans un modèle de culture de cellules β pancréatiques humaines en condition de lipotoxicité, où nous avons pu montrer que le 26RFA ne stimule plus la sécrétion d'insuline. De plus, la perte de l'effet insulino-tropique du 26RFA peut être expliquée par une diminution de l'immunomarquage du GPR103 dans les îlots pancréatiques tandis que la diminution des effets insulino-sensibilisateurs du 26RFA peut être en partie liée à une réduction de l'expression du GPR103 dans les organes cibles de l'insuline : le muscle et le tissu adipeux. En conclusion de ce premier travail, les effets périphériques du 26RFA semblent totalement abolis chez la souris HFD. Dans une seconde étude, nous avons effectué des injections intra-cérébro-ventriculaires (icv) de 26RFA chez la souris rendue obèse et hyperglycémique durant différents tests métaboliques. Cette étude nous a permis de mettre en évidence que les effets centraux du 26RFA ne sont pas impactés par le régime HFD. En effet, dans ces conditions, le 26RFA exerce toujours un effet anti-hyperglycémiant en stimulant la sécrétion d'insuline. Dans ce contexte où le 26RFA conserve ses effets centraux, nous avons souhaité déterminer les effets d'une infusion chronique icv de 26RFA sur le phénotype obèse et hyperglycémique des souris HFD. Ainsi, l'utilisation de mini-pompes osmotiques nous a permis d'injecter de façon continue durant 4 semaines du 26RFA dans le cerveau des souris HFD. Les résultats de cette étude ne nous ont pas permis de mettre évidence un effet bénéfique du 26RFA sur l'homéostasie du glucose chez les souris HFD. En effet, le 26RFA exerce un effet orexigène puissant qui pourrait masquer les effets du 26RFA sur la régulation de la glycémie observés lors d'injections aiguës.

Finalement l'ensemble des travaux de cette thèse nous révèle que le système 26RFA/GPR103 central et périphérique ne sont pas impactés de la même façon par un régime riche en graisse. En effet, tandis que le système périphérique perd totalement ses effets gluco-régulateurs, le système central quant à lui conserve ses effets anti-hyperglycémiant. Face à ce constat, il apparaît aujourd'hui nécessaire d'évaluer les possibles communications/interactions entre ces systèmes central et périphérique dans ce modèle HFD. Enfin, le traitement chronique central que nous avons effectué ne semble pas améliorer la régulation glycémique chez les souris traitées. Toutefois, s'agissant de la première étude à avoir évalué les effets chroniques du 26RFA dans un contexte d'obésité associée à l'hyperglycémie, d'autres protocoles d'expérimentation sont nécessaires pour poursuivre l'analyse du système 26RFA en situation physiopathologique.

Mots Clés : Neuropeptide, 26RFA, Homéostasie Glucidique, Obésité, Diabète de type 2

EN: Recent studies revealed that the neuropeptide 26RFA and its receptor, GPR103, are involved in the regulation of glucose homeostasis. Indeed, it was shown that 26RFA exerts an incretin effect. 26RFA is mainly secreted by the duodenum after an oral glucose challenge and it acts directly on the pancreas to stimulate the glucose-induced insulin secretion. Moreover, 26RFA can improve insulin sensitivity. Finally, a recent study from our team provided evidence that 26RFA is also involved in the central regulation of glycemia and relays the central effect of insulin. Indeed, central 26RFA induces a robust anti-hyperglycemic effect associated with an increase of peripheral insulin secretion. It is well known that the regulation of glycemia is altered in obesity and diabetes but the effect of 26RFA in this pathology remains unknown. The aim of this thesis was to evaluate the consequences of a high fat diet (HFD) on the gluco-regulatory effect of 26RFA. The first study aimed to evaluate the impact of a HFD on the incretin effect of 26RFA. The second study aimed to characterize the central effect of 26RFA in those pathophysiological conditions. Finally, the third study aimed to determine the effect of a chronic central administration of 26RFA on the obese/hyperglycemic phenotype of the HFD mice.

Firstly, intraperitoneal injection of 26RFA in HFD mice revealed that the antihyperglycemic effect of 26RFA is totally lost in this model. Indeed, in the HFD mice, 26RFA is not able to increase the glucose-induced insulin secretion and the insulin sensitive effect of the peptide is dramatically impaired. These *in vivo* data were confirmed using beta cells cultured in lipotoxic conditions as, in this *in vitro* model, the insulino-tropic effect of 26RFA is totally abolished. This loss of insulino-tropic effect of 26RFA is probably due to a down regulation of GPR103 production in the beta cells whereas the loss of insulin sensitive effect may be caused by the down regulation of GPR103 expression in the insulin sensitive tissues such as the muscle and the adipose tissue. Secondly, we carried out intracerebroventricular (icv) injection of 26RFA in high fat mice while performing metabolic tests. This experiment revealed that the HFD does not alter the central effect of 26RFA as the neuropeptide is still able to induce an antihyperglycemic effect and to enhance glucose-induced insulin secretion. In this context in which 26RFA retains its central effects, we determined the effects of a chronic icv infusion of 26RFA in the obese/hyperglycemic mice. Using osmotic mini pumps, we found that chronic administration of 26RFA is unable to improve glucose homeostasis of the HFD mice. We hypothesize that the orexigenic effect of 26RFA is stronger than its antihyperglycemic effect and that, consequently, the gluco-regulatory effect of 26RFA may be masked by the increase of food intake and body weight.

Altogether, these results support the view that the central and peripheral effects on glucose homeostasis of the 26RFA/GPR103 peptidergic system are differentially impacted by the HFD. Indeed, the peripheral effects of 26RFA are totally abolished in HFD conditions whereas the central effects are maintained. It appears now necessary to strengthen our knowledge on the communication between those two systems (peripheral and central). Finally, the chronic central treatment of the HFD mice seems ineffective to improve glucose homeostasis in this pathophysiological context.

Key words: Neuropeptide, 26RFA, Glucose Homeostasis, Obesity, Type 2 Diabetes