



**HAL**  
open science

# Détection hypothalamique du glucose chez le rat soumis à un régime gras enrichi en saccharose : rôle de la dynamique mitochondriale et des espèces actives de l'oxygène d'origine mitochondriale

Lucie Desmoulins

► **To cite this version:**

Lucie Desmoulins. Détection hypothalamique du glucose chez le rat soumis à un régime gras enrichi en saccharose : rôle de la dynamique mitochondriale et des espèces actives de l'oxygène d'origine mitochondriale. Alimentation et Nutrition. Université de Bourgogne, 2016. Français. NNT : 2016DI-JOS024 . tel-01481546

**HAL Id: tel-01481546**

**<https://theses.hal.science/tel-01481546>**

Submitted on 2 Mar 2017

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

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



Centre des Sciences du Gout et de l'Alimentation  
UMR 6265 CNRS – UBFC – UMR 1324 INRA

**THÈSE**

**Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Bourgogne**  
Discipline : Science de la Vie (Neurobiologie)

par **Lucie Desmoulin**

le 29 avril 2016

**Détection hypothalamique du glucose chez le rat soumis à un  
régime gras enrichi en saccharose : rôle de la dynamique  
mitochondriale et des espèces actives de l'oxygène d'origine  
mitochondriale**

Directeur de thèse : **Pr Corinne Leloup**

**Jury**

Anne DEVIN (Rapporteur)

Jennifer RIEUSSET (Rapporteur)

Claude KNAUF (Examineur)

Céline CRUCIANI-GUGLIELMACCI (Examineur)

Corinne LELOUP (Directeur de thèse)



# Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci à Jennifer Rieusset et Céline Cruciani pour les discussions intéressantes, Anne Devin pour les remarques constructives que je n'oublierai pas d'utiliser par la suite, et tout particulièrement Claude Knauf, président du jury, qui m'a aussi suivi tout au long de cette thèse.

Je remercie Luc Pénicaud de m'avoir accueilli au sein du CSGA. Tout d'abord chef d'équipe, vous avez toujours su rester disponible et à l'écoute, et ce jusqu'à la fin et malgré vos nombreuses autres obligations. Votre implication auprès des étudiants est remarquable et l'étendu de votre savoir impressionne, je suis très heureuse d'avoir passé ces 5 années à travailler avec vous.

Un grand merci aussi à Corinne Leloup pour m'avoir encadrée durant cette thèse et pour la confiance que tu m'as accordé. Comme tu l'as souligné, j'ai acquis beaucoup d'autonomie grâce à toi, et je pense que c'est indispensable pour l'apprentissage de ce métier. De par ton expérience, tu as su m'aiguillé dans mon travail et je t'en remercie.

Je remercie aussi les membres de mon équipe et tout particulièrement Xavier Fioramonti pour les nombreuses discussions, les conseils et les démonstrations en manip. Merci aussi à Sylvie Graal pour toute l'aide apportée, que ce soit pour les manips, mais aussi tout le côté administratif qui souvent me dépasse ... Merci aussi à Stephan Collins, Claire Fenech et Fabienne Liénard, pour votre aide et votre disponibilité. Mention spéciale pour Chloé Chrétien, autre doctorante de l'équipe, qui a su pimenter cette thèse. Grâce à toi j'ai appris à me battre pour rester dans mon planning, et à m'imposer dans mon travail, et je pense que ça fait aussi parti de l'apprentissage de la thèse.

Pour terminer avec les membres du CSGA, un grand merci à l'équipe 4, notamment Frédérique Datiche qui m'a encadrée pour mes stages de master, Xavier Grosmaître, Vanessa Soubeyre, David Jarriault, Jean Gascuel et Anne-Marie Lebon, pour votre gentillesse. Un grand merci aussi à Anne Lefranc pour le soin apporté à nos animaux ainsi que pour ta gentillesse. Merci à tout le personnel administratif pour leur compétence et leur grande efficacité pour faciliter toutes nos commandes et démarches souvent périlleuses. Merci à Cédric Serrano et Michel Tavan qui rendent chaque chose possible.

Pendant ma thèse, j'ai eu la chance de participer à de nombreuses collaborations. Je remercie donc une nouvelle fois Claude Knauf ainsi que Audren Fournel pour les manips d'ampérométrie, malgré des conditions particulières. Je remercie aussi Christophe Magnan pour les manips d'électrophysiologie, et une nouvelle fois Céline Cruciani pour l'analyse. Une pensée particulière aussi à Marc Claret et son équipe qui m'ont chaleureusement accueillie pendant une semaine dans leur labo à Barcelone. Ce fut une semaine très enrichissante où j'ai aussi eu la chance de rencontrer Anne



Drougard, une fille exceptionnelle. Merci à Anne Galinier pour le dosage du glutathion. Merci à Na Li pour les heures passées en respi.

Merci à toute l'équipe enseignante de Biologie animale qui m'a accompagnée dans l'encadrement de ces TP. Merci aussi au réseau de l'expérimentarium. Ce fut une expérience très enrichissante et je souhaite longue vie à l'association.

Certains collègues sont devenus de véritables amis qui ont toujours été là pour m'accompagner et me soutenir au cours de cette thèse, que ce soit au labo ou en dehors. Sébastien Rivière, sans qui rien n'aurait été pareil, merci pour les nombreuses heures à rester avec moi pendant mes manips, les interminables discussions, les soirées et autres moments de détente. Aurore Quinault, plus qu'une collègue de travail tu es une véritable amie et je te souhaite de tout cœur de t'épanouir dans le monde de la recherche malgré un gouvernement qui ne le permet pas, t'es faite pour ça. Merci aux nombreux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer ou de côtoyer, et tout particulièrement à Stéphanie Goyon, Romain Paccoud et Coralie Piccin. Merci aussi aux anciens, Lionel Carneiro, Alexandra Gouazé, Xavier Brenachot et Camille Allard, de m'avoir intégré à votre petite bande. J'espère avoir transmis cette bonne ambiance aux stagiaires et nouveaux arrivés. Merci aussi aux « nouvelles » doctorantes, Danaé Nuzzaci et Laëtitia Merle, et bon courage pour la suite.

Ces trois années ont été particulièrement éprouvantes, tant sur le plan professionnel que personnel. On m'avait dit qu'au cours d'une thèse, on se marie, on divorce ou on fait un bébé, ben moi j'ai presque fait les trois, dont un deux fois et ça n'a pas été de tout repos. Donc merci à ceux qui ont été là dans les moments difficiles comme dans les plus heureux, je m'en vais vers de nouvelles aventures outre atlantiques, heureuse comme jamais avec mon mari Adrien Molinas où nous accueillerons notre fils.



# Résumé

---

L'hypothalamus participe au contrôle de l'homéostasie énergétique en détectant les signaux circulants tels que le glucose. L'hypothalamus médiobasal (MBH) en particulier, est capable de détecter l'hyperglycémie afin d'initier des réponses physiologiques adaptées, comme par exemple la sécrétion d'insuline via le système nerveux autonome (par un contrôle vagal). Notre équipe a récemment montré que la détection du glucose nécessite la production d'espèces actives de l'oxygène d'origine mitochondriale (mROS), fortement dépendante de la dynamique mitochondriale (fusion et fission). Récemment, l'étude de modèles génétiques ont permis de faire un lien entre ces événements dynamiques dans le MBH et le développement de pathologies métaboliques.

L'objectif de ma thèse a été tout d'abord été de mettre en place un modèle expérimental présentant uniquement une altération de la détection hypothalamique du glucose induite par l'exposition à un régime gras enrichi en saccharose (HFHS) chez le rat. Après avoir caractérisé ce modèle, nos objectifs ont été de déterminer si l'exposition à ce régime hypercalorique avait un impact sur la dynamique mitochondriale ainsi que la signalisation mROS, via la fonction respiratoire de la mitochondrie dans l'hypothalamus. Nous avons finalement réversé quelques acteurs métaboliques dérégulés, potentiellement impliqués dans la dynamique mitochondriale, dans le but de réverser le phénotype observé chez les rats HFHS.

Nos résultats montrent qu'après 3 semaines d'exposition au régime HFHS, les rats ont un poids corporel normal malgré l'augmentation de leur masse grasse, comparés aux rats contrôles. Les rats HFHS présentent aussi une intolérance au glucose et une augmentation de la glycémie basale sans modification de leur insulinémie. La sécrétion d'insuline en réponse à la détection hypothalamique du glucose, mesurée après une injection intra-carotidienne de glucose en direction du cerveau qui induit une hyperglycémie uniquement cérébrale, a été fortement diminuée. Cependant, la capacité sécrétoire des îlots pancréatiques est normale chez les rats HFHS. Ces défauts sont associés à une diminution de la production de ROS dans le MBH en réponse au glucose, sans modification du status redox. L'efficacité de la respiration mitochondriale hypothalamique a été mesurée par oxygraphie, et les résultats montrent une déficience de la respiration mitochondriale chez les rats HFHS. La translocation de la protéine de fission DRP1 à la mitochondrie est diminuée en réponse au glucose, suggérant une diminution de la fission mitochondriale. L'augmentation de l'activation de l'AMPK dans l'hypothalamus n'est pas responsable de l'altération de la détection hypothalamique du glucose car sa réversion avec une injection intracérébroventriculaire (ICV) de composé C, n'a pas permis de restaurer la sécrétion d'insuline en réponse à l'hyperglycémie cérébrale. De même, une injection ICV de leptine induisant l'activation de STAT3 n'a pas permis de restaurer la sécrétion d'insuline en réponse à l'hyperglycémie cérébrale. Enfin, la diminution de l'activation d'AKT suggère une résistance centrale à l'insuline.

Ces résultats démontrent pour la première fois que l'altération hypothalamique de la signalisation ROS, de la fission et de la respiration mitochondriale, sont présent chez les rats exposés pendant 3 semaines à un régime HFHS. Ces défauts précoces hypothalamiques pourraient ainsi participer à un défaut primaire du contrôle de la sécrétion d'insuline, et finalement, à l'installation d'un phénotype diabétique.

**Mots clés** : Homéostasie énergétique, hypothalamus, détection du glucose, dynamique mitochondriale, Espèces Actives de l'Oxygène mitochondriales, diabète



# Abstract

---

The hypothalamus participates in the control of energy homeostasis by detecting circulating nutrients, such as glucose. The mediobasal hypothalamus (MBH), in particular, senses hyperglycemia and initiates physiological responses, e.g., insulin secretion via the autonomous (vagal) nervous system. We have recently demonstrated that glucose sensing requires mitochondrial reactive oxygen species (mROS) signaling heavily dependant on mitochondrial fusion and fission (dynamics). Recently, genetic models have associated some of these dynamics within the MBH to their obesogenic susceptibility.

The aims of my thesis were first to establish a model that only presents a hypothalamic glucose sensing defect induced by a high fat high sucrose (HFHS) feeding in rats. After characterizing this model, our objectives were to determine whether modulating the diet affects mitochondrial dynamics, and thus, mROS signaling, through the mitochondrial respiratory function in the hypothalamus. We finally reversed some dysregulated metabolic signalings potentially involved in mitochondrial dynamics in order to reverse the phenotype observed in HFHS fed rats.

Our results demonstrate that after 3 weeks of HFHS feeding, rats had a normal body weight despite an increase in the fat mass compared to control rats. HFHS fed rats displayed also a glucose intolerance, increased fasting glycemia but no modification of fasting insulinemia. Hypothalamic glucose sensing induced insulin secretion, measured after an intra-carotid glucose injection towards the brain that only increases brain glycemia without alteration in peripheral glycemia, was drastically decreased. However, glucose stimulated insulin secretion in isolated islets was not different compared to controls. These defects correlate with a decrease of MBH ROS production in response to glucose, with no modification in the redox status. Efficiency of hypothalamic mitochondrial respiration was evaluated using oxygraphy, and results showed mitochondrial respiratory deficiencies in HFHS fed rats. The fission protein DRP1 exhibited decreased mitochondrial translocation in the MBH in response to glucose, suggesting decreased mitochondrial fission. The increase of AMPK activation in the hypothalamus was not responsible for the alteration of hypothalamic glucose sensing since its reversal with an intracerebroventricular (ICV) injection of compound C failed to restore brain hyperglycemia induced insulin secretion. Likewise, an ICV injection of leptin that induced STAT3 activation also failed to restore brain hyperglycemia induced insulin secretion. Finally, the decrease in AKT activation suggested a central insulin resistance.

These results demonstrate for the first time that hypothalamic alteration of mitochondrial ROS signaling, fission and respiration were present in rats exposed to a 3 weeks HFHS diet. Such hypothalamic glucose sensing defects are early events preceding those in islets. These early but drastic hypothalamic modifications could participate in a primary nervous defect of the control of insulin secretion, and finally, the establishment of a diabetic phenotype.

**Keywords:** Energy homeostasis, hypothalamus, glucose sensing, mitochondrial dynamics, mitochondrial Reactive Oxygen Species, diabetes



# Table des matières

---

REMERCIEMENTS.....	2
RESUME.....	6
ABSTRACT.....	8
TABLE DES MATIERES .....	10
LISTE DES TABLEAUX.....	16
LISTE DES FIGURES.....	18
ABREVIATIONS .....	22
INTRODUCTION GENERALE.....	26
<b>CHAPITRE I : REGULATION NERVEUSE DE L'HOMÉOSTASIE ÉNERGETIQUE .....</b>	<b>32</b>
1) LE SYSTÈME NERVEUX AUTONOME DANS LE CONTRÔLE DU MÉTABOLISME ÉNERGETIQUE.....	32
2) UNE STRUCTURE CÉRÉBRALE CLÉ, L'HYPOTHALAMUS.....	36
a) <i>Description anatomique</i> .....	36
b) <i>Régulation de la prise alimentaire</i> .....	36
i) Les neurones POMC/CART .....	38
ii) Les neurones à NPY/AgRP .....	39
iii) Autres neuropeptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire .....	40
c) <i>Intégration des informations circulantes</i> .....	44
i) Le système porte hypothalamo-hypophysaire .....	44
ii) Le LCR .....	46
3) LES SIGNAUX CIRCULANTS PERMETTANT LE MAINTIEN DE L'HOMÉOSTASIE ÉNERGETIQUE.....	46
a) <i>Les hormones</i> .....	48
i) L'insuline.....	48
ii) La leptine .....	54
iii) La ghréline.....	56
b) <i>Les nutriments</i> .....	58
i) Les protéines .....	58
ii) Les acides gras.....	60
iii) Les glucides .....	62
<b>CHAPITRE II : LA DÉTECTION HYPOTHALAMIQUE DU GLUCOSE .....</b>	<b>64</b>
1) EFFETS PHYSIOLOGIQUES DU GLUCOSE .....	64
a) <i>Cas de l'hypoglycémie</i> .....	64
b) <i>Cas de l'hyperglycémie</i> .....	66
2) POPULATIONS CELLULAIRES IMPLIQUÉES DANS LA DÉTECTION HYPOTHALAMIQUE DU GLUCOSE.....	66
a) <i>Les tanocytes</i> .....	68
b) <i>Les astrocytes</i> .....	70
c) <i>Les neurones</i> .....	72
3) ACTEURS MOLÉCULAIRES IMPLIQUÉS DANS LA DÉTECTION HYPOTHALAMIQUE DU GLUCOSE.....	74
a) <i>Le transport du glucose : implication des GLUTs</i> .....	76
b) <i>La phosphorylation du glucose : la glucokinase</i> .....	78
c) <i>AMPK, senseur intracellulaire</i> .....	80
d) <i>Implication du canal <math>K_{ATP}</math> dans la transmission du signal</i> .....	82
<b>CHAPITRE III : LA MITOCHONDRIE ET LA DÉTECTION HYPOTHALAMIQUE DU GLUCOSE.....</b>	<b>86</b>
1) LA CHAÎNE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE .....	88
a) <i>Bilans énergétiques</i> .....	88
b) <i>La phosphorylation oxydative</i> .....	88
c) <i>La respiration découplée</i> .....	90
2) LES ESPÈCES ACTIVES DE L'OXYGÈNE D'ORIGINE MITOCHONDRIALE (MROS) .....	94



a)	<i>Production mitochondriale des ROS et systèmes de régulation</i> .....	94
i)	Les différents ROS .....	94
ii)	Systèmes de gestion des ROS .....	96
b)	<i>Importance physiologique des ROS</i> .....	98
i)	Le stress oxydatif .....	98
ii)	La signalisation redox .....	100
c)	<i>Les ROS et la régulation du métabolisme énergétique</i> .....	102
i)	Second messagers de la détection hypothalamique du glucose .....	102
ii)	Stress oxydatif et pathologies métaboliques .....	106
3)	LA DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE .....	108
a)	<i>Les acteurs de la dynamique mitochondriale</i> .....	110
i)	La fission mitochondriale .....	110
ii)	La fusion mitochondriale .....	112
b)	<i>Les principales fonctions de la dynamique mitochondriale</i> .....	114
c)	<i>La régulation de la dynamique mitochondriale</i> .....	116
d)	<i>Dynamique mitochondriale et homéostasie énergétique</i> .....	118
e)	<i>Dynamique mitochondriale, détection centrale de l'hyperglycémie et production de ROS</i> ....	124
f)	<i>La dynamique mitochondriale et la régulation hypothalamique de l'homéostasie énergétique</i> 124	
i)	Les neurones NPY-AgRP .....	124
ii)	Les neurones POMC .....	126
	<b>OBJECTIFS</b> .....	<b>130</b>
	<b>PARTIE 1 : MISE EN PLACE DU MODELE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>136</b>
1)	APPROCHES METHODOLOGIQUES .....	136
a)	<i>Animaux et régime alimentaire</i> .....	136
b)	<i>Test de détection hypothalamique du glucose</i> .....	136
c)	<i>Capacité sécrétoire des cellules <math>\beta</math> pancréatiques</i> .....	138
d)	<i>Enregistrements du tonus parasymphatique</i> .....	138
e)	<i>Imagerie calcique</i> .....	140
f)	<i>Caractérisation métabolique</i> .....	142
g)	<i>Dosages sanguins et plasmatiques</i> .....	142
h)	<i>Statistiques</i> .....	144
2)	RESULTATS.....	144
a)	<i>Altération de la détection hypothalamique du glucose in vivo</i> .....	144
b)	<i>Caractérisations métabolique et endocrinienne du modèle expérimental</i> .....	146
c)	<i>Etude de la capacité sécrétoire des cellules <math>\beta</math> pancréatiques</i> .....	150
d)	<i>Hyperglycémie cérébrale et tonus parasymphatique de l'axe hypothalamo-pancréatique</i> ...	150
e)	<i>Effet du régime HFHS sur la détection hypothalamique du glucose in vitro</i> .....	152
3)	CONCLUSION .....	154
	<b>PARTIE 2 : IMPLICATION DE LA DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE ET DES MROS DANS L'ALTERATION DE LA DETECTION HYPOTHALAMIQUE DU GLUCOSE</b> .....	<b>156</b>
1)	APPROCHES METHODOLOGIQUES .....	156
a)	<i>Dosage ROS</i> .....	156
b)	<i>Détermination de l'état oxydé/réduit du glutathion</i> .....	158
c)	<i>Mesure de la respiration mitochondriale</i> .....	158
d)	<i>Constitution des fractions mitochondriales</i> .....	160
e)	<i>Western blot</i> .....	160
2)	RESULTATS.....	162
a)	<i>Altération de la signalisation ROS chez les rats HFHS</i> .....	162
b)	<i>Dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale</i> .....	162
c)	<i>Altération de la dynamique mitochondriale</i> .....	166
3)	CONCLUSION .....	168
	<b>PARTIE 3 : REVERSION DU PHENOTYPE</b> .....	<b>170</b>
1)	APPROCHES METHODOLOGIQUES .....	170



a) <i>Injections ICV</i> .....	170
b) <i>Western Blot</i> .....	170
2) RESULTATS .....	172
a) <i>L'AMPK et la régulation de la dynamique mitochondriale</i> .....	172
b) <i>Résistance centrale à la leptine et détection hypothalamique de l'hyperglycémie</i> .....	172
c) <i>Résistance centrale à l'insuline et détection hypothalamique de l'hyperglycémie</i> .....	174
<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>176</b>
<b>COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES</b> .....	<b>192</b>
1) PRESENTATIONS .....	192
a) <i>Présentations orales</i> .....	192
b) <i>Posters</i> .....	192
2) PARTICIPATION A DES TRAVAUX DE RECHERCHE .....	194
<b>REFERENCES</b> .....	<b>196</b>



# Liste des tableaux

---

Tableau 1 : Composition centésimale et apport calorique total des régimes STD et HFHS utilisés pour les expérimentations.....	135
Tableau 2 : Paramètres mesurés chez les rats nourris pendant 3 semaines avec un régime STD vs. HFHS.....	147



# Liste des figures

---

Figure 1 : Représentation schématique de l'homéostasie énergétique.....	25
Figure 2 : Contrôle nerveux de l'homéostasie énergétique.....	29
Figure 3 : Représentation schématique des connexions entre l'hypothalamus, le tronc cérébral, les principales voies nerveuses du système nerveux autonome et leurs tissus ou organes cibles.....	31
Figure 4 : Le système nerveux autonome et la régulation du métabolisme énergétique.....	33
Figure 5 : Vue tridimensionnelle de l'organisation des aires et noyaux hypothalamiques dans l'hémisphère droit chez le rat.....	35
Figure 6 : La détection des signaux périphériques par l'hypothalamus induit la modulation du SNA.....	35
Figure 7 : Rôle des neurones POMC/CART et NPY/AgRP dans la régulation de la prise alimentaire.....	37
Figure 8 : Schéma récapitulatif des neuropeptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la PA et du métabolisme énergétique.....	39
Figure 9 : Vascularisation de l'hypothalamus.....	43
Figure 10 : Représentation schématique de la régulation hormonale du système à mélanocortine.....	45
Figure 11 : Mécanisme de sécrétion d'insuline par la cellule $\beta$ pancréatique chez le rongeur.....	47
Figure 12 : Voies de signalisation de l'insuline et la leptine dans les neurones POMC et AgRP.....	49
Figure 13 : Schéma représentant la régulation nerveuse de la sécrétion d'insuline par l'axe hypothalamo-pancréatique lors d'une hyperglycémie cérébrale.....	65
Figure 14 : Représentation schématique de la distribution des tanycytes tapissant la paroi du 3 <sup>e</sup> ventricule sur une vue coronale de l'hypothalamus.....	67
Figure 15 : Représentation schématique du couplage astrocytes-neurones.....	69
Figure 16 : Représentation schématique de l'activité électrique des quatre populations de neurones gluco-sensibles du NA lors de la variation de la concentration extracellulaire de glucose.....	71
Figure 17 : Etude de l'implication hypothalamique du transporteur de glucose GLUT2 dans la détection cérébrale du glucose <i>in vivo</i> .....	77
Figure 18 L'injection ICV de l'inhibiteur de la glucokinase, la glucosamine, induit une intolérance au glucose et une diminution de la sécrétion d'insuline lors d'un test de tolérance au glucose par injection intra-veineuse (IVGTT).....	79
Figure 19 : L'activation des neurones HGE en réponse au glucose est indépendante du canal $K_{ATP}$ .....	81
Figure 20 : Représentation schématique du flux d'électron au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale.....	87
Figure 21 : Production mitochondriale des ROS.....	89
Figure 22 : L'homéostasie redox.....	99
Figure 23 : Implication des mROS dans la détection hypothalamique du glucose.....	103
Figure 24 Variation de la morphologie des mitochondries.....	107
Figure 25 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la fission mitochondriale.....	111
Figure 26 Mécanismes moléculaires impliqués dans la fusion mitochondriale.....	113



Figure 27 : Interaction mitochondrie-réticulum endoplasmique .....	115
Figure 28 : Les rats HFHS présentent une diminution de la détection hypothalamique du glucose <i>in vivo</i> dès 3 semaines d'exposition au régime HFHS .....	143
Figure 29 : Effets de 3, 6 ou 9 semaines d'exposition au régime HFHS sur la glycémie et l'insulinémie .....	145
Figure 30 : Prise alimentaire mesurée chez les rats STD vs. HFHS au cours des 3 semaines de régime .....	147
Figure 31 : : Tests de tolérance au glucose et de sensibilité à l'insuline chez les rats nourris pendant 3 semaines avec un régime STD vs. HFHS .....	149
Figure 32 : 3 semaines d'exposition au régime HFHS n'entraîne pas de modification de la capacité sécrétoire des cellules $\beta$ du pancréas ni de leur contenu en insuline. ....	149
Figure 33 : Les rats HFHS présentent une diminution du tonus parasympathique en réponse à une injection intra-carotidienne de glucose .....	151
Figure 34 : Détection hypothalamique du glucose <i>in vitro</i> chez les rats nourris pendant 3 semaines avec un régime STD vs. HFHS.....	153
Figure 35 : Altération de la signalisation redox dans l'hypothalamus des rats HFHS en réponse à l'hyperglycémie cérébrale.....	161
Figure 36 : Dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale chez les rats HFHS.....	163
Figure 37 : Quantification relative de l'expression des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.....	165
Figure 38 : Quantification relative des acteurs de la dynamique mitochondriale par Western blot .....	167
Figure 39 : Une sur-activation de l'AMPK n'est pas impliquée dans l'altération de la détection hypothalamique du glucose observée chez les rats HFHS.....	171
Figure 40 : La voie de signalisation de STAT3 n'est pas impliquée dans l'altération de la détection hypothalamique du glucose observée chez les rats HFHS.....	173
Figure 41 : Les rats HFHS présentent une modification de la voie de signalisation impliquant AKT .....	173
Figure 42 : Schéma de conclusion .....	189



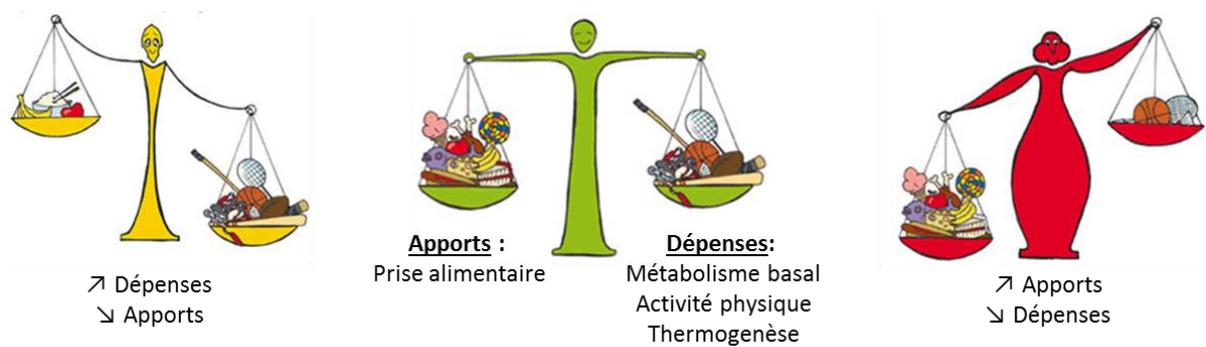
# Abréviations

---

<b>3V</b>	3 <sup>e</sup> ventricule
<b>α-MSH</b>	α-Melanocyte stimulating hormone
<b>Δψ(m)</b>	Potentiel de membrane (mitochondrial)
<b>AG(L)</b>	Acides gras (libres)
<b>AgRP</b>	Agouti-gene related protein
<b>AKT</b>	Protéine kinase B
<b>AMPK</b>	AMP-activated protein kinase
<b>BDNF</b>	Brain-derived neurotrophic factor
<b>BHE</b>	Barrière hématoencéphalique
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	Concentration intracellulaire de calcium
<b>CART</b>	Cocaine-amphetamine-regulated transcript
<b>DMN</b>	Noyau dorso-médian
<b>DT2</b>	Diabète de type 2
<b>DRP1</b>	Dynamin related protein 1
<b>EM</b>	Eminence médiane
<b>FIS1</b>	Fission protein 1
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein
<b>GK</b>	Glucokinase
<b>GLUTs</b>	Transporteurs du glucose
<b>GSH/GSSG</b>	Glutathion réduit/oxydé
<b>GSH</b>	récepteur de la ghréline
<b>(H)GE/(H)GI</b>	(High) glucose-excited/inhibited
<b>ICV</b>	Intra-cérébro-ventriculaire
<b>IR</b>	Récepteur à l'insuline
<b>JAK</b>	Janus kinase
<b>K<sub>ATP</sub></b>	Canaux potassiques ATP-dépendants
<b>LCR</b>	Liquide céphalorachidien
<b>LepR</b>	Récepteur de la leptine
<b>LH</b>	Aire latérale de l'hypothalamus
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinases
<b>MBH</b>	Hypothalamus médio-basal
<b>MCH</b>	Melanin-concentrating hormone
<b>MCR</b>	Récepteurs à mélanocortine
<b>MFN</b>	Mitofusines
<b>(m)ROS</b>	Espèces actives de l'oxygène (d'origine mitochondriale)
<b>NA</b>	Noyau arqué
<b>NO</b>	Monoxide d'azote



<b>NPY</b>	Neuropeptide Y
<b>OPA1</b>	Optic atrophy 1
<b>PA</b>	Prise alimentaire
<b>PI3K</b>	Phosphoinositide 3-kinase
<b>POMC</b>	Pro-opiomélanocortine
<b>PVN</b>	Noyau para-ventriculaire
<b>RE</b>	Réticulum endoplasmique
<b>SF1</b>	Steroidogenic factor 1
<b>SNA</b>	Système nerveux autonome
<b>SNC</b>	Système nerveux central
<b>SOD</b>	Superoxydes dismutases
<b>STAT</b>	Signal Transducers and Activators of Transcription
<b>UCPs</b>	Protéines découplantes
<b>VMN</b>	Noyau ventro-médian



**Figure 1 : Représentation schématique de l'homéostasie énergétique**

*L'équilibre entre les apports et les dépenses énergétiques assure le maintien d'un poids corporel stable au cours de la vie de l'individu. Un déséquilibre qui se prolonge dans le temps, dans un sens comme dans l'autre, aboutira à la mise en place de pathologies métaboliques.*

# Introduction générale

---

De façon générale, ce travail s'intéresse au développement d'une maladie métabolique chronique, le diabète de type 2 (DT2). Cette maladie atteint des proportions épidémiques à travers le monde, puisqu'en 2014, 8% de la population mondiale est atteinte de DT2, ce qui en fait une préoccupation majeure de santé publique. Le DT2 est en grande partie le résultat d'une surcharge pondérale (obésité) et de sédentarité. Aussi appelé « diabète non insulino-dépendant », il résulte d'une résistance à l'insuline par l'organisme qui entraîne une hyperglycémie (glycémie à jeun  $\geq 7$  mM). L'absence de régulation de la glycémie conduit avec le temps à des atteintes graves de nombreux systèmes organiques, et plus particulièrement des nerfs et des vaisseaux sanguins. Chaque année, le DT2 est la cause de plus d'un million de décès dans le monde (OMS <http://www.who.int/>).

La stratégie de l'Organisation Mondiale de la Santé pour la prévention du diabète, est d'inciter la population à adopter un régime alimentaire sain et à pratiquer un exercice physique régulier, dans le but de réduire la prévalence de l'obésité. Malgré cela, les chiffres concernant le DT2 ne cessent d'augmenter. Le but de la recherche scientifique est donc dans un premier temps de comprendre les mécanismes physiologiques impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique, puis d'étudier les dérégulations qui se mettent en place lors du développement de la pathologie, afin d'élaborer à terme des programmes de prévention, de dépistages précoces et/ou des approches thérapeutiques efficaces.

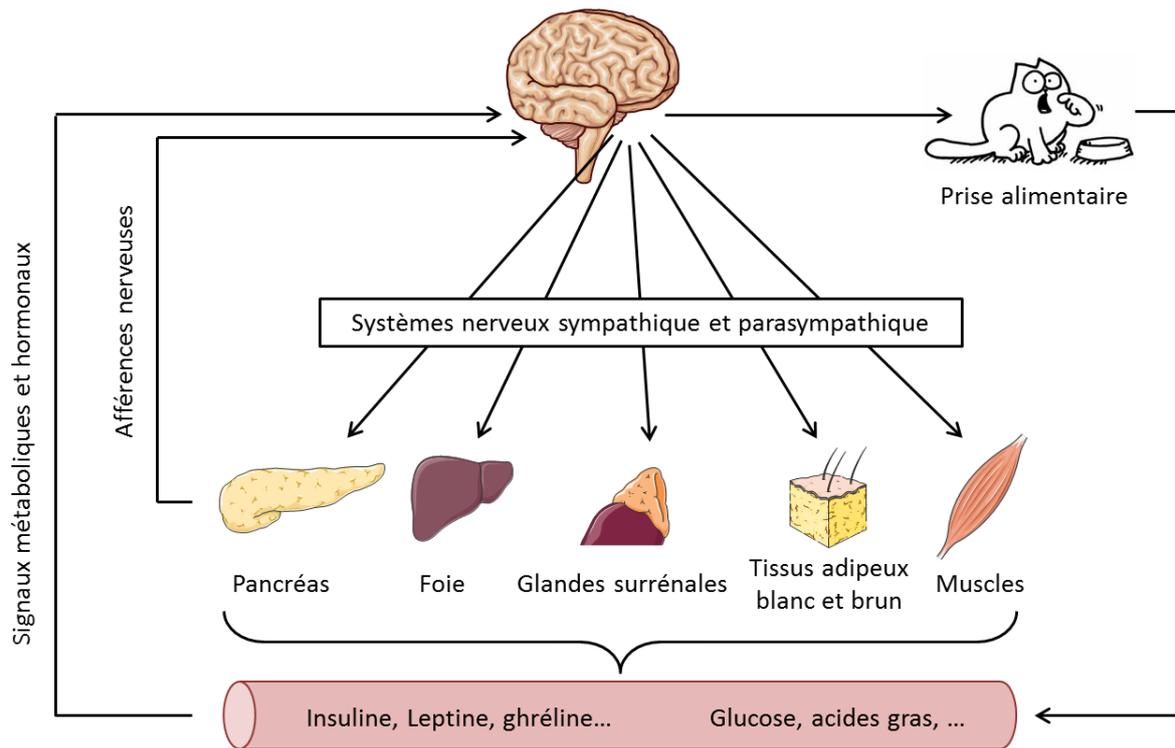
Malgré la variabilité des apports et des dépenses énergétiques au cours d'une journée, ou même de la vie d'un individu, l'organisme maintient un statut énergétique relativement stable. On parle d'homéostasie énergétique. Ainsi, le corps possède la capacité de maintenir un état d'équilibre entre les apports d'énergie, représentés par la prise alimentaire (PA), et les dépenses d'énergie, représentées par le métabolisme de base, l'activité physique et la thermogenèse (**Figure 1**). Cet équilibre dynamique inclut le maintien de paramètres biologiques autour d'une valeur physiologique de référence (glycémie autour de 5 mM par exemple) et permet la conservation d'un poids corporel stable au cours de la vie de l'individu. C'est la notion de pondérostasie.



En cas d'éloignement au-dessus ou en-dessous de cette valeur, un système de régulation est activé afin d'induire des réponses physiologiques adaptées dans le but de restaurer l'équilibre. En situation de déficit énergétique, la PA est stimulée et les réserves de substrats énergétiques sont mobilisées (glucides, puis lipides, puis protéines), alors que les dépenses sont freinées. Inversement, en cas d'excédent, la PA est inhibée, les substrats énergétiques sont stockés et les dépenses sont favorisées.

Au XIX<sup>e</sup> siècle, les travaux de Claude Bernard évoquent pour la première fois l'implication du système nerveux central (SNC) dans le contrôle du métabolisme énergétique. En effet, suite à la stimulation du plancher du 4<sup>e</sup> ventricule, le physiologiste a observé l'apparition d'une hyperglycémie, concluant que cette zone cérébrale contrôle la production hépatique de glucose. Bien que controversés par la suite, ses travaux ont incité d'autres neurophysiologistes à poursuivre l'étude de l'implication du cerveau dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Ainsi, un grand intérêt s'est porté sur l'hypothalamus. En effet, il a été montré que la lésion de l'hypothalamus médio-basal (MBH), formé de l'hypothalamus ventro-médian (VMN) et du noyau arqué (NA), entraînait une hyperphagie conduisant à l'obésité, définissant cette région comme le « centre de la satiété » (Kennedy, 1950). A l'inverse, la lésion bilatérale de l'aire latérale de l'hypothalamus (LH) entraînait l'arrêt de la PA jusqu'à la mort de l'animal, définissant cette région comme le « centre de la faim » (Anand and Brobeck, 1951). Quelques années plus tard, Jean Mayer a énoncé la « théorie glucostatique » en montrant que les variations de la glycémie modulent en conséquence la PA, et conclut sur l'existence de gluco-récepteurs dans le « centre de la faim » de l'hypothalamus, capables de détecter la quantité de glucose disponible dans le sang qui reflète le statut physiologique des tissus (Mayer, 1953). L'ensemble de ces études historiques démontrent donc le rôle crucial du SNC, et plus particulièrement de l'hypothalamus, dans la détection et l'intégration des signaux énergétiques et son implication dans la régulation du métabolisme énergétique.

Ainsi, le cerveau est informé en permanence du statut énergétique de l'organisme, en détectant directement les taux circulants de nutriments (glucose et acides gras principalement) et d'hormones (insuline, leptine, ghréline, ...), ou en recevant des informations nerveuses, principalement via le système nerveux autonome (SNA) provenant des organes périphériques (pancréas, foie, tissus adipeux, ...) (Abizaid and Horvath, 2008; Berthoud, 2002; Gao and Horvath, 2008) **(Figure 2)**. Le cerveau reçoit

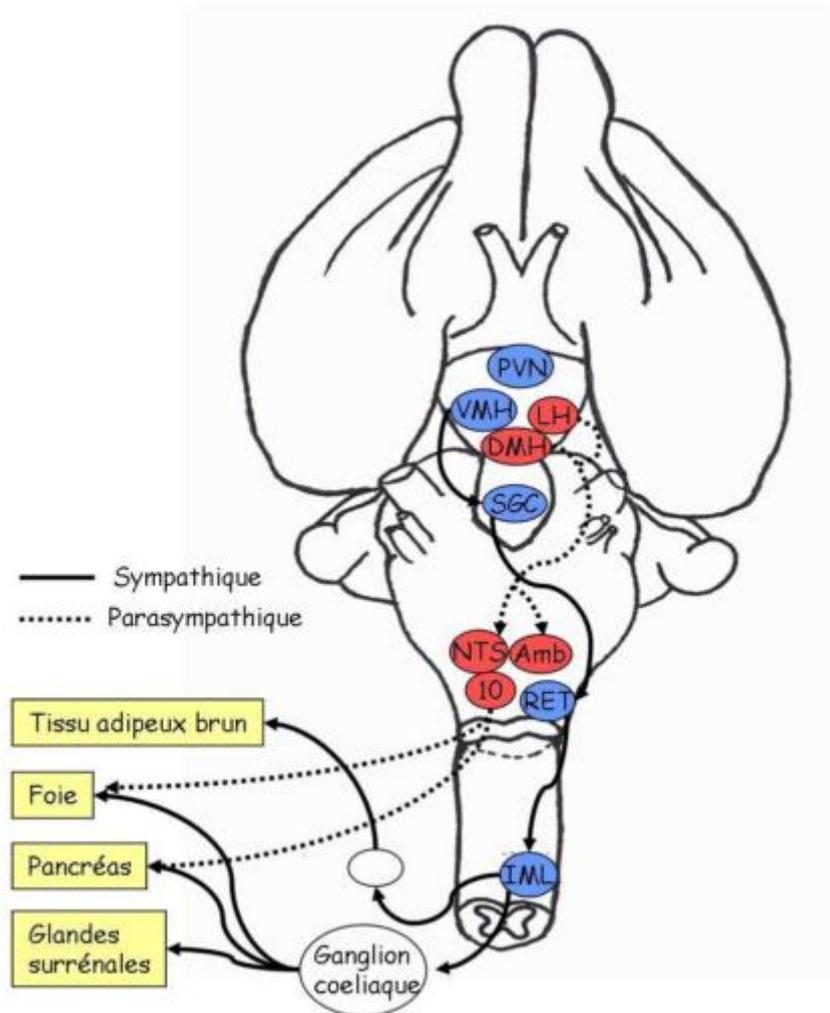


**Figure 2 : Contrôle nerveux de l'homéostasie énergétique**

*Le cerveau est informé du statut énergétique de l'individu par des signaux métaboliques et hormonaux. En réponse, il régule le métabolisme énergétique en agissant sur les capacités sécrétrices ou directement sur l'activité métabolique de certains tissus ou organes (d'après Pénicaud, 2003).*

aussi des afférences nerveuses qui viennent de senseurs métaboliques périphériques, comme le système porte, le tractus intestinal et les corps carotidiens, capables de détecter les variations plasmatiques de nombreux paramètres métaboliques (Breen *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2014; Seyer *et al.*, 2013). L'intégration centrale de ces informations va ainsi permettre au cerveau de contrôler en retour l'activité sécrétoire ou métabolique de différents tissus ou organes qu'il innerve via le SNA, en modulant par exemple la sécrétion d'insuline par le pancréas ou de l'adrénaline par les glandes surrénales, l'activité métabolique du foie et des tissus adipeux ou encore la thermogénèse (**Figure 2**) (Atef *et al.*, 1997; Le Feuvre *et al.*, 1991; Poci *et al.*, 2005).

Dans ce contexte, mon travail s'est intéressé aux mécanismes moléculaires impliqués dans la détection hypothalamique du glucose, dans un modèle de rat nourri avec un régime gras enrichi en saccharose, mimant ainsi les deux apports caloriques principalement en excès dans nos sociétés occidentales. Je me suis plus particulièrement focalisée sur l'importance du métabolisme mitochondrial et de la signalisation induite par la mitochondrie via la production d'espèces actives de l'oxygène (ROS) en réponse à l'hyperglycémie. Récemment, notre équipe a montré que ces éléments étaient altérés dans un modèle animal génétiquement obèse et diabétique. De nombreuses études montrent l'existence de dysfonctionnements mitochondriaux au niveau hypothalamique dans les maladies comme l'obésité et le DT2, et dernièrement l'importance de la morphologie des mitochondries dans la régulation de l'homéostasie énergétique commence à émerger.



**Figure 3 : Représentation schématique des connexions entre l'hypothalamus, le tronc cérébral, les principales voies nerveuses du système nerveux autonome et leurs tissus ou organes cibles**

*Amb : Noyau ambigu ; DMH : Hypothalamus dorso-médian ; IML : Colonne intermedio-latérale ; LH : Hypothalamus latéral ; NTS : Noyau du tractus solitaire ; PVN : Noyau para-ventriculaire ; RET : Formation réticulée ; SGC : Substantia grisea centralis ; VMH : Hypothalamus ventro-médian ; IO : Noyau moteur du vague (d'après Pénicaud et al., 2006).*

# Chapitre I : Régulation nerveuse de l'homéostasie énergétique

---

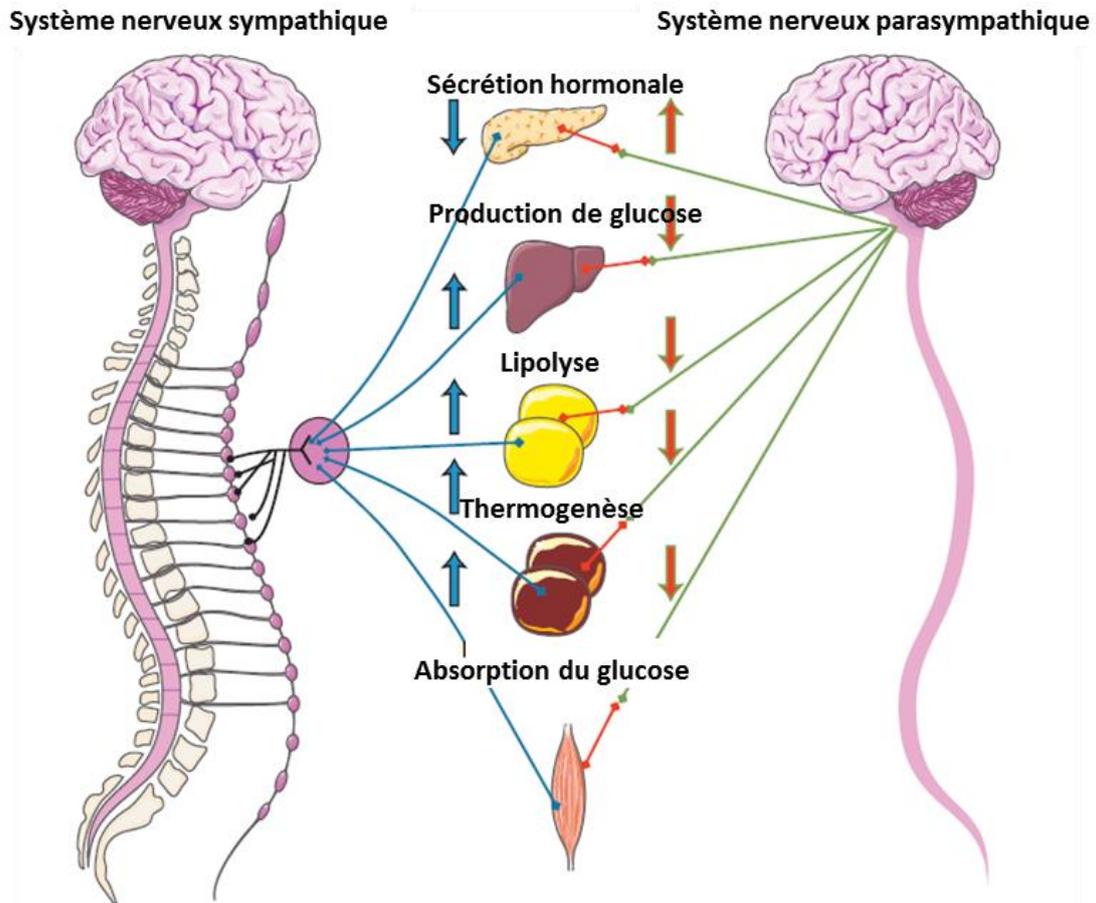
Parmi les structures du SNC impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique, le tronc cérébral et l'hypothalamus occupent une place primordiale puisque ces deux structures sont capables d'intégrer les informations provenant de la périphérie. Elles vont ainsi intégrer les signaux périphériques de types métaboliques (glucose, acides gras) et endocriniens (insuline, leptine, ...). Le tronc cérébral est aussi capable d'intégrer les informations provenant des afférences nerveuses des tissus périphériques. Ces deux structures communiquent entre elles, pour en retour, interagir avec les tissus périphériques via le SNA ou le système nerveux endocrinien afin d'assurer un maintien de l'homéostasie énergétique de l'organisme.

La régulation nerveuse de l'homéostasie énergétique est un mécanisme très complexe qui fait aussi intervenir des paramètres externes (vision, olfaction, rythmes circadiens) ou cognitifs (préférences, récompenses). Cependant, seuls les signaux métaboliques internes intégrés au niveau hypothalamique seront développés.

## 1) Le système nerveux autonome dans le contrôle du métabolisme énergétique

Le SNA est l'ensemble du système nerveux qui contrôle les fonctions végétatives de l'organisme. C'est une voie afférente majeure puisque le SNA innerve une grande majorité des organes périphériques, dont les tissus et organes impliqués dans le métabolisme énergétique (pancréas, foie, ...). Le point de départ des fibres afférentes du SNA est le tronc cérébral qui comporte des noyaux-relais primordiaux entre l'hypothalamus et le SNA. Il contient la majorité des somas des neurones pré-ganglionnaires vagues qui sont les cibles de projections issues notamment de l'hypothalamus, permettant une mise en place des réponses physiologiques adaptées via un contrôle nerveux de l'activité métabolique des organes et tissus périphériques (**Figure 3**) (Fox and Powley, 1985; Luckman and Lawrence, 2003).

Le SNA est constitué de deux composantes, le système nerveux sympathique et le système nerveux parasympathique. La modulation de leur activité sur un organe a



**Figure 4 : Le système nerveux autonome et la régulation du métabolisme énergétique**

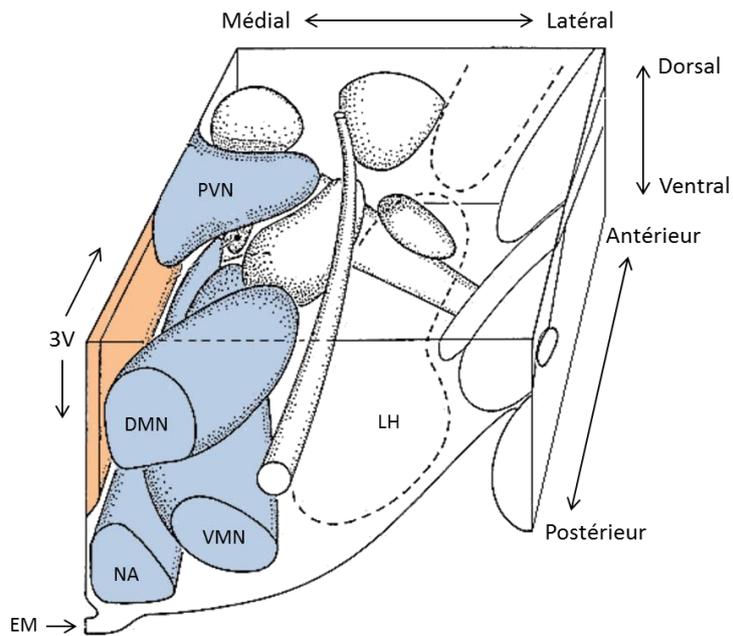
Le système nerveux sympathique possède des neurones pré-ganglionnaires courts (traits noirs) qui ont pour origine la colonne intermédo-latérale, longeant la colonne vertébrale thoraco-lombaire. Ils font relais avec des neurones post-ganglionnaires longs (traits bleus) au niveau de nombreux ganglions. Le système nerveux parasympathique possède inversement des neurones pré-ganglionnaires longs (traits verts) qui ont pour origine le bulbe rachidien/la moelle épinière antérieure (complexe dorso-vagal). Ils font relais avec des neurones post-ganglionnaires court (traits rouges). Ces systèmes innervent en partie les mêmes organes ou tissus périphériques, exerçant des effets opposés sur les sécrétions hormonales, la production hépatique de glucose, la lipolyse et la thermogenèse au niveau du tissu adipeux et l'entrée du glucose dans les muscles (Marino et al., 2011).

souvent des effets opposés. Le système nerveux parasympathique, activé lors d'un excès énergétique, est impliqué dans la mise en place de réactions anaboliques, en favorisant le stockage d'énergie (glycogénogenèse et lipogenèse). A l'inverse, le système nerveux sympathique est impliqué dans la mise en place de réactions cataboliques, en induisant la mobilisation du glucose et des acides gras libres (AGL) à partir des tissus de réserves. Il est donc activé lors d'un déficit énergétique (Scheurink and Nolan, 1996; Teff, 2009).

Le foie et le pancréas, organes fondamentaux dans la régulation du métabolisme énergétique, présentent une très riche innervation par le SNA. Au niveau pancréatique, à la fois les cellules  $\alpha$  et les cellules  $\beta$  sont sous la dépendance de ce contrôle. L'activation des nerfs splanchniques pancréatiques induit une augmentation de la sécrétion de glucagon et une diminution de la sécrétion d'insuline alors que l'activation du nerf vague stimule la sécrétion d'insuline et inhibe celle de glucagon (**Figure 4**) (Nonogaki, 2000). Ainsi, une vagotomie ou l'administration d'atropine, un antagoniste des récepteurs muscariniques, inhibe la sécrétion d'insuline en réponse à l'injection de glucose (Scheurink and Nolan, 1996). Le foie, quant à lui, se trouve sous l'influence du SNA par l'innervation directe des hépatocytes et indirecte par l'effet des hormones sécrétées sous l'influence du SNA parasympathique (Nonogaki, 2000). L'innervation sympathique des hépatocytes induit une libération de glucose (**Figure 4**). Les muscles squelettiques et le tissu adipeux sont également sous l'influence du SNA. Au niveau des adipocytes, les fibres sympathiques stimulent la lipolyse tandis que les fibres parasympathiques exercent un effet sur la capture de glucose en augmentant la sensibilité à l'insuline (**Figure 4**) (Fliers *et al.*, 2003).

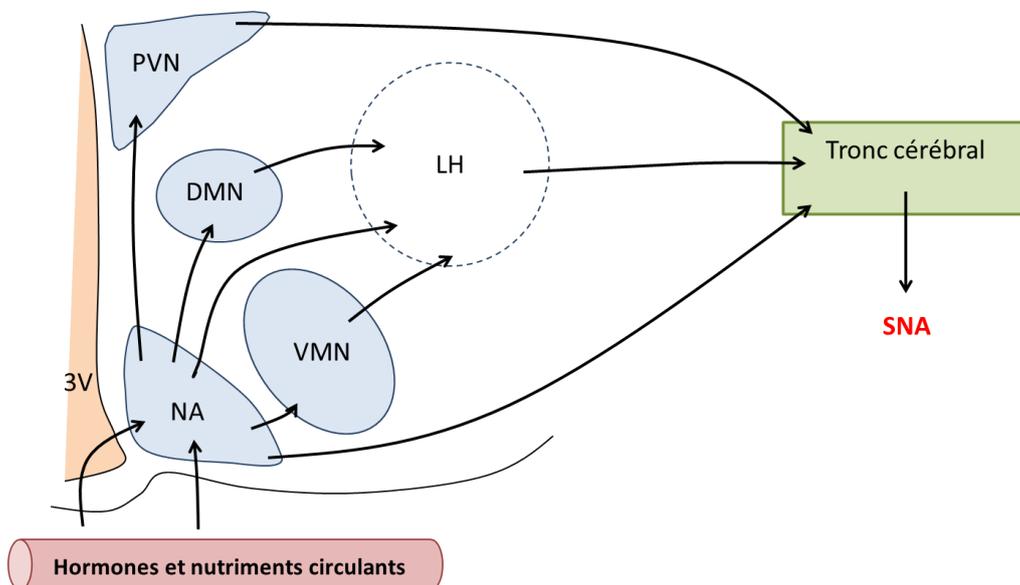
Le maintien de l'homéostasie énergétique dépend de l'équilibre entre les tonus sympathique et parasympathique. Cet équilibre est fortement modifié dans les pathologies métaboliques. Chez des animaux obèses ou soumis à un régime gras, on observe une augmentation du tonus parasympathique couplée à une diminution du tonus sympathique, au niveau pancréatique, conduisant à une augmentation de la sécrétion d'insuline (Atef *et al.*, 1995, 1997; Magnan *et al.*, 1999).

La modulation de l'activité du SNA implique des populations neuronales spécialisées dans la détection et le traitement des informations périphériques, capables d'adapter leur activité pour contrôler en retour le métabolisme énergétique et la prise alimentaire, réponses physiologiques nécessaires au retour à l'équilibre énergétique de



**Figure 5 : Vue tridimensionnelle de l'organisation des aires et noyaux hypothalamiques dans l'hémisphère droit chez le rat**

DMN : Noyau dorso-médian ; EM : Eminence médiane ; LH : Hypothalamus latéral ; NA : Noyau arqué ; PVN : Noyau para-ventriculaire ; VMN : Noyau ventro-médian ; 3V : 3<sup>e</sup> ventricule (d'après Berthoud, 2002).



**Figure 6 : La détection des signaux périphériques par l'hypothalamus induit la modulation du SNA**  
 DMN : Noyau dorso-médian ; LH : Hypothalamus latéral ; NA : Noyau arqué ; PVN : Noyau para-ventriculaire ; SNA : Système nerveux autonome ; VMN : Noyau ventro-médian ; 3V : 3<sup>e</sup> ventricule.

l'organisme (Dietrich and Horvath, 2009; Zheng and Berthoud, 2008). Ainsi, l'hypothalamus, via ses connexions avec le tronc cérébral, fait partie des structures du SNC qui occupent une place primordiale dans la régulation nerveuse de l'homéostasie énergétique (Blouet and Schwartz, 2010; Schneeberger *et al.*, 2014).

## 2) Une structure cérébrale clé, l'hypothalamus

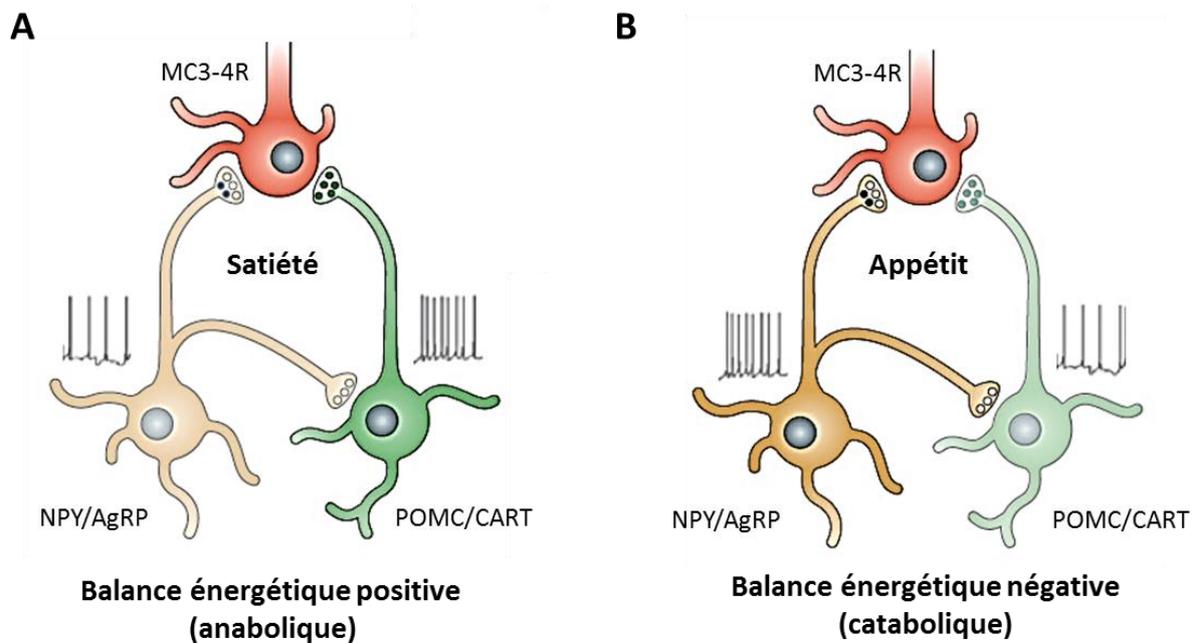
### a) Description anatomique

Situé sur la face ventrale du cerveau, l'hypothalamus est une structure bilatérale issue du diencephale et distribuée de part et d'autre du 3<sup>e</sup> ventricule (3V). Il est constitué d'un ensemble de noyaux (regroupements spécifiques de populations neuronales), parmi lesquels le LH, le VMN, le NA, le noyau dorso-médian (DMN) et le noyau para-ventriculaire (PVN) sont les principales structures impliquées dans le contrôle du métabolisme énergétique (**Figure 5**) (Berthoud, 2002).

De façon très générale, la région péri-ventriculaire de l'hypothalamus est impliquée dans la détection des signaux circulants (issus du sang et du liquide céphalorachidien (LCR)) et l'organisation des réponses endocriniennes (via les projections sur l'hypophyse et l'éminence médiane (EM)). Ainsi, le NA est un des premiers sites de détection hypothalamique des paramètres énergétiques circulants. Le NA projette sur les noyaux de la région médiane de l'hypothalamus, composée de gros noyaux tels que le DMN et le VMN. Cette région reçoit aussi de nombreuses efférences sensorielles et est impliquée dans les comportements adaptatifs. La région latérale, qui ne comprend pas de noyaux clairement identifiés, est considérée comme étant l'interface entre l'hypothalamus et les systèmes moteurs autonome et somatique. Les informations intégrées dans l'hypothalamus sont ainsi relayées aux régions du tronc cérébral, permettant la modulation du SNA et finalement de l'activité sécrétoire et métabolique des organes périphériques (**Figure 6**) (Luiten *et al.*, 1987; Williams *et al.*, 2001).

### b) Régulation de la prise alimentaire

Comme évoqué dans l'introduction générale, les premières études effectuées sur l'hypothalamus ont permis de mettre en évidence le rôle primordial de l'hypothalamus dans la régulation de la PA. Pour assurer cette fonction, le NA en particulier contient des



**Figure 7 : Rôle des neurones POMC/CART et NPY/AgRP dans la régulation de la prise alimentaire**

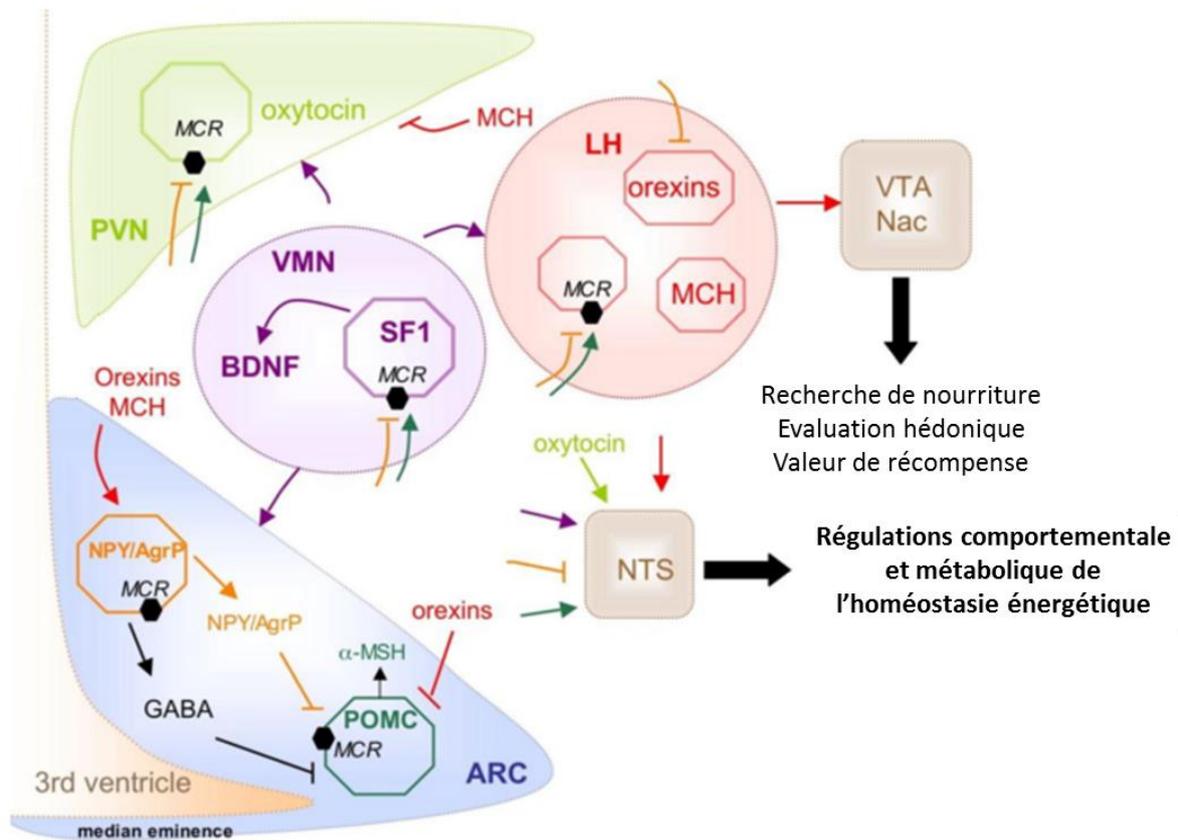
(A) Lorsque la balance énergétique est positive, les neurones POMC/CART vont être activés afin d'exercer un effet anorexigène et catabolique. Leur action anorexigène est relayée par les récepteurs MC3-4R présents sur les cellules cibles dans le but d'induire la satiété. (B) Lorsque la balance énergétique est négative, les neurones NPY/AgRP vont être activés afin d'exercer un effet orexigène et anabolique. Leur action orexigène passe principalement par la libération de NPY sur ces neurones cibles (récepteur Y1 ou Y5) et l'inhibition, par AgRP, antagoniste des récepteurs MC3-4R, sur les neurones POMC. A cela s'ajoute une co-libération de GABA pour inhiber ces derniers. L'ensemble conduit à stimuler l'appétit et déclencher la PA.

AgRP : Agouti-gene related protein ; CART : Cocaine-amphetamine-regulated transcript ; MC3-4R : Isoformes 3 et 4 du récepteur à mélanocortine ; NPY : Neuropeptide Y ; POMC : Pro-opiomélanocortine (d'après Dietrich and Horvath, 2013).

populations neuronales spécialisées, dotées des équipements nécessaires à la détection des facteurs circulants. Ces neurones sont capables de moduler leur activité afin de sécréter des neuropeptides, et grâce à leurs projections vers d'autres noyaux intra- ou extra- hypothalamiques, permettent d'induire des réponses physiologiques adaptées afin de réguler l'homéostasie énergétique, principalement via la modulation de la PA. C'est le système à mélanocortine de l'hypothalamus (Ellacott and Cone, 2006; Koch and Horvath, 2014). Deux populations neuronales principales se distinguent, aux rôles antagonistes : les neurones anorexigènes à pro-opiomélanocortine (POMC) et les neurones orexigènes à neuropeptide Y (NPY).

### i) Les neurones POMC/CART

Les neurones qui co-expriment la POMC et le Cocaine-Amphetamine-Regulated Transcript (CART) exercent un effet anorexigène (ou catabolique) en diminuant la PA et en augmentant les dépenses énergétiques afin de réduire le poids corporel chez l'animal et chez l'Homme (**Figure 7A**). POMC est un peptide précurseur, ultérieurement clivé en peptides à mélanocortine fonctionnels, tels que l' $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH), dont l'action anorexigène est relayée par les récepteurs à mélanocortine (MC3R et MC4R) (Coll and Loraine Tung, 2009; Lau and Herzog, 2014). Les neurones POMC possèdent des projections sur le PVN et le LH où sont présents MC3R et MC4R (King and Hentges, 2011). L'importance de ces récepteurs dans le contrôle du métabolisme énergétique a été démontrée dans un modèle rongeur où la mutation de MC3R et/ou MC4R, bloquant toute activité, induit une hyperphagie ainsi qu'un phénotype obèse et diabétique (Atalayer *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2000; Huszar *et al.*, 1997; King and Hentges, 2011). De plus, les souris présentant une déficience en POMC développent une obésité précoce (Yaswen *et al.*, 1999) et il a été mis en évidence que les mutations du gène POMC ou de MC4R sont à l'origine de 5% des cas d'obésité chez l'Homme (Krude *et al.*, 1998; MacKenzie, 2006). L'ensemble de ces études démontrent ainsi le rôle critique des neurones POMC dans la régulation de la PA et plus généralement dans l'homéostasie énergétique.



**Figure 8 : Schéma récapitulatif des neuropeptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la PA et du métabolisme énergétique**

Les noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique contiennent des populations neuronales spécialisées dans la sécrétion de neuropeptides permettant la régulation de la PA. Ainsi, le système à mélanocortine (neurones POMC via l'αMSH et les neurones NPY/AgRP du NA) interagit notamment avec les neurones à orexines et à MCH du LH, les neurones à SF1 dans le VMN et les neurones à oxytocine dans le PVN. Les informations sont ensuite relayées par le VTA et le Nac afin de moduler les comportements alimentaires, ou par le NTS dans le tronc cérébral afin de moduler l'homéostasie énergétique via le SNA.

αMSH : α-Melanocyte stimulating hormone ; AgRP : Agouti-gene related protein ; ARC : Noyau arqué ; BDNF : brain-derived neurotrophic factor ; GABA : Acide γ-aminobutyrique ; LH : Hypothalamus latéral ; MCH : Melanin-concentrating hormone ; MCR : Récepteur à mélanocortine ; Nac : Noyau accumbens ; NPY : Neuropeptide Y ; NTS : Noyau du tractus solitaire ; POMC : Pro-opiomélanocortine ; PVN : Noyau paraventriculaire ; SF1 : Steroidogenic factor 1 ; VMN : Noyau ventro-médian ; VTA : Aire tegmentale ventrale (d'après Blouet and Schwartz, 2010).

## ii) Les neurones à NPY/AgRP

A l'inverse des neurones POMC, les neurones qui co-expriment le NPY et l'agouti-gene related protein (AgRP) exercent un effet orexigène (ou anabolique) en augmentant la PA et en diminuant les dépenses en situation de déficit énergétique (**figure 7B**) (Dryden *et al.*, 1998). En effet, l'injection intracérébrale de NPY stimule la PA et diminue les dépenses énergétiques, aboutissant à une prise de poids et au développement d'une obésité (Billington *et al.*, 1991; Stanley *et al.*, 1986). Le NPY exerce ses effets orexigènes par l'intermédiaire, essentiellement, des récepteurs de type Y1R et Y5R (Gerald *et al.*, 1996). En revanche, le mode d'action de l'AgRP est sensiblement différent puisqu'il n'active pas de récepteur qui lui soit propre. Le peptide AgRP est en effet un antagoniste des récepteurs MC3R et MC4R, en inhibant l'action de l' $\alpha$ -MSH (Bagnol *et al.*, 1999; Ollmann *et al.*, 1997). Contrairement aux mutations du gène POMC, l'ablation des gènes NPY et AgRP au stade néonatal ne modifie pas le phénotype des animaux, alors que s'il est effectué à l'âge adulte, il entraîne rapidement l'arrêt de la PA, montrant que des mécanismes compensatoires se mettent en place au cours du développement (Luquet *et al.*, 2005; Qian *et al.*, 2002).

## i) Autres neuropeptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire

Bien que le système à mélanocortine soit le circuit participant à la régulation de la PA le mieux caractérisé de l'hypothalamus, d'autres neuropeptides hypothalamiques participent aussi à cette régulation (**Figure 8**) (Boughton and Murphy, 2013). Parmi eux, nous citerons :

### *Les neuropeptides anorexigènes*

Les neurones exprimant la protéine SF1 (steroidogenic factor 1) sont spécifiques du VMN. Ces neurones, glutamatergiques, sont impliqués dans les réponses homéostatiques lors de l'hypoglycémie (en agissant sur la sécrétion de glucagon notamment) (Tong *et al.*, 2007). De plus, les souris KO pour SF1 sont obèses (Majdic *et al.*, 2002) démontrant ainsi la participation indispensable des neurones SF1 dans la régulation du métabolisme énergétique (Choi *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2011).



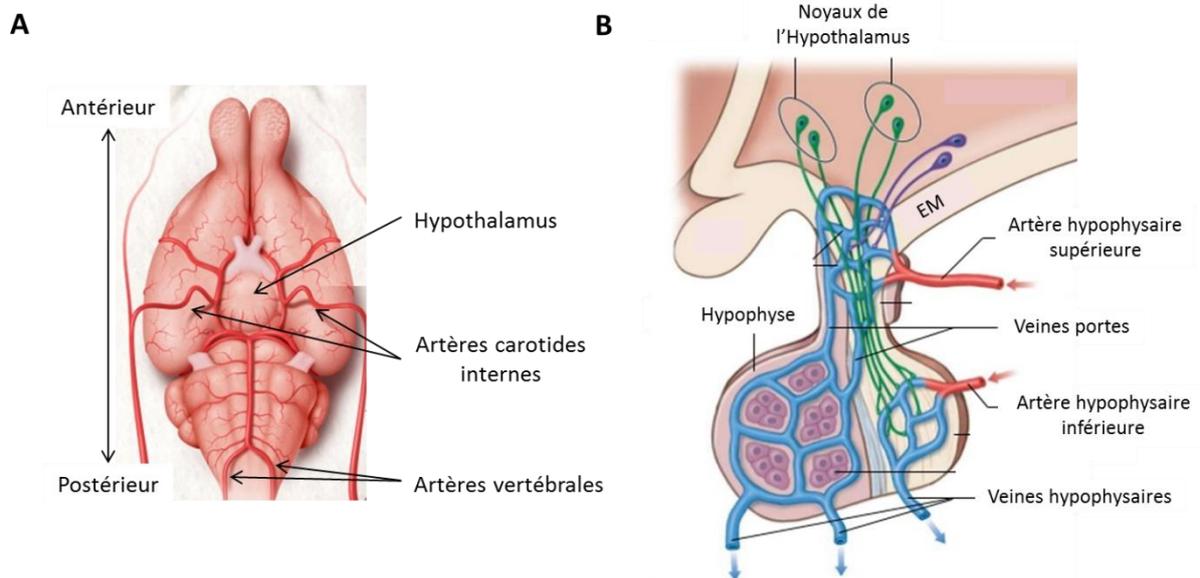
Certains neurones du VMN expriment aussi le brain-derived neurotrophic factor (BDNF), un facteur neurotrophique possédant un rôle anorexigène. L'injection de BDNF dans le VMN induit une diminution de la PA et une augmentation des dépenses énergétiques, conduisant à une perte de poids chez le rat, et permet même de réduire l'effet obésogène d'un régime gras (Godar *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010a, 2010b). A l'inverse, on observe le développement d'une obésité en son absence (Rios *et al.*, 2001), ce qui montre l'importance du BDNF dans la régulation du métabolisme énergétique (Cordeira and Rios, 2011; Lebrun *et al.*, 2006).

D'autres neuropeptides hypothalamiques participent à la réduction de la PA, tels que la CRH (Corticotropin Releasing Hormone) (Gosnell *et al.*, 1983), la TRH (Thyreotropin Releasing Hormone) (Suzuki *et al.*, 1982), l'ocytocine (Arletti *et al.*, 1990) ou encore les neuromédines U et S (Nakahara *et al.*, 2010; Wren *et al.*, 2002),

### *Les neuropeptides orexigènes*

Le LH contient deux populations neuronales exprimant des peptides orexigènes, impliqués dans la régulation de la PA et de l'éveil : les orexines A et B (ou hypocrélines A et B) et le neuropeptide MCH (melanin-concentrating hormone) (Barson *et al.*, 2013; Guan *et al.*, 2002; Sakurai, 2014; Tsujino and Sakurai, 2009). L'action des neurones à orexines est relativement complexe car leur activation induit une augmentation du tonus sympathique (actions cataboliques) et de la PA mais augmente aussi les dépenses énergétiques en favorisant la thermogénèse et l'activité locomotrice (Dube *et al.*, 1999; Kotz *et al.*, 2002; Messina *et al.*, 2014; Novak and Levine, 2009). A l'inverse, l'absence d'orexines chez la souris entraîne des symptômes de narcolepsie associés au développement tardif d'une obésité, malgré une diminution significative de la PA, comparée à des souris normales (Hara *et al.*, 2001).

De la même façon, l'activation des neurones à MCH stimule la PA et conduit au développement d'une obésité et d'une résistance à l'insuline (Della-Zuana *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2003; Ludwig *et al.*, 2001). La MCH étant un peptide qui favorise le sommeil, son absence chez la souris entraîne une augmentation de l'activité locomotrice, accompagnée d'une hypophagie. Ces effets contribuent ainsi à des effets cataboliques marqués, aboutissant à une réduction importante du poids (Brown *et al.*, 2015; Shimada *et al.*, 1998).



**Figure 9 : Vascularisation de l'hypothalamus**

(A) Représentation schématique du polygone de Willis sur un cerveau de rongeur en vue ventrale. (B) Représentation schématique du système porte hypothalamo-hypophysaire et sa communication avec l'hypothalamus.

EM = Eminence médiane.

Enfin, la galanine, présente au niveau du NA, est un neuropeptide impliqué dans la régulation des comportements alimentaires et du métabolisme énergétique (Larm and Gundlach, 2000; Shiba *et al.*, 2010). Son action est complexe puisque son administration intra-cérébro-ventriculaire (ICV) induit une augmentation de la PA chez le rat mais son expression apparait diminuée lors du jeûne (Johansson *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2002).

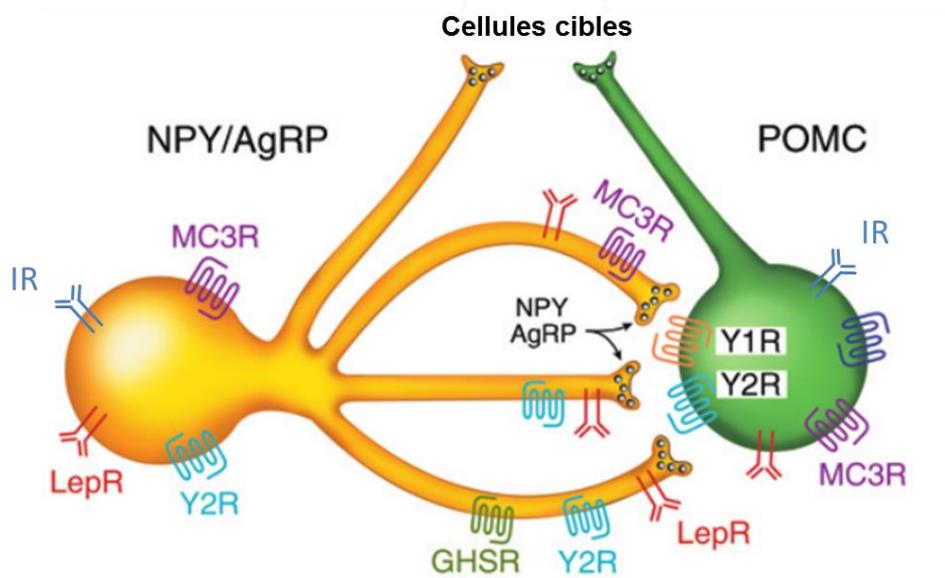
### c) Intégration des informations circulantes

Dans le but de réguler parfaitement la PA, ainsi que l'activité métabolique des organes périphériques, l'hypothalamus doit en permanence être informé du statut énergétique de l'organisme. Pour cela, la détection des signaux de nature métabolique ou hormonale, circulant dans le sang, est indispensable. Ces informations circulantes atteignent notamment l'hypothalamus, grâce à la proximité du système porte hypothalamo-hypophysaire et du LCR présent dans le 3V.

#### i) Le système porte hypothalamo-hypophysaire

La détection des informations circulantes est tout d'abord facilitée par la proximité du polygone de Willis, système vasculaire irrigant le cerveau et faisant de l'hypothalamus la première structure cérébrale alimentée par le sang artériel. C'est un système d'anastomoses artérielles irrigué par les deux artères carotides internes et la fusion des deux artères vertébrales (**Figure 9A**). Le cerveau recevant la plus grande partie de ses ressources en oxygène et en nutriments via ce système de vascularisation, les anastomoses entre les artères arrivant au cerveau permettent de compenser l'insuffisance ou la lésion de l'une d'entre elles (Duret, 1874; Emsley *et al.*, 2006).

Cependant, le cerveau est un organe partiellement isolé de la périphérie via la barrière hématoencéphalique (BHE). Cette structure complexe est formée par des cellules endothéliales spécialisées entourant les capillaires cérébraux, qui ont la particularité de présenter des jonctions serrées, évitant ainsi le libre mouvement de composés présents dans le sang vers le tissu nerveux. Néanmoins, certaines aires cérébrales comme l'hypothalamus, doivent être au contact du système sanguin afin de déceler les variations de la composition sanguine. Il existe donc des fenêtres où la perméabilité de la BHE est augmentée, comme c'est le cas au niveau de l'EM qui délimite ventralement le 3V. A ce niveau, l'irrigation sanguine a pour origine le système porte



**Figure 10 : Représentation schématique de la régulation hormonale du système à mélanocortine**  
*GHSR* : récepteur de la ghréline ; *IR* : récepteur de l'insuline ; *LepR* : récepteur de la leptine ; *MC3R* : isoforme 3 du récepteur à mélanocortine ; *Y1R* et *Y2R* : isoformes 1 et 2 du récepteur au NPY (d'après Cone, 2005).

hypothalamo-hypophysaire, alimenté par les artères hypophysaires qui sont des branches des artères carotides internes (**Figure 9B**) (Ciofi *et al.*, 2009; Ganong, 2000; Langlet *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2010).

Ainsi, la position ventrale de l'hypothalamus confère une proximité immédiate avec le système sanguin, permettant la détection de variation des paramètres métaboliques circulants.

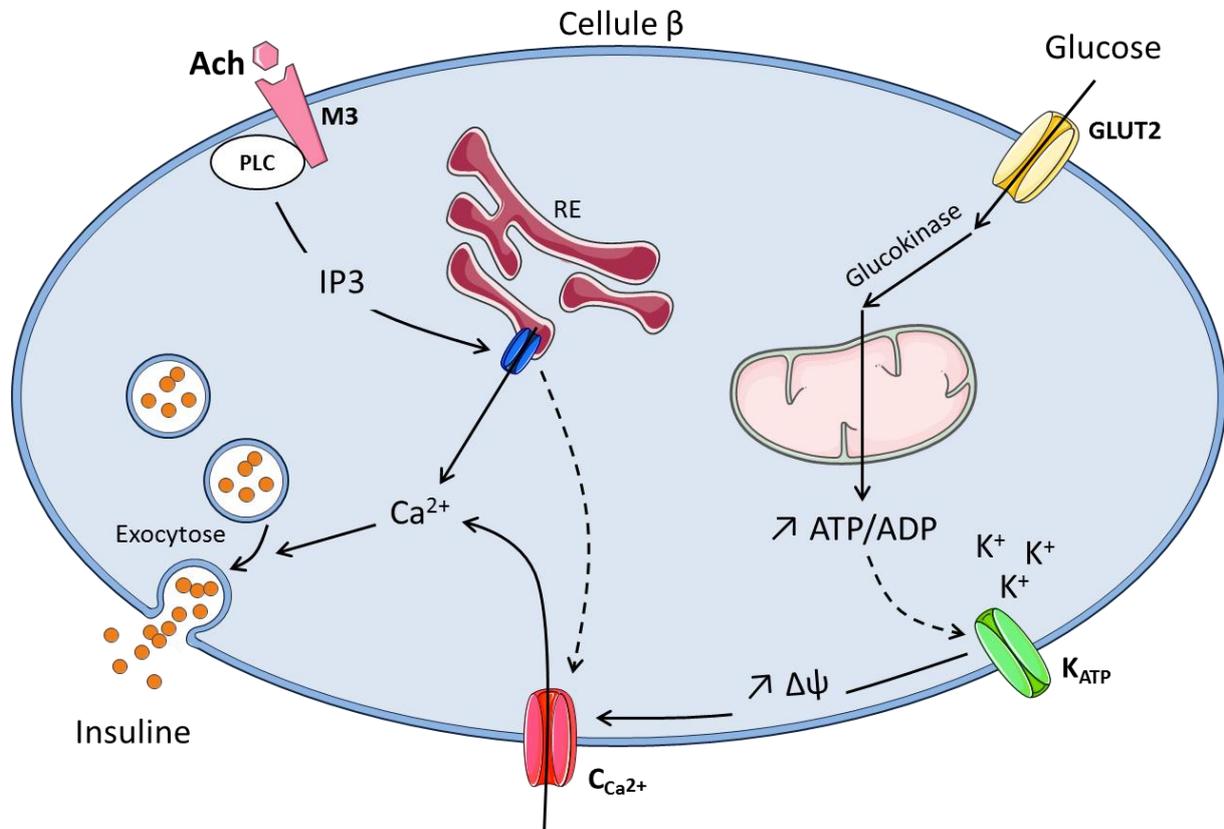
## ii) Le LCR

Le LCR, fabriqué à partir du sang au niveau des plexus choroïdes, présente les mêmes variations de la concentration des paramètres métaboliques que celles du sang, dans de moindres mesures mais de façon proportionnelle (Steffens *et al.*, 1988). Le LCR est ainsi une source d'information pour l'hypothalamus sur le statut métabolique de l'organisme. Cependant, un autre rôle de la BHE est d'éviter le libre mouvement de composés présents dans le LCR vers le tissu nerveux. Elle est donc également composée de cellules ependymaires au niveau des ventricules cérébraux, qui vont avoir un rôle de barrière grâce à la présence de jonctions serrées (Rodríguez *et al.*, 2010). Ainsi, l'hypothalamus est protégé du LCR grâce aux tanocytes, cellules ependymaires particulières qui tapissent le 3V. De récentes études montrent que ces cellules, de plusieurs natures, permettent dans la partie ventrale une perméabilité au niveau du MBH où les jonctions serrées sont moins présentes (Mullier *et al.*, 2010).

Ainsi, la proximité immédiate du LCR contenu dans le 3V permet à l'hypothalamus d'avoir des informations supplémentaires, mais de façon indirecte, sur le statut énergétique de l'organisme.

## 3) Les signaux circulants permettant le maintien de l'homéostasie énergétique

Nous allons maintenant nous intéresser aux paramètres circulants qui permettent d'informer de façon permanente le SNC de l'état des réserves énergétiques, reflétant ainsi le statut métabolique de l'organisme. Les neurones du système à mélanocortine possèdent les équipements nécessaires à la détection des facteurs circulants, notamment les récepteurs à certaines hormones ou transporteurs de nutriments (**Figure 10**). L'hypothalamus est ainsi sensible à de nombreux signaux, de types



**Figure 11 : Mécanisme de sécrétion d'insuline par la cellule  $\beta$  pancréatique chez le rongeur**

Le glucose entre dans les cellules  $\beta$  par l'intermédiaire du transporteur GLUT2, la métabolisation du glucose, qui implique une hexokinase particulière, la glucokinase (GK), va permettre l'augmentation du rapport ATP/ADP. L'ATP ainsi produit interagit alors avec les sous-unités SUR couplées aux canaux potassiques ATP-dépendants ( $K_{ATP}$ ) entraînant leur fermeture et donc l'accumulation intracellulaire des ions potassium. L'augmentation du potentiel de membrane ( $\Delta\psi$ ) ainsi produit induit l'ouverture de canaux calciques voltages-dépendants ( $C_{Ca^{2+}}$ ), permettant une entrée massive de calcium à l'intérieur des cellules  $\beta$ . Finalement, l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium qui en résulte déclenche l'exocytose des vésicules d'insuline et donc la libération de l'hormone dans la circulation sanguine.

La libération d'acétylcholine par le SNA parasympathique, activant les récepteurs muscariniques de type 3 ( $M3$ ) présent sur les cellules  $\beta$ . L'activation de ce récepteur induit la production d'inositol tri-phosphate (IP3) suite à l'activation de phospholipases C (PLC), ce qui permet la mobilisation des stocks intracellulaires de calcium présents dans le réticulum endoplasmique (RE). La déplétion en calcium active alors le ( $C_{Ca^{2+}}$ ) permettant une entrée plus conséquente de calcium dans la cellule, aboutissant finalement à la stimulation de l'exocytose des vésicules d'insuline.

hormonaux et métaboliques, capables de moduler l'activité des neurones hypothalamiques et/ou le niveau d'expression de certains neuropeptides, dans le but d'induire une parfaite régulation de l'homéostasie énergétique (Coll and Yeo, 2013).

### a) Les hormones

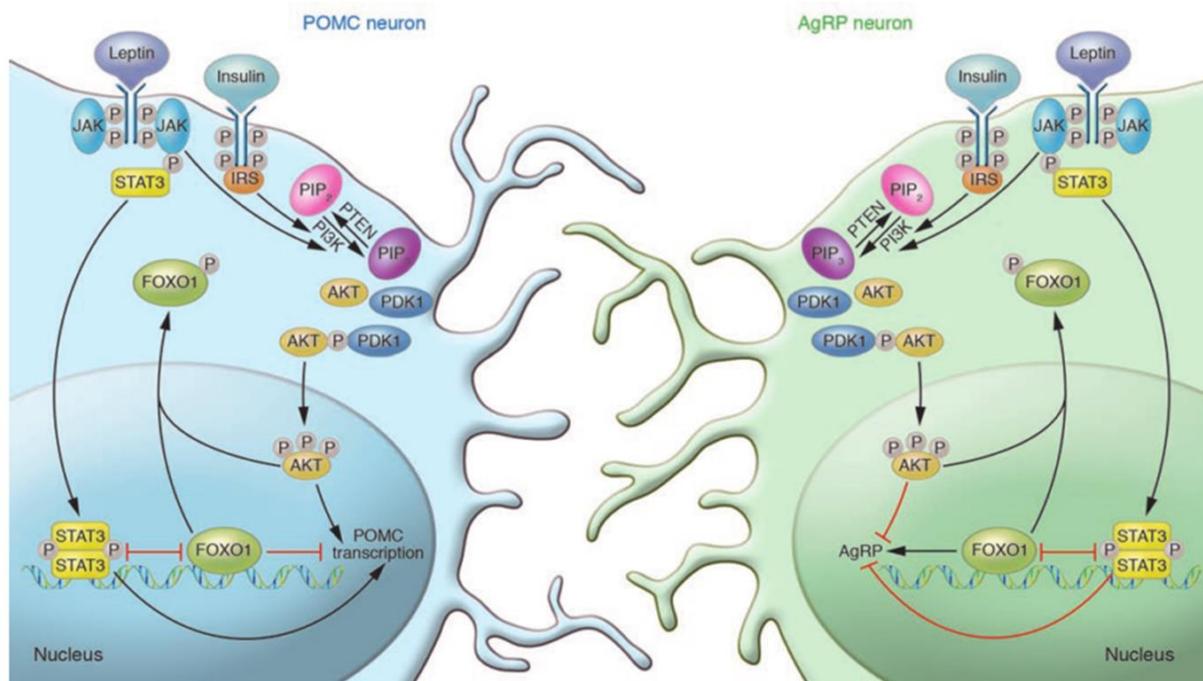
Il existe un grand nombre d'hormones susceptibles de contrôler les apports et/ou les dépenses énergétiques de l'organisme, en régulant notamment l'activité du système à mélanocortine (Kim *et al.*, 2014; Stanley *et al.*, 2005). Ici, nous nous intéresserons plus particulièrement au rôle de l'insuline et de la leptine, hormones anorexigènes, ainsi qu'à la ghréline, unique hormone stimulant la PA.

#### i) L'insuline

L'insuline est une hormone peptidique, la seule qui soit hypoglycémiante, dont la sécrétion augmente rapidement après un repas (Polonsky *et al.*, 1988). Elle est connue pour être sécrétée quasi exclusivement par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas, bien qu'une infime sécrétion ait été montrée dans le cerveau (Banks, 2004).

#### *La sécrétion d'insuline par le pancréas*

Il existe plusieurs mécanismes qui induisent la sécrétion d'insuline, dont le plus important est celle induite par le glucose lors d'une hyperglycémie (**Figure 11**). Le glucose entre alors dans les cellules  $\beta$  par l'intermédiaire du transporteur GLUT2 (chez le rongeur, GLUT1 chez l'Homme), la métabolisation du glucose, qui implique une hexokinase particulière dans la cellule  $\beta$ , la glucokinase (GK), va permettre l'augmentation du rapport ATP/ADP. En effet, cette hexokinase, non inhibée par son produit, permet une phosphorylation du glucose qui est proportionnelle à son entrée. L'ATP ainsi produit interagit alors avec des canaux potassiques ATP-dépendants ( $K_{ATP}$ ) entraînant leur fermeture et donc l'accumulation intracellulaire des ions potassium. L'augmentation du potentiel de membrane ( $\Delta\psi$ ) ainsi produit induit l'ouverture de canaux calciques voltages-dépendants, permettant une entrée massive de calcium à l'intérieur des cellules  $\beta$ . Finalement, l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium ( $[Ca^{2+}]_i$ ) qui en résulte déclenche l'exocytose des vésicules d'insuline et donc la libération de l'hormone dans la circulation sanguine (Henquin, 2000).



**Figure 12 : Voies de signalisation de l'insuline et la leptine dans les neurones POMC et AgRP**

L'insuline et la leptine augmentent l'expression de POMC (Pro-opiomélanocortine) et diminuent l'expression de AgRP (Agouti-gene related protein). L'insuline se lie à son récepteur dans les neurones POMC et les neurones AgRP, stimule l'activation de son substrat (IRS) et recrute la sous unité p85 de la PI3K (Phosphoinositide 3-kinase). L'activation de la PI3K catalyse la phosphorylation de PIP<sub>2</sub> (phosphatidylinositol bisphosphate) en PIP<sub>3</sub> (phosphatidylinositol triphosphate). La réaction inverse est catalysée par PTEN (Phosphatase and tensin homolog). AKT (ou Protéine kinase B) et PDK1 (phosphoinositide-dependent protein kinase 1) se lient à PIP<sub>3</sub> afin d'être activés. AKT phosphorylé entre dans le noyau où il phosphoryle à son tour FOXO1 (Forkhead-O transcription factor 1), l'inactivant et conduisant à son exclusion du noyau. FOXO1 exerce des effets différents sur les neurones POMC et les neurones AgRP. Dans les neurones POMC, il diminue la transcription de POMC en inhibant la séquence promotrice. Ainsi, l'insuline induit l'expression de POMC. Dans les neurones AgRP, FOXO1 augmente la transcription d'AgRP. Dans ce cas, l'insuline diminue la transcription d'AgRP en excluant FOXO1 du noyau après sa phosphorylation. La leptine se lie à son récepteur dans les neurones POMC et les neurones AgRP, aboutissant au recrutement de JAK (Janus kinase) qui phosphoryle le récepteur. STAT3 (Signal transducers and activators of transcription 3) va être phosphorylé à son tour puis transloqué au noyau où il active la transcription de POMC dans les neurones POMC et diminue la transcription d'AgRP dans les neurones AgRP. Il est aussi possible que la leptine induise l'activation de PI3K. Dans ce cas, l'insuline enlève l'inhibition sur la séquence promotrice et la leptine active la transcription de POMC. Inversement dans les neurones AgRP (Plum et al., 2006).

Un autre mécanisme permettant la sécrétion d'insuline est la modulation de l'activité du SNA (**Figure 11**). En effet, les cellules  $\beta$  sont innervées à la fois par des fibres sympathique et parasympathique, prenant origine dans les branches collatérales du nerf vague, sous le contrôle de l'hypothalamus. Ainsi, la sécrétion nerveuse de l'insuline implique le SNA parasympathique via la libération d'acétylcholine, activant les récepteurs muscariniques de type 3 présent sur les cellules  $\beta$ . L'activation de ce récepteur induit la production d'inositol tri-phosphate suite à l'activation de phospholipases C, ce qui permet la mobilisation des stocks intracellulaires de calcium présents dans le réticulum endoplasmique (RE). La déplétion en calcium active alors un canal calcique permettant une entrée plus conséquente de calcium dans la cellule, aboutissant finalement, comme dans le cas du glucose mais en moindre mesure, à la stimulation de l'exocytose des vésicules d'insuline (Gautam *et al.*, 2006; Gilon and Henquin, 2001).

### *Le rôle de l'insuline*

Le rôle de l'insuline est médié via la liaison à son récepteur (IR), possédant une activité à tyrosine kinase. Ainsi, IR est présent sur les tissus cibles en périphérie, mais aussi dans le cerveau et de façon très importante dans les noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la PA (MBH, DMH, PVN) (Havrankova *et al.*, 1978; Marks *et al.*, 1990). La liaison de l'insuline à son récepteur induit rapidement l'activation de son substrat (IRS), qui va à son tour activer la cascade de signalisation médiée par l'activation de PI3K/AKT (phosphoinositide 3-kinase et protéine kinase B), afin de réguler l'expression des gènes POMC ou NPY/AgRP (**Figure 12**) (White, 2003).

Au niveau périphérique, l'insuline exerce son rôle anabolique en favorisant l'utilisation et le stockage des nutriments dans le foie, le tissu adipeux et le muscle (González-Sánchez and Serrano-Ríos, 2007).

L'insuline possède un rôle important dans la régulation centrale du métabolisme. En effet, elle est capable de traverser la BHE de façon proportionnelle à son niveau circulant, via une transcytose du récepteur, du côté luminal à la face abluminale des cellules endothéliales de la BHE, permettant ainsi son passage du plasma vers le LCR (Schwartz *et al.*, 1992; Woods and Porte, 1977). Au niveau du SNC, l'insuline possède un rôle anorexigène, médié par le système à mélanocortine (**Figure 12**). En effet, IR est présent sur les neurones POMC et NPY, et l'action anorexigène de l'insuline est bloquée par des antagonistes du système à mélanocortine (Benoit *et al.*, 2002; Plum *et al.*, 2006).



Ainsi, l'injection ICV d'insuline chez le rongeur entraîne une diminution de la PA et du poids corporel, une augmentation de l'expression des ARNm de POMC, et prévient l'augmentation de l'expression des ARNm de NPY lors du jeûne dans le MBH et le PVN (Brown *et al.*, 2006; McGowan *et al.*, 1992; Schwartz *et al.*, 1992). La délétion spécifique de IR dans les neurones induit une petite augmentation de la masse grasse (Bruning, 2000) et la délétion spécifique de IR dans les noyaux hypothalamique adjacents au 3V induit une hyperphagie (Obici *et al.*, 2002a). De plus, les souris déficientes en IR dans l'hypothalamus présentent une hyper-insulinémie, une augmentation de la production hépatique de glucose et une diminution des dépenses énergétique. La restauration de IR dans les neurones AgRP seulement permet la régulation normale de la production hépatique de glucose, et la restauration de IR dans les neurones POMC seulement augmente les dépenses énergétiques (Lin *et al.*, 2010).

### *La résistance à l'insuline*

Le développement de l'obésité et du DT2 est associé à une diminution de la sensibilité à l'insuline des tissus cibles, dont l'hypothalamus (Benoit *et al.*, 2004; Björntorp, 1997). Ainsi, les rongeurs soumis à un régime hypercalorique développent, de façon précoce, une résistance centrale à l'insuline, caractérisée par une altération de son effet anorexigène, ainsi que sa capacité à activer la voie PI3K/AKT ou à réguler l'expression des gènes POMC, suite à une injection centrale ou périphérique d'insuline (Clegg *et al.*, 2011; Gaur *et al.*, 2014; de Leeuw van Weenen *et al.*, 2009; Posey *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2001). Or, nous avons vu dans le paragraphe précédent qu'une diminution des effets centraux de l'insuline conduit à une hyperphagie et une obésité, créant ainsi un cercle vicieux qui débouche sur une hyper-insulinémie et une hyperglycémie, une aggravation de l'obésité, une altération de la cellule  $\beta$  pancréatique et finalement l'installation d'un syndrome métabolique grave pouvant conduire à la mort de l'individu (Gallagher *et al.*, 2009; Pagotto, 2009).

Chez l'homme, outre les recommandations de rééquilibrage de la balance énergétique (augmentation de l'exercice physique et diminution des apports caloriques), l'injection quotidienne d'insuline associée à un suivi de la glycémie est le seul traitement permettant la survie des patients souffrants de DT2 avancé. Cependant, l'insulinothérapie possède des effets secondaires délétères pour l'organisme, comme l'induction d'hypoglycémies aiguës avec risques de comas, d'hypoglycémies récurrentes, ou l'accroissement des dépôts lipidiques ectopiques due à l'action lipogénique de



l'insuline, aggravant la résistance périphérique de l'insuline (Perry *et al.*, 2014; Sorli and Heile, 2014; Yun and Ko, 2015). En conséquence, une autre hormone attire l'attention des études scientifiques : la leptine (Fujikawa *et al.*, 2013).

## ii) La leptine

La leptine est une hormone peptidique anorexigène, produite et sécrétée par les adipocytes du tissu adipeux blanc, de façon directement proportionnelle à la quantité de masse grasse de l'organisme (Frederich *et al.*, 1995).

### *Le rôle de la leptine*

L'action de la leptine est médiée par sa liaison au récepteur LepR, présent dans de nombreux tissus périphériques tels que les muscles, le foie, le pancréas mais aussi au niveau central dans les noyaux hypothalamiques (Tartaglia *et al.*, 1995). Il existe plusieurs voies de signalisations induites par l'activation de LepR (**Figure 13**). La principale est la voie JAK/STAT (Janus kinase, en particulier JAK2, et Signal Transducers and Activators of Transcription, notamment STAT3 et STAT5). De façon intéressante, la leptine empreinte aussi une voie commune avec la signalisation induite par l'insuline, via l'activation de la voie PI3K/AKT (Porte *et al.*, 2002). Enfin, la leptine active aussi, de façon moindre, la voie des MAPK (Mitogen-activated protein kinases). L'ensemble de ces voies de signalisation, par un jeu de phosphorylations, participent à la régulation génique de la cellule (Mccowen *et al.*, 1998).

La leptine est une hormone clé dans la régulation du métabolisme énergétique. En effet, au niveau périphérique, un des rôles principaux de la leptine est d'inhiber la sécrétion d'insuline, en induisant l'ouverture des canaux  $K_{ATP}$  de la cellule  $\beta$ , dans le but de limiter le développement du tissu adipeux induit par l'action lipogénique de l'insuline (Benoit *et al.*, 2013; Kieffer and Habener, 2000). Cependant, le rôle de la leptine est principalement présent au niveau central (**Figure 12**). Au niveau hypothalamique, elle régule notamment l'activité du système à mélanocortine (Schwartz *et al.*, 1996). Son rôle est ainsi d'inhiber les neurones NPY et activer les neurones POMC, induisant une diminution de la PA et une augmentation des dépenses énergétiques et du métabolisme du glucose (Cowley *et al.*, 2001; Morton, 2007; Satoh *et al.*, 1997; Varela and Horvath, 2012). De plus, les modèles génétiques qui possèdent une mutation du gène *ob* (gène de la leptine) ou du gène *db* (gène du récepteur à la leptine) présentent un phénotype



obèse associé à une augmentation de la PA et une diminution des dépenses énergétiques.

### **La résistance à la leptine**

Lorsque les apports énergétiques sont supérieurs aux dépenses énergétiques sur une longue période, cela conduit à une augmentation du stockage des glucides et des lipides conduisant notamment au développement du tissu adipeux. Ainsi, en cas d'obésité, on observe une augmentation du taux circulant de leptine. Cependant, l'effet anorexigène de la leptine diminue avec le développement de l'obésité, suggérant l'existence d'une résistance à la leptine (Könner and Brüning, 2012).

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer une résistance à la leptine (Münzberg and Myers, 2005). Tout d'abord, la leptine peut ne plus être capable d'atteindre sa cible au niveau cérébral. En effet, une étude montre que chez les individus obèses, le ratio entre la quantité de leptine dans le LCR par rapport à celle dans le sang diminue (Caro *et al.*, 1996). Dans ce cas, l'injection périphérique de leptine exogène a des effets limités sur la perte de poids alors qu'une injection centrale reverse le phénomène de résistance. Le deuxième mécanisme implique une résistance cellulaire à la leptine. Dans ce cas, la résistance à la leptine sera caractérisée, même en présence d'une injection centrale, par la diminution des taux phosphorylés des facteurs impliqués dans les voies de signalisation, notamment STAT3 qui est le plus couramment mesuré (El-Haschimi *et al.*, 2000).

### **iii) La ghréline**

La ghréline est une hormone orexigène d'origine gastrique sécrétée lorsque l'estomac est vide. Son effet est médié via la liaison à son récepteur (growth hormone secretagogue receptor ou GHSR) après avoir été acylée par une acyltransferase, rendant la ghréline active. Le site d'action majeur de la ghréline est l'hypothalamus et plus particulièrement les neurones NPY/AgRP (Kim *et al.*, 2014; Nakazato *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002; Willeesen *et al.*, 1999). La ghréline induit une augmentation des taux d'expression des ARNm de NPY et AgRP ainsi que de leur activité électrique (Cowley *et al.*, 2003; Kamegai *et al.*, 2001). Même si GHSR est peu détecté dans les neurones POMC, la ghréline induit une inhibition de l'activité électrique des neurones POMC, certainement médiée par les neurones NPY/AgRP puisque l'ablation des neurones



NPY/AgRP abolit cet effet de la ghréline (Chen *et al.*, 2004). De plus, les souris déficientes en ghréline ou en GHSR présentent une résistance à une obésité induite par un régime HFD (Wortley *et al.*, 2005; Zigman *et al.*, 2005).

## **b) Les nutriments**

Les nutriments, issus de l'alimentation, sont essentiels dans le maintien de l'intégrité de l'organisme. Ils possèdent en effet un rôle primordial dans le maintien des structures cellulaires ainsi que dans l'apport d'énergie, indispensable au fonctionnement de l'organisme. Cependant, les nutriments ont aussi un rôle majeur dans la régulation centrale de l'homéostasie énergétique. Leur concentration étant un reflet immédiat du statut énergétique de l'organisme, ils ont donc également une fonction « informative » pour le cerveau (Davis *et al.*, 1981). Les macronutriments sont classés en trois groupes : les protéines, les acides gras et les glucides.

### **i) Les protéines**

Les protéines, constituées d'acides aminés, possèdent avant tout un rôle fonctionnel et ne deviennent une source énergétique (via la néoglucogenèse hépatique et parfois via la protéolyse) que lorsque les autres nutriments sont indisponibles. Un régime alimentaire riche en protéines est satiétogène (Mellinkoff *et al.*, 1997; Soenen and Westerterp-Plantenga, 2008), et l'injection ICV de leucine entraîne une inhibition de la PA et de la production hépatique de glucose (Cota *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2012), ce qui montre que la détection centrale de certains acides aminés joue un rôle dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Schwartz, 2013). Leur effet satiétogène implique l'activation de la voie mTOR (mammalian Target of Rapamycin) dans l'hypothalamus, accompagné par une diminution de l'expression des ARNm de NPY dans le NA et une activation des neurones POMC (Blouet *et al.*, 2009; Cota *et al.*, 2006). Le ratio AMP/ATP semble être crucial pour l'activation de la voie mTOR (Dennis *et al.*, 2001). Lorsque le ratio AMP/ATP augmente, l'activité de la kinase mTOR augmente, entraînant la phosphorylation de ces cibles, activant la S6-kinase-1 et inhibant le facteur 4E-binding protein (Hay and Sonenberg, 2004; Wullschleger *et al.*, 2006). Plus récemment, quelques études montrent un lien étroit entre la disponibilité en leucine et la signalisation de la leptine (Yuan *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2014).



## ii) Les acides gras

Dans l'organisme, les lipides sont les principaux composants des membranes cellulaires. L'apport d'acides gras via l'alimentation permet ainsi le renouvellement de ces composés, dont le rôle structural est indispensable à l'intégrité et au fonctionnement des organes. Les AGL sont issus de la dégradation des triglycérides. Ils vont être responsables de la formation d'ATP et tiennent aussi le rôle de molécules de signalisation.

En périphérie, les AGL sont capables d'influencer la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas (Girard, 2003). En effet, après un repas, l'augmentation transitoire du taux d'AGL circulant potentialise la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Ce mécanisme implique l'augmentation de la concentration intracellulaire d'acyl-CoA issu de la dégradation normale des AGL, capable de stimuler l'exocytose d'insuline. En revanche, une élévation chronique du taux circulant d'AGL, par exemple dans le cas d'une obésité, induit un effet lipotoxique sur le pancréas aboutissant à l'inhibition de la sécrétion d'insuline (Girard, 2003). Ce mécanisme impliquerait l'inhibition de la fermeture des canaux  $K_{ATP}$  par l'acyl-CoA, la diminution de l'expression des protéines GLUT2 ou GK, ou encore l'effet découplant des AGL sur la mitochondrie aboutissant à une diminution de la synthèse d'ATP.

Cependant, l'effet des AGL sur les tissus périphériques, tels que le pancréas et le foie, sont principalement dus à une modification de l'activité du SNA, notamment une diminution du tonus sympathique via l'hypothalamus (Clément *et al.*, 2002; Cruciani-Guglielmacci *et al.*, 2005). L'existence de neurones hypothalamiques sensibles aux AGL a été démontrée par de multiples expériences, grâce à l'utilisation du marqueur d'activation cellulaire c-Fos, d'enregistrements électriques *in vivo* après injection intracarotidienne d'acide oléique et par électrophysiologie (Chang *et al.*, 2004; Cruciani-Guglielmacci *et al.*, 2004; Oomura *et al.*, 1975; Wang *et al.*, 2006). De plus, l'augmentation de la concentration des AGL dans le 3V induit une inhibition de la PA et de la production hépatique de glucose démontrant que les AGL sont capables d'informer le SNC de la disponibilité des nutriments (Obici *et al.*, 2002b). L'hypophagie induite par une augmentation hypothalamique des AGL est associée à une diminution de l'expression de NPY et une augmentation de l'expression de POMC (Jo *et al.*, 2009; Morgan *et al.*, 2004; Schwinkendorf *et al.*, 2011). Cependant, ces réponses sont



dépendantes de l'état nutritionnel de l'organisme. En effet, l'injection centrale d'acide oléique n'induit pas les effets mentionnés précédemment si l'animal a été soumis à un régime hypercalorique (Morgan *et al.*, 2004). De plus, l'augmentation chronique de la concentration intracérébrale d'AGL induit une diminution de la sensibilité hépatique à l'insuline via une augmentation de la production de NO (monoxyde d'azote) dans l'hypothalamus, et est finalement responsable d'une augmentation de la production hépatique de glucose (Marsollier *et al.*, 2009). L'ensemble de ces études montrent l'importance de la détection centrale des AGL dans le maintien de l'homéostasie énergétique.

### **iii) Les glucides**

Le glucose, issu de la métabolisation des glucides, représente une source d'énergie majeure pour l'organisme. Au niveau cérébral, en plus d'être le seul substrat énergétique indispensable, le glucose joue aussi le rôle de molécule informative. Le cas du glucose étant d'un intérêt tout particulier dans notre équipe, et surtout pour mes travaux de thèse, il sera plus spécifiquement abordé dans le chapitre suivant.



# Chapitre II : La détection hypothalamique du glucose

---

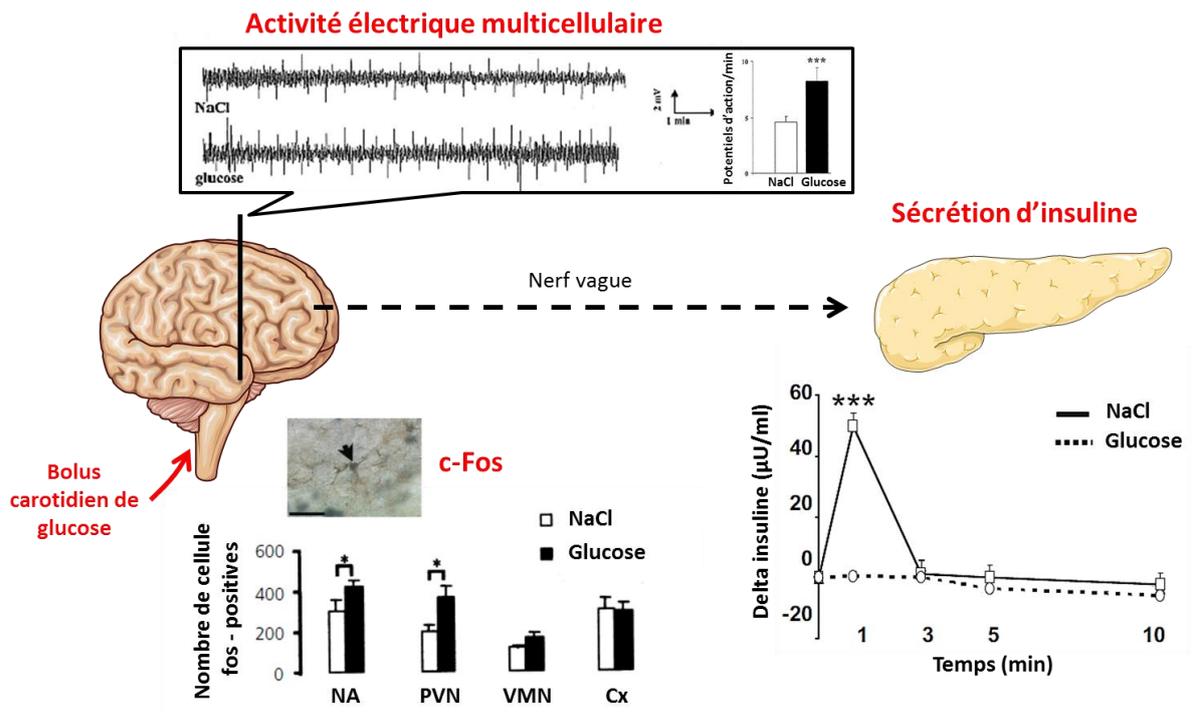
Nous venons de voir que l'hypothalamus possède un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie énergétique du corps entier, en particulier via son rôle dans la détection des signaux circulants et l'initiation de réponses physiologiques adaptées. La glycémie est le reflet direct de l'état énergétique du corps entier. Elle présente de nombreuses variations sur des temps courts (légère diminution avant l'initiation d'un repas, hyperglycémie après le repas). Le maintien strict de la glycémie autour d'une valeur physiologique de référence de 5 mM (soit 1 g/l) implique de nombreux mécanismes centraux et périphériques.

## 1) Effets physiologiques du glucose

### a) Cas de l'hypoglycémie

Lors d'une hypoglycémie, l'organisme doit réagir rapidement afin d'éviter la mort : c'est le phénomène de contre-régulation. Le taux de ghréline plasmatique augmente afin de stimuler la PA. En parallèle, les niveaux circulants de cortisol, de catécholamines, mais surtout de glucagon augmentent afin de permettre la mobilisation des stocks glucidiques, en stimulant le catabolisme de l'organisme : la glycogénolyse hépatique, la lipolyse et la néoglucogenèse vont permettre d'augmenter le taux de glucose circulant, indépendamment des apports alimentaires, pour finalement obtenir le retour à la normale de la glycémie (Amiel, 1991; Marty *et al.*, 2007).

Ces réponses périphériques de contre-régulation sont, au niveau central, principalement sous la dépendance du VMN, structure hypothalamique importante dans le contrôle du SNA sympathique (Borg *et al.*, 1997, 1994). En effet, au niveau du MBH, une hypoglycémie provoquée par exemple par une injection de 2 désoxyglucose (2-DG) (analogue non métabolisable du glucose responsable d'une glucopénie cellulaire) induit une augmentation de l'activation des neurones NPY/AgRP, associée à la stimulation de la PA. Cet effet disparaît chez des souris invalidées pour le NPY (Fioramonti *et al.*, 2011; Sanders and Ritter, 2000; Sindelar *et al.*, 2004; Tsujii and Bray, 1990).



**Figure 13 : Schéma représentant la régulation nerveuse de la sécrétion d'insuline par l'axe hypothalamo-pancréatique lors d'une hyperglycémie cérébrale.**

L'injection carotidienne de glucose induit une augmentation de l'activité électrique du noyau arqué, associée à l'augmentation du nombre de cellules c-Fos positives et conduit à une activation vagale qui déclenche une sécrétion d'insuline.

Cx : Cortex ; NA : Noyau arqué ; PVN : Noyau péri-ventriculaire ; VMN: Noyau ventro-médian (d'après Colombani et al., 2009; Guillod-maximin et al., 2004; Leloup et al., 2006).

## b) Cas de l'hyperglycémie

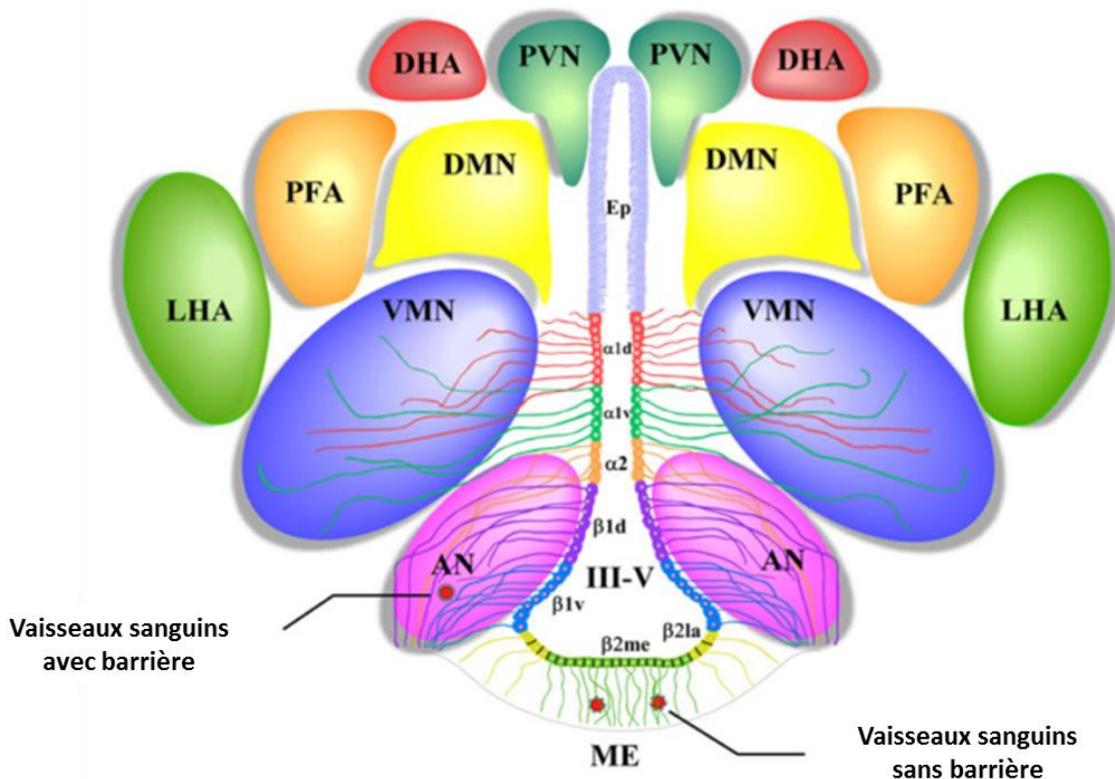
Lors d'une hyperglycémie, l'insuline est sécrétée dans le but de diminuer la concentration sanguine de glucose : elle va stimuler son entrée dans les différents organes insulino-sensibles afin de permettre son utilisation ou son stockage et donc de restaurer le niveau normal de la glycémie. Les voies anaboliques sont stimulées : glycolyse dans les tissus utilisateurs, glycogénogenèse dans le foie et les muscles pour un stockage facilement mobilisable, et lipogenèse dans le tissu adipeux pour un stockage à plus long terme.

Une hyperglycémie cérébrale entraîne une inhibition de la PA, une stimulation de la sécrétion d'insuline et une diminution de la production hépatique de glucose, mettant en jeu une augmentation de l'activité du système nerveux parasympathique et une diminution du système nerveux sympathique sur ces effecteurs (Alquier *et al.*, 2003; Atef *et al.*, 1995; Fujimoto *et al.*, 1985; Lam *et al.*, 2005; Leloup *et al.*, 2006; McGowan *et al.*, 1992). De plus, l'injection de glucose par la carotide, à une dose provoquant une hyperglycémie uniquement cérébrale sans modification de la glycémie périphérique, induit une activation du proto-oncogène c-Fos dans le NA et le PVN (Guillod-maximin *et al.*, 2004), ainsi qu'une augmentation de l'activité électrique multicellulaire au niveau du NA. Cette activation électrique conduit à une activation vagale qui déclenche une sécrétion d'insuline (**Figure 13**) (Atef *et al.*, 1995; Leloup *et al.*, 2006).

## 2) Populations cellulaires impliquées dans la détection hypothalamique du glucose

Le cerveau est l'organe le plus consommateur de glucose pour son propre fonctionnement. Ce glucose circulant est aussi une molécule informative dans certaines structures cérébrales dans le but d'assurer un contrôle sur le fonctionnement des organes périphériques impliqués dans l'homéostasie énergétique, via le SNA. Depuis plus d'une cinquantaine d'années, le rôle de l'hypothalamus dans la régulation centrale de l'homéostasie glucidique a été largement démontré (Anand *et al.*, 1964; Mayer, 1953; Oomura *et al.*, 1969; Pénicaud *et al.*, 2002).

Parmi les structures cérébrales impliquées, l'hypothalamus possède la capacité de détecter à la fois les hypoglycémies et les hyperglycémies, afin de déclencher les réponses physiologiques adaptées pour un retour normal de la glycémie. La présence de



**Figure 14 : Représentation schématique de la distribution des tanocytes tapissant la paroi du 3<sup>e</sup> ventricule sur une vue coronale de l'hypothalamus**

Les ependymocytes (*Ep*) ciliés tapissent la paroi dorsale du 3<sup>e</sup> ventricule (III-V). Les tanocytes  $\alpha 1$  possèdent de longues projections qui vont au contact des neurones du noyau ventro-médian (VMN). Les tanocytes  $\alpha 2$  projettent sur le noyau arqué (AN) et les vaisseaux sanguins. Dans la partie ventrale du 3<sup>e</sup> ventricule, les tanocytes  $\beta 1$  projettent sur le noyau arqué et vont au contact des neurones orexigènes et anorexigènes ainsi que les vaisseaux sanguins. Sur le planché du 3<sup>e</sup> ventricule, les tanocytes  $\beta 2$  sont reliés par des jonctions serrées, faisant ainsi partie de la barrière entre l'éminence médiane (ME) et le liquide céphalo-rachidien. Leurs projections vont au contact des vaisseaux sanguins fenestrés de l'éminence médiane.

DHA : Aire dorsale de l'hypothalamus ; DMN : Noyau dorso-médian ; LHA : Aire latérale de l'hypothalamus ; PFA : Aire péri-fornicale ; PVN : Noyau péri-ventriculaire (d'après Elizondo-Vega et al., 2015).

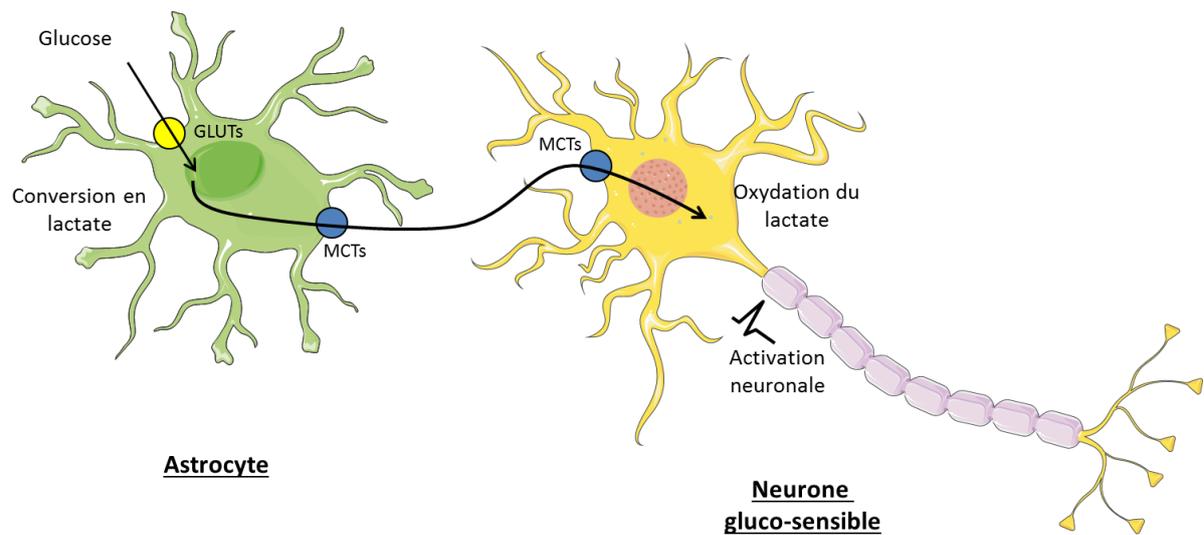
la BHE est responsable d'une concentration en glucose dans le parenchyme cérébral inférieure à la glycémie (McNay and Gold, 1999; Netchiporouk *et al.*, 1996). A la fin des années 90, une étude chez des rats anesthésiés montre qu'une glycémie basale entre 5 et 8 mM correspond à une concentration cérébrale entre 1 et 2,5 mM, une hypoglycémie (2 à 3 mM) correspond à une concentration cérébrale autour de 0,5 mM, et une hyperglycémie (15 à 17 mM) correspond à une concentration cérébrale autour de 4,5 mM. Bien que ces mesures aient été effectuées dans le LH (Silver and Erecińska, 1998), des mesures dans le MBH ont récemment donné des résultats similaires (Mayer *et al.*, 2006).

La capacité de l'hypothalamus à détecter ces variations de la concentration extracellulaire de glucose repose sur l'existence de plusieurs populations cellulaires sensibles à ces variations. En effet, il est connu depuis longtemps que les neurones du MBH modulent leur activité électrique en réponse au glucose (Anand *et al.*, 1964). Cependant, il apparaît ces dernières années que d'autres populations cellulaires sont impliquées dans la détection hypothalamique du glucose, telles que les cellules gliales et notamment les tanocytes et les astrocytes. Il paraît donc important de savoir que ces populations existent, puisque les études orientent généralement leurs résultats vers la participation des neurones uniquement, en négligeant l'implication des cellules gliales.

### a) Les tanocytes

Les tanocytes sont des cellules ependymaires particulières qui tapissent la partie ventrale de la paroi du 3V (mais aussi du 4V). Ils sont divisés en quatre groupes ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ) selon leur localisation et leurs propriétés (**Figure 14**) (Mullier *et al.*, 2010).

Outre leur rôle de barrière dans la BHE, de récentes études montrent que les tanocytes participent aussi au contrôle de la balance énergétique (Bolborea and Dale, 2013; Langlet *et al.*, 2013). Ils sont au contact du LCR et possèdent des projections sur les vaisseaux sanguins présents dans le NA et l'EM, leur permettant de détecter les variations de la concentration de glucose dans le sang et le LCR. Les tanocytes projettent vers le MBH, où sont localisés les neurones du système à mélanocortine, leur donnant ainsi un rôle d'interface entre l'hypothalamus et la périphérie (Langlet, 2014). De plus, les tanocytes possèdent les éléments moléculaires nécessaires à la détection des variations de la concentration extracellulaire de glucose (notamment les transporteurs de glucose GLUTs, la glucokinase et le canal  $K_{ATP}$ , qui seront décrit plus tard dans ce



**Figure 15 : Représentation schématique du couplage astrocytes-neurones**

*Le glucose entre dans les astrocytes via leur transporteur (GLUTs) où il est ensuite converti en lactate. Le lactate est exporté vers les neurones via les MCTs (Transporteurs de monocarboxylates), capables de l'utiliser comme substrat énergétique. Ces transferts de substrats énergétiques, montrent l'existence d'un couplage astrocytes-neurones et sont d'une importance capitale pour le bon fonctionnement des neurones.*

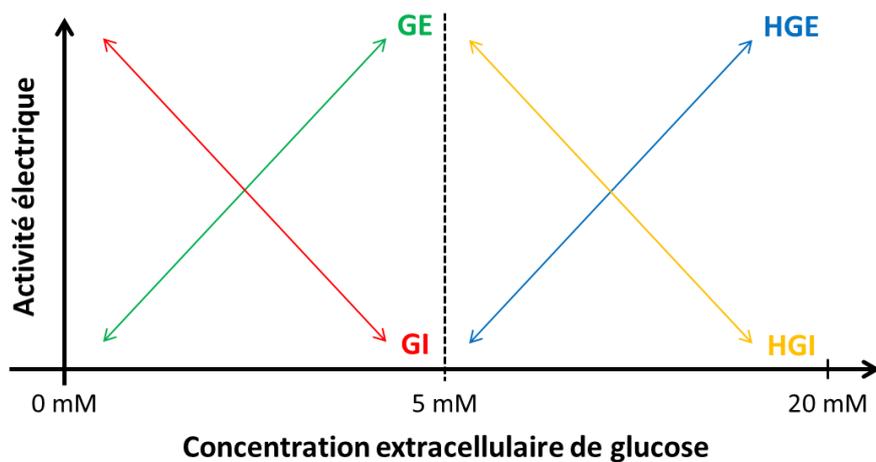
chapitre) (Elizondo-Vega *et al.*, 2015; Frayling *et al.*, 2011; García *et al.*, 2003; Millán *et al.*, 2010).

## b) Les astrocytes

Les astrocytes sont des cellules gliales organisées en réseau à l'interface entre le réseau capillaire et les neurones. Ceux à proximité des capillaires sanguins possèdent des « pieds astrocytaires » qui constituent une barrière entre les capillaires et le tissu nerveux. Longtemps considérés comme de simples cellules de soutien, les astrocytes possèdent des connexines qui forment des héli-canaux s'apposant entre deux astrocytes voisins pour former des jonctions gap : cette organisation permet l'échange de petites molécules telles que le glucose. Ainsi, la position stratégique du réseau astrocytaire, à l'interface des vaisseaux sanguins et des neurones, comme vu pour les tanycytes, suggère un rôle métabolique important notamment dans le maintien de l'homéostasie énergétique (Leloup *et al.*, 2015).

Un des rôles cruciaux des astrocytes est l'apport d'énergie aux neurones, principalement sous la forme de lactate. En effet, les astrocytes sont capables de métaboliser le glucose, de le stocker sous forme de glycogène, ou de l'exporter vers les neurones sous forme de lactate via les MCTs (Transporteurs de monocarboxylates). Ces transferts de substrats énergétiques, montrant l'existence d'un couplage astrocytes-neurones, sont d'une importance capitale pour le bon fonctionnement des neurones (**Figure 15**) (Bélangier *et al.*, 2011; Dinuzzo *et al.*, 2012; Pellerin and Magistretti, 2012).

Dernièrement, quelques études montrent que les astrocytes jouent un rôle dans la détection hypothalamique du glucose. En effet, l'injection de glucose dans la carotide induit l'activation des astrocytes, démontrée par la co-localisation du facteur de transcription c-Fos avec un marqueur astrocytaire dans le NA, là où la majorité des neurones gluco-sensibles ont été identifiés (Guillod-maximin *et al.*, 2004). De la même façon que le glucose, une injection intracérébrale de lactate induit une inhibition de la production hépatique de glucose (Lam *et al.*, 2005) et l'inhibition de la lactate déshydrogénase bloque l'effet d'une injection intracérébrale de glucose, montrant l'importance du métabolisme du lactate dans la régulation de l'homéostasie glucidique (Kokorovic *et al.*, 2009). Des rats rendus hyper-glycémiques et/ou diabétiques présentent une diminution de la communication astrocytaire par les connexines (Gandhi *et al.*, 2010) et une altération de la détection hypothalamique du glucose, mais aussi du



**Figure 16 : Représentation schématique de l'activité électrique des quatre populations de neurones gluco-sensibles du NA lors de la variation de la concentration extracellulaire de glucose**

*Les neurones gluco-excités ont une activité électrique proportionnelle à la concentration de glucose, entre 0 et 5 mM de glucose pour les neurones GE (en vert), et entre 5 et 20 mM de glucose pour les neurones HGE (en bleu).*

*Les neurones gluco-inhibés ont une activité électrique inversement proportionnelle à la concentration de glucose, entre 0 et 5 mM de glucose pour les neurones GI (en rouge), et entre 5 et 20 mM de glucose pour les neurones HGI (en jaune).*

lactate (Allard *et al.*, 2013). De plus, notre équipe a récemment montré que la délétion des connexines astrocytaires altère la détection hypothalamique du glucose, (Allard *et al.*, 2014).

L'ensemble de ces études montrent que le réseau astrocytaire possède un rôle important dans la régulation de l'homéostasie énergétique et plus particulièrement, en amont de la détection neuronale du glucose (Leloup *et al.*, 2015).

### c) Les neurones

Dans les années 60, des chercheurs ont établi l'existence de neurones sensibles au glucose dans l'hypothalamus (Anand *et al.*, 1964; Oomura *et al.*, 1969). Ces neurones, capables de moduler leur activité électrique en fonction des variations des concentrations extracellulaires de glucose, ont la particularité d'utiliser le glucose à la fois comme un substrat énergétique mais aussi comme un « signal » pour déclencher la régulation nerveuse de l'homéostasie énergétique (Gao and Horvath, 2008). Ainsi, quatre populations neuronales dites « gluco-sensibles » ont été caractérisées dans le NA de souris, grâce à la technique de patch clamp qui consiste à enregistrer directement l'activité électrique d'une seule cellule (Fioramonti *et al.*, 2004). Ces quatre populations sont classées en fonction de leurs caractéristiques de réponse lors d'une augmentation ou d'une diminution de la concentration extracellulaire de glucose *in vitro* (**Figure 16**) :

- Les neurones gluco-excités, dont l'activité électrique est proportionnelle à la concentration de glucose, entre 0 et 5 mM de glucose pour les neurones GE, et entre 5 et 20 mM de glucose pour les neurones HGE.
- Les neurones gluco-inhibés, dont l'activité électrique est inversement proportionnelle à la concentration de glucose, entre 0 et 5 mM de glucose pour les neurones GI, et entre 5 et 20 mM de glucose pour les neurones HGI.

Les neurones gluco-sensibles sont principalement présents dans les noyaux hypothalamiques (VMN, NA, DMN, PVN, LH) mais aussi dans certains noyaux du tronc cérébral (Song *et al.*, 2001; Yettefti *et al.*, 1997). Les neurones GE sont principalement présents dans le VMN où ils représentent environ 20 % de la population neuronale totale. Dans le DMN et le LH, ce sont les neurones GI qui sont majoritairement présents (30% de la population totale). Dans le NA, 20% des neurones étudiés sont GE, 20% HGE et 7% HGI. Par ailleurs, il existe une régionalisation de ces types neuronaux, avec une



majorité de GE dans le NA latéral et une majorité de GI dans le NA médian chez la souris (Fioramonti *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004).

Cependant, outre leur signature électrophysiologique en réponse aux modifications de la concentration de glucose, les neurones gluco-sensibles ne possèdent pour l'instant pas de marqueur moléculaire spécifique, rendant leur étude difficile. L'utilisation de souris exprimant la GFP (Green Fluorescent Protein) a tout de même permis d'identifier en partie leur phénotype en termes de neurotransmetteurs/neuropeptides. Dans le NA, seulement un tiers des neurones NPY étudiés apparaissent sensibles au glucose, mais tous sont de type GI (neurones excités par une diminution de la concentration de glucose de 5 à 0 mM), ce qui est cohérent avec le fait que l'hypoglycémie stimule la PA et l'expression de NPY (Fioramonti *et al.*, 2007; Mountjoy *et al.*, 2007; Muroya *et al.*, 1999). La moitié des neurones POMC sont de type GE, leur réponse mettrait en jeu le canal  $K_{ATP}$  et une libération dose-dépendants d' $\alpha$ -MSH en fonction de la concentration de glucose (Parton *et al.*, 2007), mais ce résultat reste controversé. Les neurones gluco-sensibles du VMN n'ont pas de phénotype neuropeptidique identifié mais sont impliqués dans les réponses à l'hypoglycémie (Fioramonti *et al.*, 2010; Routh, 2010; Song *et al.*, 2001). En revanche, les neurones SF1 du VMN sont de type GI et participent à la mise en place des réponses de contre-régulation (Tong *et al.*, 2007). Au niveau du LH, des études ont permis de montrer que les neurones à orexines étaient GI, alors que les neurones MCH seraient majoritairement GE (Karnani and Burdakov, 2011; Thorens, 2012).

### **3) Acteurs moléculaires impliqués dans la détection hypothalamique du glucose**

Parallèlement à la détermination du phénotype des neurones sensibles au glucose, depuis quelques années, de nombreuses équipes s'intéressent aux mécanismes moléculaires impliqués dans la détection neuronale du glucose. Une analogie avec la détection du glucose par la cellule  $\beta$  a pu être établie pour les neurones GE (Fridlyand and Philipson, 2010; Schuit *et al.*, 2001) puisqu'ils possèderaient des éléments moléculaires similaires tels que les transporteurs de glucose GLUTs, la glucokinase et les canaux  $K_{ATP}$ . En revanche, les mécanismes concernant les neurones GI sont moins étudiés (Routh, 2010).

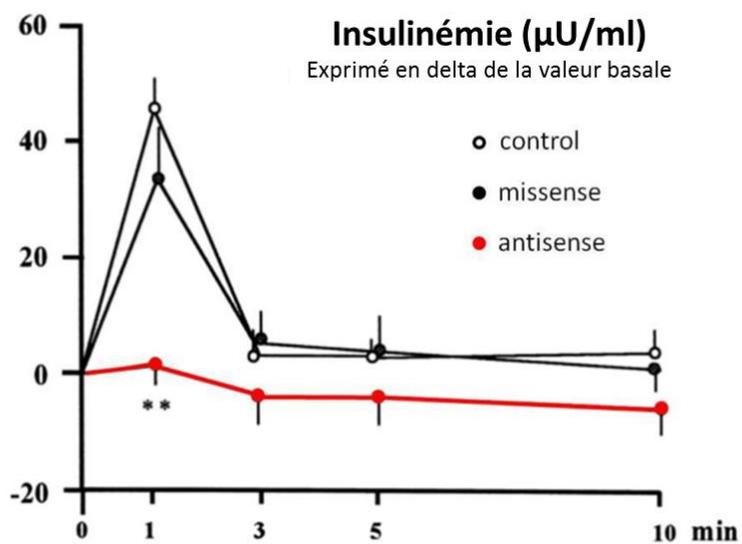


## a) Le transport du glucose : implication des GLUTs

L'entrée du glucose dans les cellules s'effectue à l'aide de transporteurs spécifiques, les GLUTs, qui assurent un transport facilité du glucose, ainsi que ses analogues non métabolisables (comme le 2-DG) mais aussi le fructose, selon un gradient de concentration. Plusieurs isoformes existent dans l'organisme, chacun possédant une distribution tissulaire et une affinité pour le glucose différente (Medina and Owen, 2002).

GLUT4, présent dans les tissus sensibles à l'insuline (où il est adressé à la membrane plasmique en présence d'insuline), est exprimé au niveau du cortex, de l'hippocampe, du cervelet et moins abondamment au niveau de l'hypothalamus. GLUT5 est présent dans la microglie et les cellules endothéliales de la BHE et assure le transport du fructose. GLUT1, présent dans les cellules endothéliales et gliales, et GLUT3 présent dans les neurones, possèdent une forte affinité pour le glucose ( $K_m$  autour du  $\mu M$ ) permettant un approvisionnement relativement constant en glucose aux neurones en conditions physiologiques. Cependant, ces deux isoformes sont très rapidement saturées suggérant qu'elles ne peuvent pas être impliquées dans la détection d'une augmentation de la concentration extracellulaire de glucose. (Benomar *et al.*, 2006; Leloup *et al.*, 1996; El Messari *et al.*, 2002).

GLUT2 est l'isoforme impliquée dans la détection du glucose par la cellule  $\beta$  du pancréas chez les rongeurs. Il se distingue des autres isoformes par sa faible affinité pour cet hexose ( $K_m=10$  à  $15$  mM), lui permettant ainsi de le transporter proportionnellement à sa concentration circulante. Il est non saturable en condition physiologique et est donc capable de détecter les variations de la concentration extracellulaire de glucose (Thorens, 1992, 2001). Dans le SNC, GLUT2 est présent dans différentes structures impliquées dans la régulation nerveuse du métabolisme et de la PA, parmi lesquelles différents noyaux hypothalamiques tels que le VMN et le NA (Leloup *et al.*, 1994). Des expériences de double marquage révèlent la présence de GLUT2 dans différents types cellulaires : préférentiellement dans les astrocytes, mais aussi dans les neurones, les épendymocytes et les tanycytes (Arluison *et al.*, 2004a, 2004b; García *et al.*, 2003; Millán *et al.*, 2010). Toutefois, *in vitro*, sur des préparations de neurones hypothalamiques isolés, il a été montré que 30% des neurones GE et GI du VMN expriment GLUT2, proportion également retrouvée dans les neurones non



**Figure 17 : Etude de l'implication hypothalamique du transporteur de glucose GLUT2 dans la détection cérébrale du glucose *in vivo***

*Les rats ayant reçus des oligonucléotides antisens contre GLUT2 dans le NA ne présentent plus l'augmentation de sécrétion d'insuline en réponse à une injection carotidienne de glucose, normalement présente chez les rats témoins ou ayant reçu une séquence oligonucléotides missens de GLUT2 (d'après Leloup et al., 1998).*

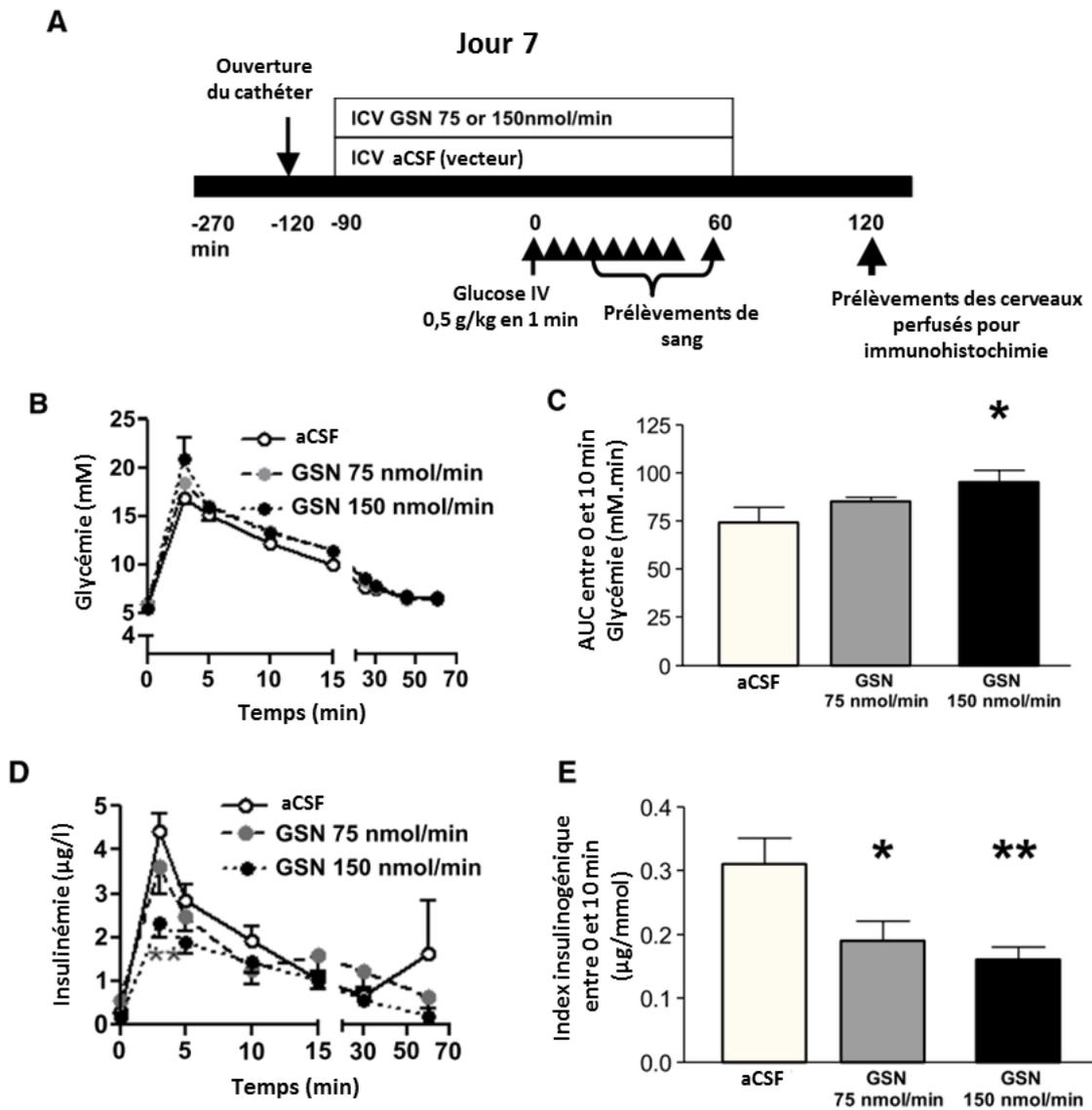
gluco-sensibles (Kang *et al.*, 2004). Toutefois, il est à noter que l'expression des GLUTs, *in vitro*, est fortement modifiée comparativement à ce qu'il peut être retrouvé *in vivo* (Klip and Pâquet, 1990).

L'implication de GLUT2 dans la sensibilité cérébrale au glucose a été montrée suite à l'injection d'oligonucléotides anti-sens GLUT2 dans le NA, conduisant à la suppression du pic de sécrétion d'insuline observé suite à l'injection d'un bolus intra-carotidien de glucose (**Figure 17**) ainsi qu'une forte diminution de l'effet satiétogène du glucose (Leloup *et al.*, 1998; Wan *et al.*, 1998). De plus, l'utilisation de souris invalidées pour le transporteur GLUT2 a montré que lorsque le transporteur est ré-exprimé au niveau cérébral uniquement dans les astrocytes, cela permet de restaurer l'activation du tronc cérébral et la sécrétion de glucagon en réponse à une hypoglycémie (Marty *et al.*, 2005). Ces études montrent donc que GLUT2 est directement impliqué dans la détection hypothalamique du glucose et pourrait aussi jouer un rôle dans le couplage astrocytes-neurones (Routh *et al.*, 2014; Thorens, 2014).

## **b) La phosphorylation du glucose : la glucokinase**

Suite à son entrée dans la cellule, le glucose va être phosphorylé en glucose-6-phosphate, étape clé de la glycolyse qui nécessite l'implication d'une hexokinase particulière, la glucokinase (GK, ou hexokinase IV). Comme GLUT2, la GK possède une faible affinité pour le glucose ( $K_m \approx 10$  mM) et est donc compatible avec la détection d'une forte augmentation de la concentration en glucose (Ogunnowo-Bada *et al.*, 2014). Elle est essentielle car c'est la seule hexokinase dont l'activité ne soit pas inhibée par son produit, permettant une oxydation du glucose de façon proportionnelle à son entrée dans la cellule.

Impliquée dans la détection du glucose par la cellule  $\beta$  du pancréas (chez le rongeur et chez l'Homme), son expression a également été mise en évidence dans le cerveau, et plus particulièrement dans le VMN et le NA. Comme pour GLUT2, la GK est exprimée dans les astrocytes, les épendymocytes et les tanocytes ainsi que les neurones où elle est exprimée à hauteur de 64% dans les neurones GE, 43% dans les neurones GI du VMN et 75% dans les neurones NPY du NA (Alvarez *et al.*, 2002; Dunn-Meynell *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2004; Lynch *et al.*, 2000; Maekawa *et al.*, 2000; Roncero *et al.*, 2000; Salgado *et al.*, 2014).



**Figure 18** L'injection ICV de l'inhibiteur de la glucokinase, la glucosamine, induit une intolérance au glucose et une diminution de la sécrétion d'insuline lors d'un test de tolérance au glucose par injection intraveineuse (IVGTT)

(A) Les rats ont reçu un bolus de glucose (0,5 g/kg) via la jugulaire après avoir été injecté 90 min ICV avec de la glucosamine (GSN) à 75 nmol/min, 150 nmol/min ou la solution contrôle aCSF. (B-C) Les rats qui ont reçu l'injection ICV de GSN présentent une intolérance au glucose pendant les premières minutes du test, associée à une diminution de la sécrétion d'insuline comparés aux rats qui ont reçu la solution contrôle aCSF (D-E) (Osundiji et al., 2012)

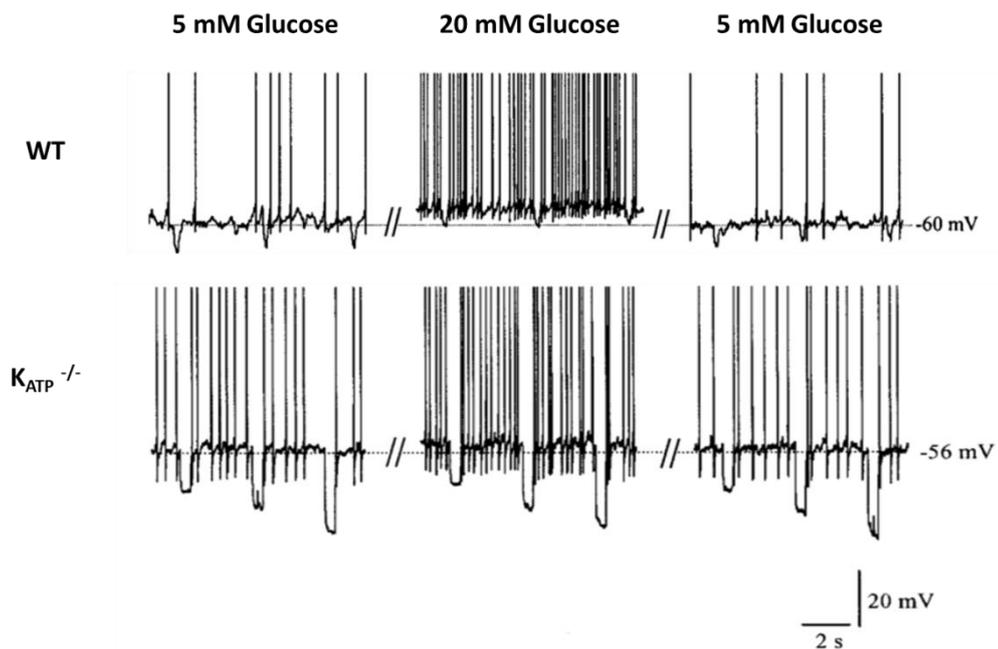
L'inhibition de la GK par la glucosamine (GSN) diminue la sécrétion d'insuline en réponse au glucose *in vitro* et *in vivo* (Balkan and Dunning, 1994). De plus, les souris génétiquement déficientes en GK, ou dont la GK a été pharmacologiquement inhibée par une injection de GSN, présentent une augmentation de l'expression de NPY et une diminution de l'expression de POMC dans l'hypothalamus, associées à une augmentation de la PA (Yang *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2011). Enfin, une inhibition centrale de la GK par une infusion ICV de GSN induit une intolérance au glucose (**Figure 18**) (Osundiji *et al.*, 2012). Ces études montrent que la GK joue un rôle clé dans la détection centrale du glucose et dans le contrôle nerveux de l'homéostasie glucidique.

La métabolisation du glucose, via les voies biochimiques impliquant plusieurs étapes dans la mitochondrie, conduit à l'augmentation de la production d'ATP. Ces étapes seront plus particulièrement décrites dans le chapitre 3.

### c) AMPK, senseur intracellulaire

L'AMPK (AMP-activated protein kinase) est une enzyme ubiquitaire qui agit comme un senseur intracellulaire du statut énergétique de la cellule. Elle a été identifiée comme étant une molécule clé des voies de signalisations impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique. En effet, l'AMPK est activée lors d'un déficit énergétique, lorsque le rapport AMP/ATP est augmenté (Blanco Martínez de Morentin *et al.*, 2011; Hardie *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2007; Winder and Hardie, 1999). L'AMPK est sensible aux variations des informations hormonales et nutritionnelles. Dans l'hypothalamus, les signaux orexigènes (lors du jeûne : l'hypoglycémie, la ghréline, ...) activent l'AMPK alors que les signaux anorexigènes (la PA, l'hyperglycémie, l'insuline, la leptine, ...) ont des effets inverses (Kahn *et al.*, 2005; Minokoshi *et al.*, 2002, 2004). L'AMPK est donc plus particulièrement impliquée dans la détection de l'hypoglycémie et dans la mise en place des réponses de contre-régulation dans le but de stimuler la production du glucose (McCrimmon *et al.*, 2004, 2006, 2008).

Des données récentes chez la souris montrent que l'inhibition spécifique de la sous-unité AMPK $\alpha$ 2 dans les neurones POMC entraîne une obésité, alors que si l'inhibition a lieu spécifiquement dans les neurones NPY/AgRP, les souris développent un phénotype maigre (Claret *et al.*, 2007; Schneeberger and Claret, 2012). Dans les modèles animaux présentant un syndrome métabolique ainsi que chez l'Homme obèse et diabétique, on observe une diminution de l'activité de l'AMPK dans le muscle et le



**Figure 19 : L'activation des neurones HGE en réponse au glucose est indépendante du canal  $K_{ATP}$**

Les souris sauvages (WT) présentent une augmentation de l'activité électrique des neurones HGE en réponse à l'augmentation de la concentration extracellulaire de 5 à 20 mM de glucose. Les souris délétées pour le canal  $K_{ATP}$  ( $K_{ATP}^{-/-}$ ) présentent aussi une augmentation de l'activité électrique des neurones HGE dans les mêmes conditions, ce qui montre qu'un mécanisme indépendant du canal  $K_{ATP}$  est mis en jeu dans ces réponses (d'après Fioramonti et al., 2004).

tissu adipeux et des études montrent qu'une telle dérégulation de l'AMPK participerait au développement d'une résistance à l'insuline (Ruderman *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2012). Cependant, les effets périphériques et centraux de l'AMPK sont contradictoires puisque l'activité de l'AMPK est augmentée dans l'hypothalamus (Ikegami *et al.*, 2013; Kinote *et al.*, 2012), ce qui participerait à la mise en place des défauts énergétiques et de l'homéostasie glucidique, via l'augmentation de la PA et de la production hépatique de glucose, ainsi que la diminution de la sécrétion d'insuline chez des rats diabétiques (Park *et al.*, 2014). La régulation de l'activité de l'AMPK présente donc un intérêt tout particulier concernant l'étude du DT2 et du syndrome métabolique et certains antidiabétiques couramment utilisés en clinique, tels que la metformine, sont des activateurs de l'AMPK (Coughlan *et al.*, 2014; Steinberg and Kemp, 2009).

#### d) Implication du canal $K_{ATP}$ dans la transmission du signal

Dans la cellule  $\beta$ , le canal  $K_{ATP}$  joue un rôle primordial dans la transmission du signal. En effet, l'augmentation du ratio ATP/ADP induit la fermeture des canaux  $K_{ATP}$ , l'accumulation du potassium dans la cellule modifie le potentiel de membrane ce qui aboutit à l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants. Enfin, l'entrée massive de calcium dans la cellule aboutit à la sécrétion d'insuline (**Figure 11**). L'activité du canal  $K_{ATP}$  est modulée par la fixation de ligands tels que l'ATP (ou l'ADP). L'ATP entraîne la fermeture du canal et l'ADP, à l'inverse, son ouverture par l'intermédiaire de sites de fixation différents. Ce canal est donc sensible au rapport ATP/ADP. Le canal  $K_{ATP}$  a donc un rôle de senseur métabolique (Miki and Seino, 2005; Nichols, 2006).

Le canal  $K_{ATP}$  est présent dans de nombreux neurones, dont les neurones NPY et POMC du NA (Dunn-Meynell *et al.*, 1998), où son implication dans la réponse au glucose a été démontrée (Ibrahim *et al.*, 2003; Miki *et al.*, 2001). La leptine et l'insuline sont également capables d'inhiber des neurones du NA via l'ouverture de ce canal et l'activation de la PI3K, enzyme commune aux voies de signalisation de ces deux hormones (Spanswick *et al.*, 1997, 2000). Le canal  $K_{ATP}$  est donc un élément fondamental dans la régulation nerveuse de l'homéostasie énergétique.

Cependant, depuis une dizaine d'années, notre équipe a montré que l'activation des neurones HGE était indépendante du canal  $K_{ATP}$ , qui serait déjà fermé à une concentration extracellulaire de glucose de 5 mM (**Figure 19**). Un autre mécanisme



serait alors mis en jeu, et les études d'électrophysiologie montrent l'implication d'un canal à conductance cationique non sélective (Fioramonti *et al.*, 2004, 2007). Bien que les travaux pour identifier ce canal n'aient pas encore été publiés, les travaux en cours dans le laboratoire (qui ont fait l'objet de la thèse de Chloé Chrétien) montrent l'implication plus particulière des canaux TRP-C3 (Transient Receptor Potential Channel 3), et, potentiellement, TRP-C4.

Ces canaux ont été étudiés car ils sont parmi les seuls à répondre à deux caractéristiques identifiées dans la réponse à une augmentation de la concentration de glucose au-delà de 5mM : tout d'abord, ils sont sensibles à la production d'espèces actives de l'oxygène (ROS). Or, une production de ROS d'origine mitochondriale a été décrite dans le MBH lors de l'augmentation de la glycémie cérébrale, représentant une étape essentielle à la détection hypothalamique du glucose (Leloup *et al.*, 2009). De plus, ils présentent, lors de cette réponse, une conductance cationique non sélective. La place de la mitochondrie et de la signalisation par les ROS mitochondriaux dans ce mécanisme est au centre de mes travaux de thèse, j'y consacrerai donc le chapitre suivant.



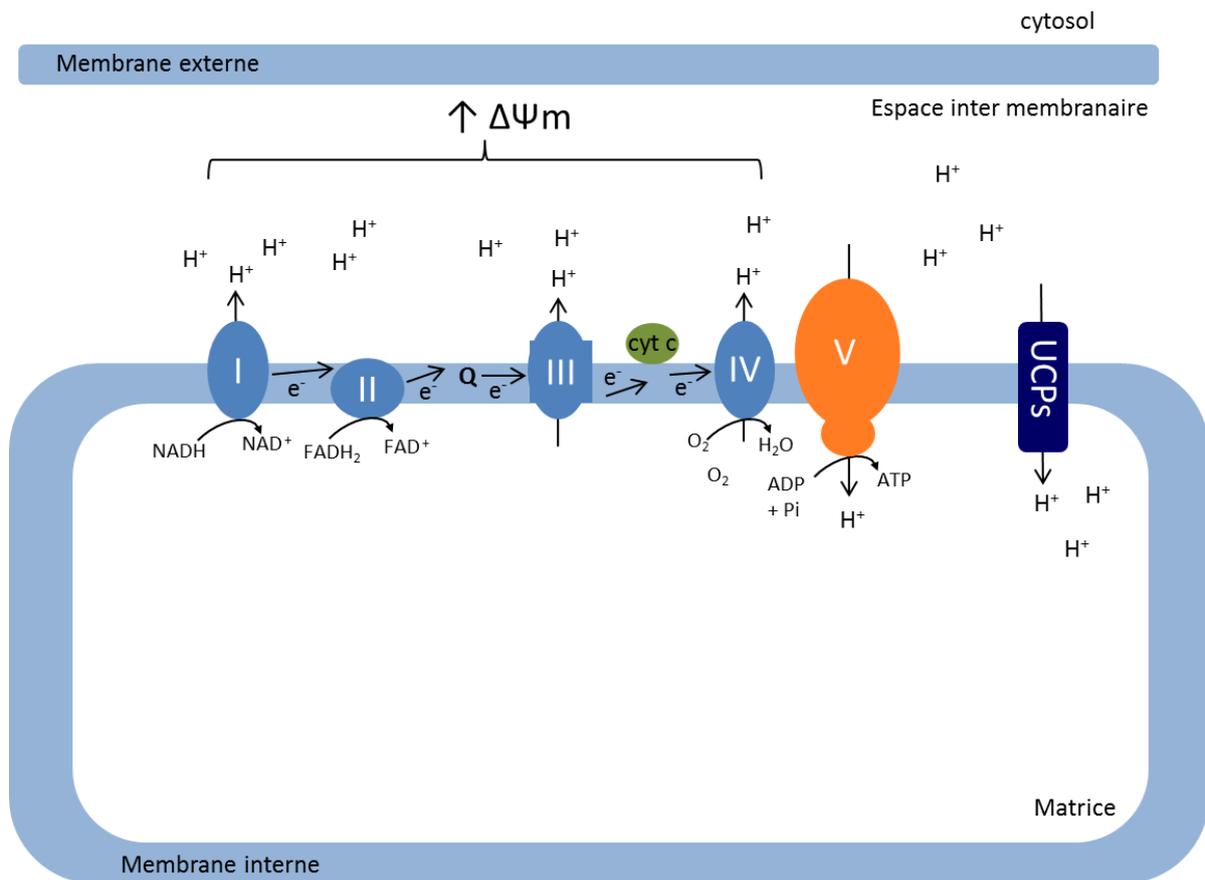
# Chapitre III : La mitochondrie et la détection hypothalamique du glucose

---

Les mitochondries ont été décrites pour la première fois vers la fin du XIXe siècle. Elles sont tout d'abord assimilées à des bactéries symbiotiques mais des études plus approfondies ont montré que les mitochondries possédaient des propriétés différentes de bactéries connues (Cowdry and Olitsky, 1922; Reijnders, 1975). Les chercheurs en ont déduit que les mitochondries seraient des descendantes de protéo-bactéries, entrées dans les cellules eucaryotes, puis qui se seraient développées grâce à des relations endosymbiotiques (Margulis, 1975), permettant la synthèse d'énergie via les réactions de catabolisme (synthèse d'ATP après la dégradation des nutriments via la  $\beta$ -oxydation et la glycolyse puis le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative).

Ces organites intracellulaires ont la particularité de posséder leur propre génome. En effet, même si la plupart des gènes provenant de la bactérie d'origine ont été transférés dans le noyau de la cellule, l'ADN mitochondrial (ADNmt, double brin circulaire) possède 37 gènes capables de produire des ARN ribosomiaux, des ARN de transfert ainsi qu'une partie des sous-unités indispensables au fonctionnement de la chaîne respiratoire (Battey and Clayton, 1978). Les mutations de l'ADNmt sont impliquées dans certaines pathologies, définies comme les maladies mitochondriales, telles que certaines cardiomyopathies, maladies neurodégénératives (Huntington, Alzheimer...), ainsi que certaines obésités avec insulino-résistance et diabète (Wallace, 2005).

Les mitochondries sont la source de l'énergie cellulaire, sous forme d'ATP, suite à l'oxydation des nutriments. Cependant, la contribution de ces organelles à d'autres fonctions cellulaires devient de plus en plus évidente. Depuis quelques dizaines d'années, les mitochondries ont été démontrées comme impliquées dans de nombreuses fonctions, telles que : la signalisation par les ROS, la régulation du  $\Delta\psi$  de la cellule, les voies de l'apoptose et la signalisation calcique, parmi d'autres aspects du métabolisme cellulaire (Schatz, 2007; Scheffler, 2001).



**Figure 20 : Représentation schématique du flux d'électron au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale**

Les substrats  $NADH, H^+$  et  $FADH_2$  fournissent leurs électrons aux complexes I et II respectivement. Les électrons transitent, via le coenzyme Q, au complexe III puis via le cytochrome C jusqu'au complexe IV, qui réduit l'oxygène en eau. Le gradient de protons ainsi créé induit l'augmentation du potentiel membranaire de la mitochondrie ( $\Delta\psi_m$ ) et est dissipé au niveau du complexe V permettant la formation d'ATP ou par les canaux UCPs (d'après Leloup et al., 2011).

# 1) La chaîne respiratoire mitochondriale

## a) Bilans énergétiques

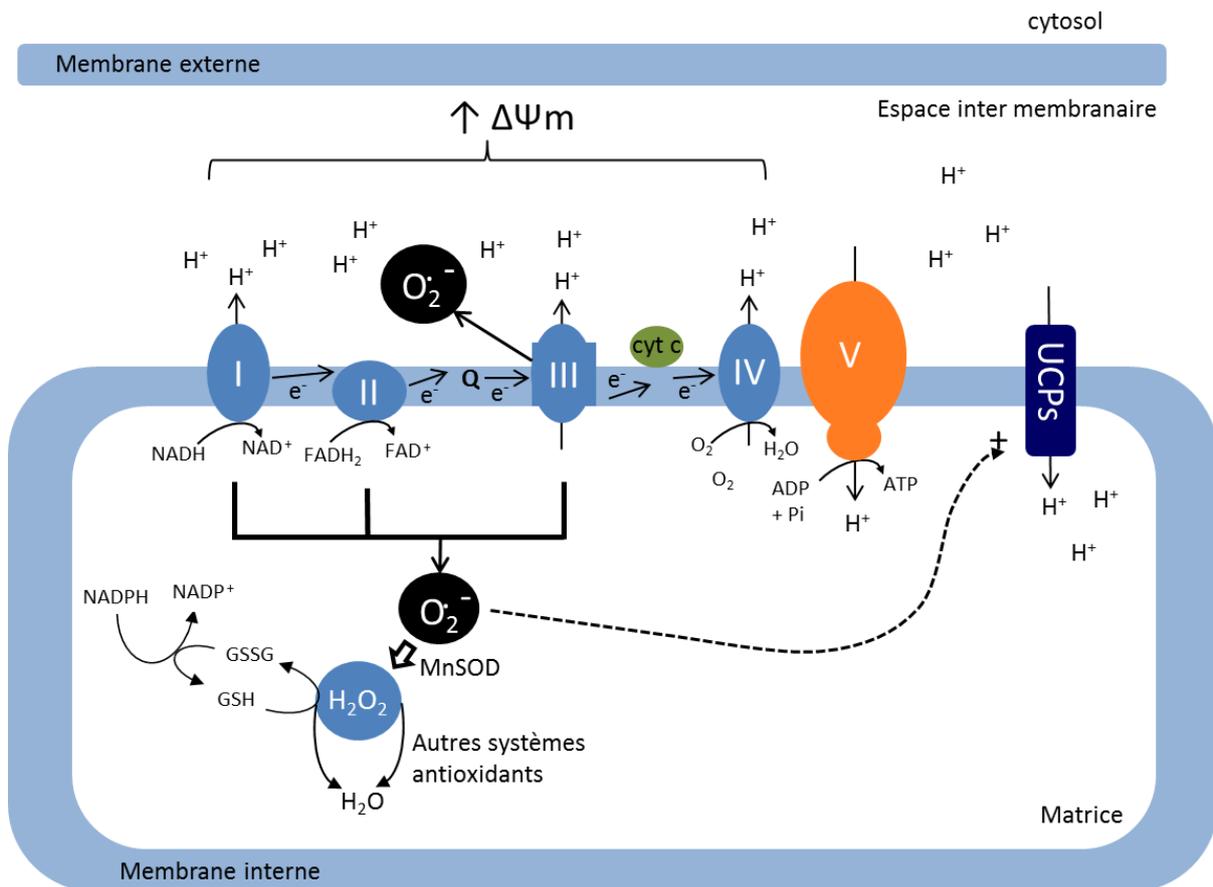
Le but premier de l'alimentation est l'apport d'énergie nécessaire à l'organisme pour fonctionner et donc pour survivre et se reproduire. Les nutriments vont être catabolisés par des voies biochimiques, nécessitant l'intervention d'enzymes (isomérases, déshydrogénases, kinases, phosphatases, ...), de coenzymes (vitamines et minéraux) et permettant la production d'équivalents réduits ( $\text{NADH,H}^+$  et  $\text{FADH}_2$ ), qui vont ensuite être transformés en ATP par la chaîne respiratoire mitochondriale (1  $\text{NADH,H}^+$  va permettre la formation de 3 molécules d'ATP alors que 1  $\text{FADH}_2$  va permettre la formation de 2 molécules d'ATP).

Ainsi, l'oxydation des AG en acétyl-CoA va induire la production de  $\text{NADH,H}^+$  et  $\text{FADH}_2$  (dont le nombre varie selon la longueur de la chaîne carbonée, le nombre pair ou impair de carbones et le nombre de saturations) via la  $\beta$ -oxydation. L'oxydation du glucose en acétyl-CoA va induire la production de  $\text{NADH,H}^+$  (en situation d'aérobie) via la glycolyse. Les acétyl-CoA ainsi formés vont être pris en charge par le cycle de l'acide citrique (ou cycle de Krebs) où chacune de ces molécules va former 3  $\text{NADH,H}^+$  et 1  $\text{FADH}_2$ .

## b) La phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative est effectuée par la chaîne respiratoire mitochondriale, qui correspond à une chaîne de complexes protéiques présents au sein de la membrane interne de la mitochondrie, et responsables de la production d'ATP à partir du  $\text{NADH}$  et du  $\text{FADH}_2$  produits par les différentes voies cataboliques de l'organisme (**Figure 20**). Cette production d'énergie est permise grâce à la formation d'un gradient de proton dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie, lui-même formé par l'énergie des électrons provenant du  $\text{NADH}$  et du  $\text{FADH}_2$ . Les électrons récupérés, riches en énergie, sont transportés successivement via les différents complexes :

- Le complexe I ( $\text{NADH}$  coenzyme Q réductase) oxyde le  $\text{NADH}$  et permet le transport de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire.



### Figure 21 : Production mitochondriale des ROS

Les complexes I, II et III de la chaîne respiratoire sont responsables de la production d'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) dans la matrice mitochondriale et l'espace inter membranaire.  $O_2^{\cdot-}$  génère le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) après dismutation par la superoxyde dismutase manganèse dépendante (MnSOD).  $H_2O_2$  peut être neutralisé par plusieurs systèmes antioxydants, incluant des enzymes (la catalase ou la glutathion peroxydase par exemple) ou par des molécules antioxydantes (le glutathion ou des vitamines). La glucose-6-phosphate déshydrogénase (voie des pentoses phosphate), fournit le NADPH,  $H^+$  indispensable à la régénération du glutathion (d'après Leloup et al., 2011).

- Le complexe II (Succinate coenzyme Q réductase) oxyde le FADH<sub>2</sub>.
- Ces électrons vont être transportés au complexe III (Coenzyme Q cytochrome C réductase) via le coenzyme Q (ou ubiquinone), permettant ainsi le transport de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire.
- Les électrons transitent ensuite vers le complexe IV (Cytochrome C oxydase) via le cytochrome C, permettant le transport de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire. Le flux d'électrons ainsi généré va être responsable de la réduction de l'oxygène en eau (respiration).
- Le gradient de concentration de protons ainsi créé à travers la membrane va servir de réservoir d'énergie libre pour la synthèse d'ATP. Il va en effet être utilisé par le complexe V (ATP synthase) et permettre la phosphorylation de l'ADP en ATP en transportant les protons de l'espace inter-membranaire vers la matrice mitochondriale (Mitchell and Moyle, 1967, prix Nobel de chimie en 1978 pour sa formulation de la théorie chimio-osmotique).

### c) La respiration découplée

L'oxydation des nutriments n'aboutit pas toujours en production d'énergie. En effet, lors d'une surcharge en nutriments, ou dans des tissus spécifiques, dits thermogéniques, l'organisme s'adapte à cette situation en diminuant l'efficacité bioénergétique de la chaîne respiratoire aboutissant à une production de chaleur. Cet état est appelé « respiration découplée ». Cette fonction est assurée par les protéines découplantes, appelées UCPs, présentes dans la membrane interne de la mitochondrie et dont le rôle est de permettre « la fuite » des protons, shuntant ainsi l'ATP synthase et ne permettant donc pas la production d'ATP (**Figure 21**).

Le découplage est un mécanisme de protection important pour la cellule. En effet, lorsqu'une quantité importante de nutriments doit être oxydée, l'augmentation du flux de proton ainsi généré induit une augmentation du potentiel de membrane mitochondriale ( $\Delta\psi_m$ ). Cette augmentation de « pression » dans l'espace inter-membranaire ralentit le transfert des électrons, augmentant ainsi leur probabilité de réaction avec l'oxygène : ce forment ainsi des espèces dérivées de l'oxygène, appelées ROS (Reactive oxygen speacies). Ces molécules, extrêmement réactives, sont connues pour être responsables du stress oxydant pouvant induire des dommages cellulaires



importants lorsqu'elles sont en excès. Ainsi, le rôle des UCPs va être de diminuer la « pression » inter-membranaires en protons, permettant de réguler le  $\Delta\psi_m$  pour finalement limiter la réaction des électrons avec l'oxygène, et donc la production de ROS d'origine mitochondriale (mROS) (Casteilla *et al.*, 2001). Ce mécanisme est remarquablement expliqué dans la revue écrite par Liesa et Shirihai en 2013, dans une analogie faite entre le flux d'électrons générés par l'oxydation des nutriments et l'eau qui s'écoule dans un tuyau d'arrosage (Liesa and Shirihai, 2013).

### *Les UCPs*

Les UCPs sont des protéines insérées dans la membrane interne de la mitochondrie. Il en existe 5 isoformes dans l'organisme (Dietrich and Horvath, 2010).

La première UCP décrite a été UCP1 présente dans le tissu adipeux brun et acteur majeur de la thermogenèse (Nicholls and Locke, 1984). Ce mécanisme utilise l'énergie générée par l'oxydation des substrats via la dissipation du gradient de proton, grâce à l'accélération du transfert des électrons le long de la chaîne respiratoire, permettant finalement de générer de la chaleur. UCP3, aussi exprimée dans le tissu adipeux, est surtout retrouvée dans le muscle squelettique, où son rôle principale est de moduler la respiration mitochondriale (Boss *et al.*, 1997).

UCP2, 4 et 5 sont les principales isoformes présentes dans le SNC (Andrews *et al.*, 2005). UCP2 est abondamment exprimée dans l'hypothalamus alors que UCP4 et UCP5 ont une distribution plus étendue et restent moins étudiées (Alán *et al.*, 2009; Ramsden *et al.*, 2012). Ainsi, UCP2, possède un rôle important dans la régulation du métabolisme énergétique (Andrews *et al.*, 2005; Richard *et al.*, 2001; Toda and Diano, 2014). Par exemple, la ghréline induit une augmentation de la respiration mitochondriale sur des préparations synaptosomales hypothalamiques, de façon dépendante de UCP2 (cette activation est perdue chez les animaux *ucp2<sup>-/-</sup>*) (Andrews *et al.*, 2008). De plus, l'activation des neurones MCH par le glucose est modulée par UCP2 et implique le canal  $K_{ATP}$  (Kong *et al.*, 2010). Ainsi, les UCPs, et particulièrement UCP2, semblent impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique via la modulation de la production de mROS (Diano and Horvath, 2012). Toutefois, le rôle découplant d'UCP2 reste controversé (Produit-Zengaffinen *et al.*, 2007).



## 2) Les espèces actives de l'oxygène d'origine mitochondriale (mROS)

Comme nous venons de le voir, l'oxydation des substrats énergétiques permet de produire l'énergie et la chaleur indispensable à la vie. Cependant, l'implication de molécules d'oxygène dans ces processus d'oxydation induit la formation de molécules dérivées de l'oxygène sous forme réduites, appelées ROS (Bergendi *et al.*, 1999; Gutteridge, 1994). Les radicaux libres (tels que les anions superoxydes et hydroxyles) ou produits non radicalaires (comme le peroxyde d'hydrogène) ainsi formés, sont pour certains réactifs en milieu biologique et peuvent réagir avec d'autres molécules chimiques environnantes : s'ils sont oxydants, ils sont capables d'arracher un électron ; s'ils sont réducteurs, ils peuvent en céder un. Ces réactions radicalaires conduisent souvent à la formation d'un nouveau radical et le phénomène peut se propager par des réactions en chaîne si les systèmes antioxydants sont dépassés, aboutissant à des altérations de fonctions biologiques (Gardès-albert *et al.*, 2003).

### a) Production mitochondriale des ROS et systèmes de régulation

La production mitochondriale des ROS a largement été documentée à travers la littérature scientifique (Bolisetty and Jaimes, 2013; Brand *et al.*, 2004; Casteilla *et al.*, 2001; Dan Dunn *et al.*, 2015; Grivennikova and Vinogradov, 2013; Leloup *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2002; Murphy, 2009; Poyton *et al.*, 2009; Venditti *et al.*, 2013). La chaîne respiratoire mitochondriale est ainsi responsable de 80% de la production cellulaire de ROS, et ce principalement via le complexe I (Treberg *et al.*, 2011), le complexe II (Quinlan *et al.*, 2012) et le complexe III (Muller *et al.*, 2004), mais d'autres protéines intracellulaires sont capables de générer des ROS comme par exemple la NADPH oxydase (Babior, 2004), les mono oxygénases (CYP450) ou cyclooxygénases, la pyruvate déshydrogénase (Fisher-Wellman *et al.*, 2013) ou encore via les monoamines oxydases localisées à la membrane mitochondriale (Di Lisa *et al.*, 2009).

### i) Les différents ROS

La majeure partie de l'oxygène consommé lors de la production d'ATP par la mitochondrie abouti à la production d'eau via une réduction tétravalente (ajout de quatre électrons) de la molécule d'oxygène au niveau du complexe IV de la chaîne



respiratoire. Lors du fonctionnement normal de la chaîne respiratoire, mais surtout en cas d'altérations mitochondriales, des électrons peuvent réagir avec l'oxygène et ainsi induire la formation d'anions superoxydes ( $O_2^{\cdot-}$ ) par la réduction monoélectronique d'une molécule d'oxygène (**Figure 21**).

Les radicaux superoxydes sont les substrats des superoxydes dismutases (SOD), la dismutation de deux anions superoxydes aboutissant à la formation de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Ces deux produits sont peu toxiques *in vivo* car ils sont peu réactifs et plusieurs enzymes participent à leur élimination par réduction ou dismutation (Gardès-albert *et al.*, 2003). Cependant, l'anion superoxyde peut réagir avec un important messenger cellulaire, le monoxyde d'azote ( $NO$ ) et aboutir à la formation de peroxydinitrite ou autres espèces oxydantes appelées espèces actives de l'azote (RNS) (Pacher *et al.*, 2007). De plus,  $H_2O_2$  peut interagir avec des ions métalliques (via la réaction de Haber Weiss ou de Fenton, nécessitant la présence, entre autres, des ions  $Fe^{2+}$  ou  $Cu^+$ ), aboutissant à la formation d'une espèce hautement réactive, le radical hydroxyle ( $HO\cdot$ ) (Bresgen and Eckl, 2015; Halliwell and Gutteridge, 1992). Ce ROS est responsable de la plupart des dommages observés en condition pathologique puisqu'il possède une forte réactivité avec tous les matériaux biologiques, attaquant les doubles liaisons des bases de l'ADN ou des acides gras polyinsaturés, mais aussi les acides aminés pouvant alors inactiver des enzymes (Cadet *et al.*, 1999; Marnett *et al.*, 2003).

Le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde participent aux signalisations cellulaires. Leur durée de vie est relativement longue, leur permettant de diffuser au-delà de leur lieu de production pour atteindre leur cible (Gardès-albert *et al.*, 2003).

## ii) Systèmes de gestion des ROS

Les enzymes antioxydantes permettent de réguler la concentration de ROS. Ainsi, l'activité des superoxydes dismutases (SOD) assurent la dismutation de deux  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$  et  $O_2$ . Il existe plusieurs types de SOD, SOD1 et SOD3 dont le site actif contient du cuivre et du zinc (Cu,Zn-SOD) et qui sont essentiellement localisées dans le cytosol et la matrice extracellulaire, tandis que SOD2 contient du manganèse (Mn-SOD) et est uniquement présente dans les mitochondries. Leur action est couplée à celle des enzymes décomposant  $H_2O_2$  : la catalase (dont la concentration varie selon le type cellulaire) et les glutathions peroxydases. La catalase permet la dismutation de deux molécules d' $H_2O_2$  en  $H_2O$  et en  $O_2$ , et la glutathion peroxydase se sert de l'oxydation du



glutathion (GSH en GSSG) et aboutit à la formation d'eau (**Figure 21**). Au niveau cérébral, un dysfonctionnement de ce système menant à une augmentation du stress oxydatif est fortement impliqué dans le développement de maladies neurodégénératives (Maier and Chan, 2002; Ruszkiewicz and Albrecht, 2015). De plus, nous verrons dans les paragraphes suivant l'importance de ce système enzymatique dans la régulation centrale de l'homéostasie énergétique.

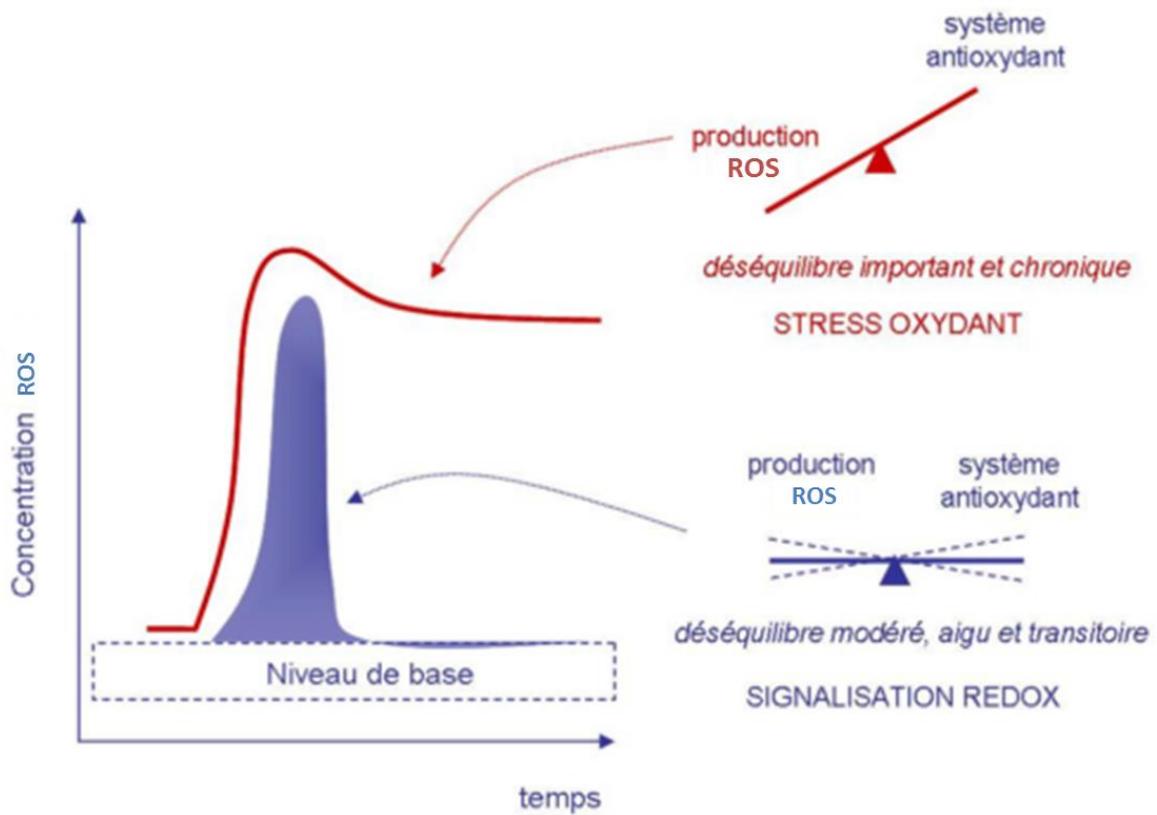
Outre les systèmes enzymatiques, d'autres molécules antioxydantes permettent de réguler la quantité de ROS, notamment les vitamines C et E, le coenzyme Q ou ubiquinone et les caroténoïdes. Ces molécules, sous forme réduite, vont avoir pour rôle de piéger les radicaux libres, limitant ainsi le stress oxydant (Addis *et al.*, 2012). L'ensemble de ces systèmes antioxydants, piègeurs ou enzymatiques, agissent en synergie afin de permettre leur régénération. Ils ont, pour base essentielle de leur régénération, la glucose-6-phosphate déshydrogénase (voie des pentoses phosphate) et l'enzyme malique, qui fournissent le NADPH, H<sup>+</sup> indispensable à cette régénération. Il permet ainsi la réduction du glutathion, plaque tournante de ces synergies (**Figure 21**).

Nous avons déjà évoqué aussi le rôle des UCPs qui permettent de diminuer la production d'anions superoxydes. De façon intéressante, l'activation des UCPs est aussi régulée par les mROS par un rétrocontrôle négatif (Brand *et al.*, 2004; Echtay *et al.*, 2002). En effet, sur mitochondries isolées, des études mettent en évidence que l'anion superoxyde augmente la conductance membranaire aux protons via l'activation des UCPs, induisant une baisse du potentiel membranaire. Ainsi, en cas de concentration trop élevée en O<sub>2</sub><sup>-</sup>, l'activation des UCPs est donc un moyen de limiter la production de mROS. L'ensemble de ces systèmes antioxydants fonctionnent en synergie, assurant une continuité dans la protection des compartiments hydrophiles et lipophiles.

## **b) Importance physiologique des ROS**

### **i) Le stress oxydatif**

Le dysfonctionnement des systèmes de régulation de la formation des ROS est à l'origine des phénomènes de stress oxydatif dont l'importance dans de nombreuses pathologies est maintenant largement démontrée. En effet, une grande quantité de ROS génère des interactions avec les molécules environnantes, notamment au niveau de l'ADN pouvant induire des mutations ou des défauts de transcription, et au niveau



**Figure 22 : L'homéostasie redox.**

*Si la production de ROS est modérée et relativement courte dans le temps, la signalisation redox déclenchée par les ROS permet de maintenir l'homéostasie redox. En cas de production de ROS trop intense et maintenue dans le temps, les systèmes antioxydants sont dépassés, une dérégulation chronique provoque l'établissement d'un stress oxydant qui aboutit à la mise en place de situations physiopathologiques (d'après Dröge, 2002).*

du RE, induisant un défaut de repliement des protéines et donc des défauts importants dans la cellule (Murphy, 2013; Sedelnikova *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2005).

Il est difficile de mesurer précisément la concentration de ROS, mais lorsque leur concentration augmente, de façon générale le glutathion sous forme réduite (GSH) est oxydé (GSSG) (Flohé, 2013). Le GSH est au carrefour des réactions redox (enzymatiques ou anti-oxydant direct), il est donc un bon reflet de l'état redox de la cellule.

## ii) La signalisation redox

La concentration cellulaire de ROS résulte de la balance entre les systèmes producteurs de radicaux libres et les systèmes antioxydants (**Figure 22**). Ainsi, bien que les ROS aient longtemps été majoritairement connus pour leurs propriétés néfastes, une production modérée de ROS induit une augmentation physiologique aigue et transitoire de leur concentration. Ils peuvent ainsi modifier certaines cibles environnantes de manière réversible, agissant alors comme des molécules de signalisation : c'est la signalisation redox (Dröge, 2002; Hamanaka and Chandel, 2010; Ray *et al.*, 2012).

Cette signalisation est le plus souvent médiée par l'oxydation des cystéines, pouvant altérer les interactions protéine-protéine, la fixation des facteurs de transcription sur l'ADN ou encore l'activité catalytique d'enzymes (si les groupements thiol des cystéines sont situés dans les sites actifs) (Janssen-Heininger *et al.*, 2008). De plus, l'oxydation des groupements thiol (-SH) favorise la formation de ponts disulfures (-S-S-) induisant des changements de conformation ou d'oligomérisation de protéines (Brandes *et al.*, 2009). Ces oxydations sont toutefois réversibles (sous l'action de réactions antioxydantes comme par exemple le GSH). La régulation des protéines de signalisation par les ROS et les modifications de l'état redox sont très rapides, réversibles et ne nécessitent pas la synthèse de protéines *de novo*, permettant une transduction rapide des signaux.

L'activité des protéines kinases/phosphatases est particulièrement sensible à la signalisation redox. Les ROS vont ainsi réguler les voies de signalisation impliquant la PTP-1B (protein tyrosine phosphatase 1B), la PI3K ou les MAPK et jouent un rôle primordial dans la régulation des voies de signalisation NFκB, TNFα (Cho *et al.*, 2004).

Les mROS peuvent aussi moduler l'activité neuronale de façon directe via des canaux membranaires redox-sensibles ou indirecte via des voies de signalisation intracellulaire redox-sensibles couplées au canal K<sub>ATP</sub> par exemple



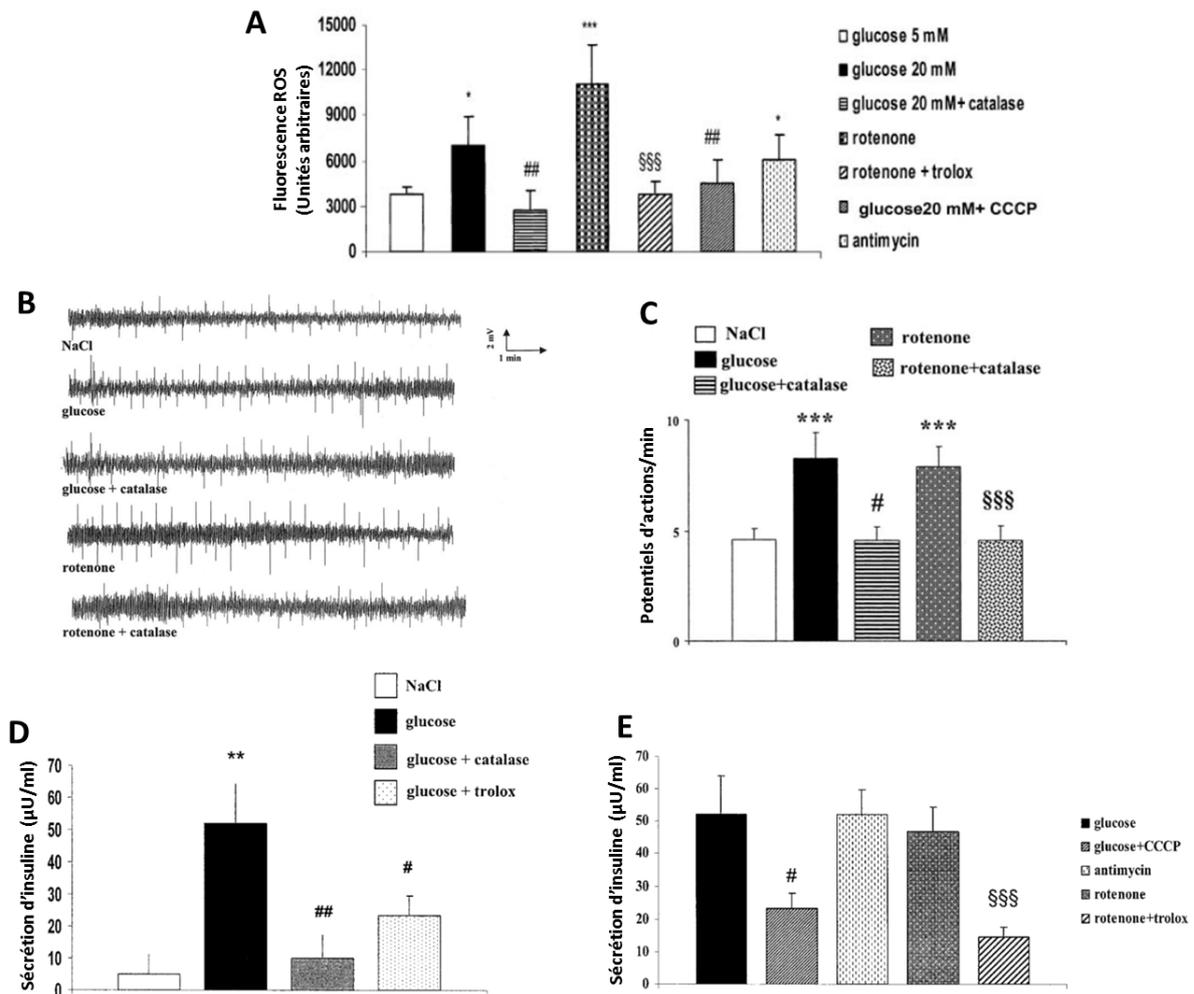
(Avshalumov and Rice, 2003; Chai and Lin, 2010). A moyen terme, les ROS produits peuvent contrôler la transcription de neuropeptides participant au contrôle du métabolisme énergétique. Ainsi, la production de mROS active les neurones POMC induisant l'arrêt de la PA et stimulant le stockage et l'utilisation des substrats énergétiques, processus contrôlés par l'insuline et la leptine (Varela and Horvath, 2012). La production de mROS va aussi diminuer l'activité des neurones AgRP contribuant à l'arrêt de la PA (Andrews *et al.*, 2008).

### c) Les ROS et la régulation du métabolisme énergétique

#### i) Second messagers de la détection hypothalamique du glucose

Les mROS apparaissent depuis une dizaine d'année comme de véritables seconds messagers, impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique. En effet, une première étude fondatrice a montré, sur des cultures de différents types cellulaires, que l'augmentation de la concentration en pyruvate favorisait la production de mROS (Nemoto *et al.*, 2000). Cette production déclenche ainsi une voie de signalisation redox-sensible permettant la réorientation du métabolisme vers une voie de stockage du glucose sous forme de glycogène plutôt que vers un catabolisme oxydatif. Ce mécanisme limite secondairement l'apport d'équivalents réduits à la chaîne respiratoire mitochondriale et donc la production de ROS qui en résulte (Nemoto *et al.*, 2000).

Notre équipe a montré que lors de la détection cérébrale du glucose, les mROS pouvaient être une voie de signalisation importante dans le déclenchement de la réponse à l'hyperglycémie. Le métabolisme du glucose fournit des équivalents réduits qui cèdent leurs électrons au complexe I (via le NADH) et au complexe II (via le FADH<sub>2</sub>) de la chaîne respiratoire mitochondriale lors de leur oxydation. Lors d'un apport rapide de substrats, leur oxydation provoque l'arrivée massive d'électrons, sans régulation immédiate de la dissipation du gradient de protons par l'ATP synthase et/ou l'activité des UCPs. Ce temps d'adaptation serait à l'origine d'une élévation transitoire de la production de mROS. En effet, une augmentation de la concentration de glucose de 5 à 20 mM entraîne une production de ROS sur des coupes d'hypothalami (**Figure 23A**). De



### Figure 23 : Implication des mROS dans la détection hypothalamique du glucose

(A) Production de ROS mesurée via la fluorescence relative de la sonde  $H_2DCFDA$  (sensible à  $H_2O_2$ , fluorescence rapportée à la quantité protéique). Des hypothalami ont été incubés avec du glucose, des antioxydants tels que la catalase ou le trolox (analogue amphiphile de la vitamine E), des inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale tels que la roténone (complexe I) et l'antimycine (complexe III) qui bloquent le transfert des électrons et conduisent à la formation d'anions superoxyde; et/ou le CCCP qui découple la respiration de la phosphorylation de l'ADP. (B-C) Enregistrement extracellulaire in vivo de l'activité neuronale du noyau arqué et (D-E) pic de sécrétion d'insuline, mesurée chez des rats Wistar mâles après une injection intra-carotidienne des différents activateurs et inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Ainsi, une augmentation de la concentration de glucose de 5 à 20 mM entraîne une production de ROS, in situ sur les coupes d'hypothalami mais aussi in vivo après une injection intra-carotidienne de glucose. Cette injection de glucose induit aussi une augmentation de l'activité électrique du NA de l'hypothalamus et déclenche en périphérie un pic de sécrétion d'insuline. Ces effets sont mimés par des inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale injectés vers le cerveau (entraînant une production de mROS) et sont inhibés avec un prétraitement à la catalase ou d'agents découplant comme le CCCP, montrant l'implication des mROS, et plus particulièrement de  $H_2O_2$ , dans ce mécanisme (d'après Leloup et al., 2006).

plus, une injection intra-carotidienne de glucose induit une augmentation de la production hypothalamique des mROS chez le rat, ainsi qu'une augmentation de l'activité électrique du NA de l'hypothalamus et déclenche en périphérie un pic de sécrétion d'insuline (**Figure 23B-E**). Ces effets sont mimés par des inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale injectés en direction du cerveau (via la carotide, entraînant une production de mROS) et sont inhibés avec un prétraitement à la catalase ou d'agents découplant comme le CCCP, montrant l'implication des mROS, et plus particulièrement de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dans ce mécanisme (**Figure 23**) (Leloup *et al.*, 2006).

Au niveau pancréatique, il a été montré, sur une lignée cellulaire de cellule  $\beta$ , qu'une augmentation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> issue du métabolisme du glucose était un signal métabolique induisant la sécrétion d'insuline (Pi *et al.*, 2007). Notre équipe a également montré que la production de mROS lors de la détection de l'hyperglycémie était nécessaire à la sécrétion d'insuline sur des îlots fraîchement isolés. L'utilisation dose-dépendante d'antioxydants prévient la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  lorsqu'ils sont incubés avec des concentrations stimulantes de glucose, indépendamment de la concentration en ATP et NADH (Leloup *et al.*, 2009). Ce rôle a ensuite été confirmé par d'autres études (Pi and Collins, 2010).

Notre équipe a également montré chez le rat Zucker, obèse et insulino-résistant, une hypersensibilité hypothalamique au glucose (activation électrique des neurones du NA et sécrétion d'insuline en réponse à une injection intra-carotidienne de glucose 3 mg/kg, sans effet chez le rat non obèse) (Colombani *et al.*, 2009). Cette réponse anormale est associée à une augmentation anormale de la production de mROS, une augmentation du stress oxydatif (représenté par l'augmentation du ratio GSSG/GSH et de l'activité de la Mn-SOD), ainsi qu'une surexpression de certains complexes de la chaîne respiratoire corrélée à une augmentation de la respiration mitochondriale. De façon intéressante, la perfusion ICV de GSH a permis de corriger le déséquilibre redox et restaurer l'absence de réponse à une injection intra-carotidienne de glucose 3 mg/kg chez les rats Zucker (Colombani *et al.*, 2009). Cette étude montre l'importance d'une production de mROS (et donc d'un statut redox) adaptée permettant d'induire une signalisation adéquate pour la détection hypothalamique du glucose.

Ainsi, l'ensemble de nos travaux et ceux d'autres équipes (Diano, 2013; Drougard *et al.*, 2015; Gyengesi *et al.*, 2012; Horvath *et al.*, 2009; Leloup *et al.*, 2011) montrent que la voie de signalisation du glucose nécessite la présence des mROS pour la transduction



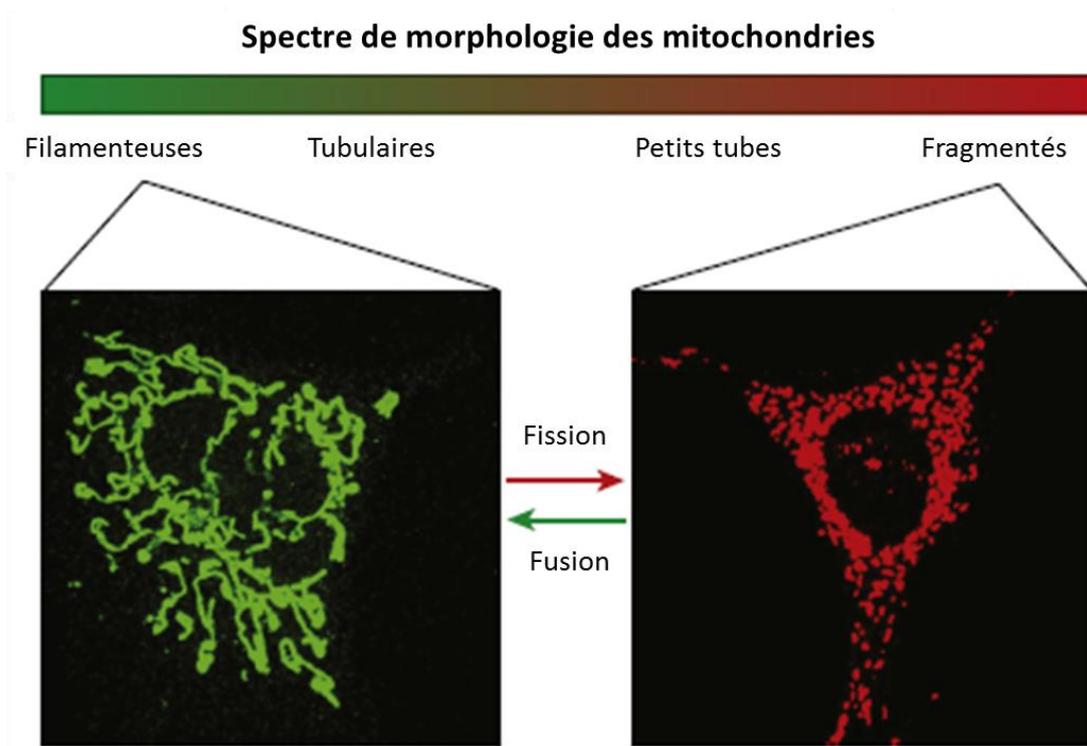
d'une réponse adaptée, et que ces signaux sont d'une importance clé pour la détection d'une élévation du flux de nutriments. Il a aussi été montré l'importance de la production de mROS dans le métabolisme des lipides, une hypertriglycéridémie aigue entraînant une production de ROS spécifiquement dans le MBH. L'inhibition de cette production par des antioxydants engendre en effet une absence d'inhibition de la PA par les lipides, montrant l'importance du rôle des ROS dans la transmission du signal satiétogène (Benani *et al.*, 2007).

## ii) Stress oxydatif et pathologies métaboliques

Les ROS sont très souvent étudiés pour leurs effets délétères dans le vieillissement ou encore les maladies neurodégénératives. Mais il existe aussi une large littérature montrant l'implication des ROS et de l'homéostasie redox dans les pathologies métaboliques, comme l'obésité et l'insulino-résistance (Gardès-albert *et al.*, 2003; Giacco and Brownlee, 2010; Pitocco *et al.*, 2010). Le stress oxydatif a été identifié comme un symptôme majeur des complications liées à l'hyperglycémie dans le cas du diabète. En effet, une augmentation de la production de ROS est observée lors d'une hyperglycémie, provoquée par les concentrations anormalement élevées de glucose dans l'organisme, entraînant un déséquilibre de l'état redox.

Un équilibre très fin existe entre la production de ROS, l'état redox tissulaire et une signalisation adéquate. Par exemple, la délétion spécifique de la SOD2 dans les neurones chez la souris conduit à une altération de la régulation centrale de l'homéostasie énergétique, résultant de l'accumulation de ROS induisant de sévères lésions cérébrales (Maity-Kumar *et al.*, 2015). A l'inverse, la surexpression de la glutathion peroxydase, qui entraîne un état cellulaire anormalement réduit, conduit à une insulino-résistance, une leptino-résistance puis une obésité (McClung *et al.*, 2004). Ces effets semblent être dus aux modifications de phosphorylation des tyrosines kinases du récepteur à l'insuline et de la voie PI3K/AKT dans le foie et le muscle, phosphorylations qui sont normalement en partie inhibées par l'activation de phosphatases redox-sensibles.

La production de mROS par de fortes concentrations chroniques en glucose active aussi des voies de signalisation dites de stress : NFκB (Nishikawa *et al.*, 2000), p38MAPK (Dunlop and Muggli, 2000) et JNK (Ho *et al.*, 2000). De nombreux résultats montrent que l'activation de ces voies de signalisation pourrait être impliquée dans le développement de l'insulino-résistance et du dysfonctionnement des cellules β (Evans *et al.*, 2003). Le



**Figure 24 Variation de la morphologie des mitochondries**

*La morphologie des mitochondries peut varier significativement selon les stimuli environnementaux. Le réseau mitochondrial apparaît hyper-fusionné (vert) ou fragmenté (rouge) (d'après Wai and Langer, 2016).*

lien entre la surproduction de ROS et le développement d'une insulino-résistance a aussi été montré par d'autres études (Henriksen *et al.*, 2011; Mahjoub and Masrou-Roudsari, 2012; Rains and Jain, 2011).

Le rôle d'une production contrôlée de mROS apparaît donc indispensable dans la régulation du métabolisme énergétique. Un lien entre la concentration de glucose, la morphologie des mitochondries et la production de ROS a secondairement été mis en évidence dans une étude *in vitro* sur des hépatocytes et des myocytes (Yu *et al.*, 2006). Ces données nous ont alors suggéré que les cellules hypothalamiques, sensibles au statut énergétique, pouvaient également présenter une production de ROS en réponse au glucose. Cette réponse serait alors dépendante d'une modification de la morphologie des mitochondries, elle-même étroitement contrôlée par un mécanisme précis : la dynamique mitochondriale.

### 3) La dynamique mitochondriale

Les premières observations des mitochondries ont montré une grande hétérogénéité de leur morphologie (**Figure 24**). Grâce aux avancés de la technique de microscopie au début du 20<sup>e</sup> siècle, les changements dynamiques de la forme des mitochondries ont été observés dans les cellules vivantes (Lewis and Lewis, 1914). Au début des années 1990, la mise au point de sondes fluorescentes ciblant spécifiquement les mitochondries (grâce à leur  $\Delta\psi_m$  négatif spécifique) ont permis la visualisation des mouvements mitochondriaux dans différents types cellulaires (Bereiter-Hahn and Vöth, 1994; Cortese, 1998; Nunnari *et al.*, 1997). Deux expériences très intéressantes chez la levure ont été réalisées par l'équipe de Jodi Nunnari. Tout d'abord, deux lots de cellules ont été cultivés dans deux milieux différents, l'un contenant la sonde « mito-GFP » visible dans le vert, et l'autre contenant « TMR-CH<sub>2</sub>Cl », un mitotracker visible dans le rouge. Ces sondes marquent spécifiquement la matrice mitochondriale. Les cellules issues des deux cultures ont ensuite été fusionnées entre elles, permettant aux mitochondries contenant les deux marquages de se retrouver dans les mêmes cellules. Ainsi, après fusion des cellules, les marqueurs protéiques des membranes mitochondriales sont mélangés dans toutes les mitochondries. Cette expérience démontre ainsi l'existence de la fusion mitochondriale ayant permis l'échange de parties de membranes mitochondriales. De façon intéressante, la même expérience a été réalisée avec des



mitochondries marquées avec du BrdU dirigé spécifiquement sur l'ADNmt. Les cellules contenant ces mitochondries ont été fusionnées avec des cellules contenant les mitochondries marquées uniquement avec le « TMR-CH<sub>2</sub>Cl ». Les résultats montrent que l'ADNmt marqué reste distinctement localisé dans les mitochondries, ce qui montre qu'il existe une ségrégation non aléatoire du matériel génétique des mitochondries (Nunnari *et al.*, 1997). Plus récemment, des mitochondries contenant, dans leur matrice, une protéine GFP photo-activable ont pu être observées. Cette approche a permis, en temps réel, d'observer la dynamique mitochondriale via la propagation de l'activation de la protéine GFP, mais aussi l'évolution du  $\Delta\psi$  de ces mitochondries. Il apparaît ainsi que les mitochondries ne forment pas un mais plusieurs réseaux distincts, différents par un  $\Delta\psi_m$  particulier. De plus, les mitochondries situées à l'extérieur du réseau mitochondrial possèdent les  $\Delta\psi_m$  les plus faibles et sont plus sujettes à la fission mitochondriale, signes de l'initiation de la mitophagie (Molina and Shirihai, 2009; Twig *et al.*, 2006).

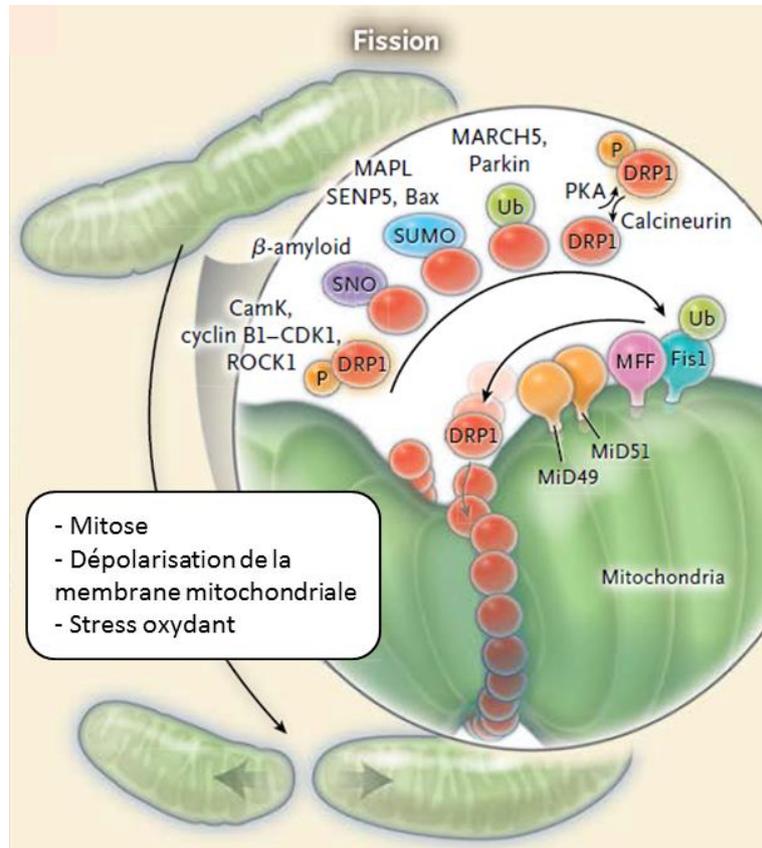
Ces études ont permis de démontrer que la dynamique mitochondriale correspond aux déplacements des mitochondries, mais surtout aux changements de morphologie des mitochondries, contrôlés par les événements de fusion et de fission, aboutissant respectivement à la formation d'un réseau mitochondrial tubulaire ou fragmenté (**Figure 24**) (Hoppins *et al.*, 2007).

### a) Les acteurs de la dynamique mitochondriale

Suite à la découverte de la dynamique mitochondriale, les gènes participants à la fusion et la fission de ces organelles ont été rapidement identifiés chez la levure (Yaffe, 1999). La plupart des acteurs de la dynamique mitochondriale sont des GTPases de la famille des dynamines, hautement conservées chez les eucaryotes au cours de l'évolution (Praefcke and McMahon, 2004). Certaines de ces protéines sont spécifiques aux mitochondries mais d'autres participent plus généralement à la dynamique des organelles et autres vésicules dans la cellule, comme le RE ou les peroxysomes (Pitts *et al.*, 1999; Schrader, 2006).

#### i) La fission mitochondriale

La fission mitochondriale est la division d'une mitochondrie en deux. La protéine DRP1 (Dynamain Related Protein 1) joue un rôle clé dans le processus de fission des mitochondries (Pitts *et al.*, 1999; Smirnova *et al.*, 2001). Cette protéine cytoplasmique



**Figure 25 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la fission mitochondriale**

La fission mitochondriale nécessite l'activation de DRP1 qui permet le recrutement de cette protéine cytoplasmique à la membrane externe de la mitochondrie. Cet adressage est guidé par les protéines cibles situées sur la membrane externe : MFF (mitochondrial fission factor) et FIS1 (mitochondrial fission protein 1) s'agrègent dans un microenvironnement formé par le réticulum endoplasmique. L'activation de DRP1 reflète de nombreuses modifications post- traductionnelles par des kinases, phosphatases ou ubiquitine ligases, ou par l'altération de sumoylation. Par exemple, CamK (calcium-calmodulin-dependent kinase) et cyclin B1-CDK1 phosphorylent et active DRP1. Le NO active DRP1 par nitrosylation. SUMO (small ubiquitin-like modifier) et SENP5 (sentrin-specific peptidase 5) activent DRP1 par désomoylation. MARCH5 (Membrane-associated RING-CH protein 5) et parkin sont des ubiquitines ligases qui régulent l'activation et la dégradation de DRP1. MiD49 et Mi51, qui sont des protéines de la dynamique mitochondriale de respectivement 49 et 51 kDa, sont localisées sur la membrane externe de la mitochondrie et permettent la formation d'un anneau de constriction autour de la mitochondrie. La PKA (Protein kinase A) phosphoryle DRP1 sur la serine 637 ce qui l'inactive, alors que la calcineurine déphosphoryle cette sérine et active DRP1. Les mitochondries qui résultent de la fission apparaissent plus petites que la mitochondrie originale (d'après Archer, 2013).

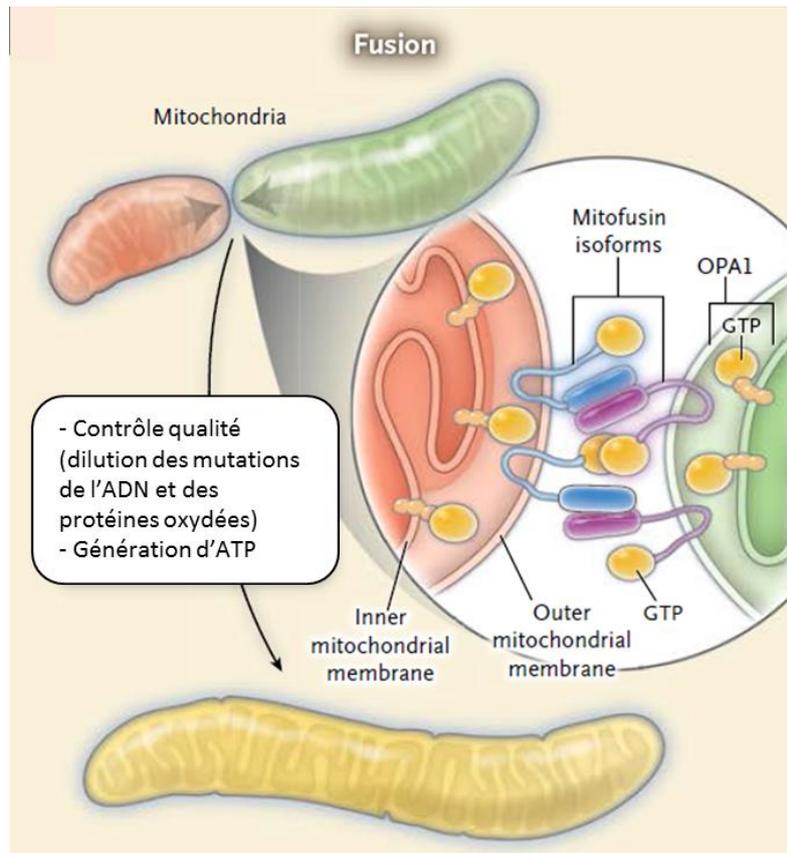
est recrutée à la membrane externe afin d'initier la division de la mitochondrie. DRP1 interagit alors avec les protéines de fission (FIS1, MFF, MiD49 et MiD51), qui servent de protéines d'ancrage à DRP1 (Yoon *et al.*, 2003). Ainsi, les protéines DRP1 s'assemblent en anneau autour de la mitochondrie cible et l'hydrolyse du GTP induit sa division. DRP1 est régulé par de nombreuses modifications post-traductionnelles comme la S-nitrosylation, la sumoylation, l'ubiquitination et la phosphorylation/déphosphorylation des résidus sérines, régulant ainsi le recrutement de DRP1 à la mitochondrie (**Figure 25**) (Archer, 2013; Hoppins *et al.*, 2007; Liesa *et al.*, 2009).

La délétion homozygote de DRP1 cause des altérations de développement du foie et du cœur, une apoptose accrue des neurones corticaux et une déficience de la formation des synapses chez l'embryon de souris, induisant leur mort précoce. DRP1 est donc essentiel pour le développement embryonnaire (Ishihara *et al.*, 2009). Chez l'Homme, la mutation de DRP1 est responsable d'une microcéphalie congénitale, une acidose lactique et finalement une mort soudaine (Waterham *et al.*, 2007). Une augmentation du taux de DRP1 ne semble pas induire la fission mitochondriale alors qu'une augmentation du taux de FIS1 induit une fragmentation des mitochondries, montrant que FIS1 est le facteur limitant de ce mécanisme (Stojanovski *et al.*, 2004).

## ii) La fusion mitochondriale

Inversement à la fission, la fusion mitochondriale est l'union de deux mitochondries, mais comme la fission, la fusion est indispensable pour le bon fonctionnement de la cellule (Mouli *et al.*, 2009). La fusion mitochondriale se fait en deux étapes : tout d'abord la fusion des membranes externes grâce aux mitofusines 1 et 2 (MFN1 et MFN2) qui vont favoriser le rapprochement de deux mitochondries (Rojo *et al.*, 2002). Vient ensuite la fusion des membranes internes via la protéine OPA1 (Optic Atrophy 1) (**Figure 26**) (Griffin *et al.*, 2006; Hoppins *et al.*, 2007; Liesa *et al.*, 2009; Zorzano *et al.*, 2010). Ces protéines subissent elles aussi des modifications post traductionnelles telles que des ubiquitinations ou désacétylations, régulant ainsi leur activité GTPases.

La délétion homozygote de MFN1, MFN2 ou OPA1 est létale chez l'embryon de souris (Chen *et al.*, 2003; Davies *et al.*, 2007). Cependant, la mutation de ces gènes conduit au développement de maladies génétiques, telles que le syndrome de Charcot-Marie-Tooth (mutation de MFN2) caractérisé par une grave atrophie musculaire (Züchner *et al.*, 2004), ou encore l'atrophie optique autosomique dominante (mutation



**Figure 26 Mécanismes moléculaires impliqués dans la fusion mitochondriale**

La fusion mitochondriale nécessite une coordination des mitofusines situées sur la membrane externe et de la protéine OPA1 située sur la membrane interne. La fusion de deux mitochondries contenant des protéines matricielles marquées par une fluorescence rouge ou verte donneront une mitochondrie allongée qui apparaîtra jaune, par le mélange des deux matrices (d'après Archer, 2013).

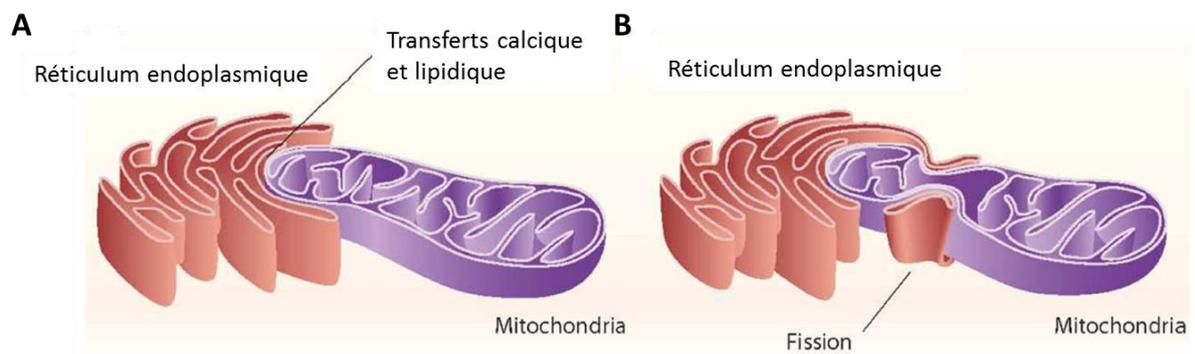
de OPA1) caractérisée par une dégénération bilatérale du nerf optique (Lenaers *et al.*, 2012).

### **b) Les principales fonctions de la dynamique mitochondriale**

La dynamique mitochondriale est un processus indispensable pour le fonctionnement normal de la cellule. Elle va tout d'abord permettre une distribution adéquate des mitochondries dans les cellules, via leur mobilité. Cet aspect est particulièrement important dans les neurones qui possèdent des prolongements où les besoins énergétiques doivent être rapidement satisfaits (dans les dendrites et au niveau des synapses notamment) (Ligon and Steward, 2000). Les événements de fusion et de fission vont ainsi permettre un échange rapide de matériels protéiques et lipidiques avec les mitochondries éloignées du corps cellulaire (où se situe la mitogenèse (Davis, 1996)) leur permettant d'être parfaitement fonctionnelles, et limitant les mouvements mitochondriaux le long du cytosquelette, qui sont coûteux en énergie (Boldogh and Pon, 2007; Hollenbeck and Saxton, 2005).

Ces échanges permettent aussi aux mitochondries de compenser des défauts fonctionnels. En effet, le stress oxydatif généré par la chaîne respiratoire conduit parfois à l'apparition de mutations de l'ADNmt, aboutissant à un mélange de mitochondries saines et altérées dans une même cellule. Les mitochondries contenant de l'ADN altéré peuvent alors fusionner avec les mitochondries saines voisines afin de partager des ARN de transfert, des ARN ribosomiaux et/ou des protéines nécessaires à sa réparation (puisque nous avons vu que l'échange d'ADN n'était pas possible) (Nakada *et al.*, 2001; Yoneda *et al.*, 1994).

La dynamique mitochondriale permet aussi un échange lipidique permettant une réorganisation membranaire, et notamment des crêtes mitochondriales de la membrane interne. La fusion va alors permettre le rapprochement plus ou moins efficace des complexes de la chaîne respiratoire afin de moduler l'efficacité des capacités oxydatives de la mitochondrie quand cela est nécessaire. Le réarrangement spatial des complexes de la chaîne respiratoire aboutit alors à la formation de super-complexes (Acín-Pérez *et al.*, 2008; Cogliati *et al.*, 2013, 2016; Mishra *et al.*, 2014; Schäfer *et al.*, 2006).



**Figure 27 : Interaction mitochondrie-réticulum endoplasmique**

(A) Le réticulum endoplasmique interagit avec les mitochondries afin de permettre le transfert de calcium et de phospholipides entre ces organelles. (B) Cette interaction définit le site de fission mitochondriale (d'après Zorzano and Claret, 2015).

Les autres fonctions de la dynamique mitochondriale sont aussi d'orienter les mitochondries endommagées vers la mitophagie (Kim *et al.*, 2007; Shirihai *et al.*, 2015; Twig and Shirihai, 2011), de transmettre des mitochondries aux cellules filles pendant la mitose et de participer à la régulation de l'apoptose (Lin *et al.*, 2013; Sheridan and Martin, 2010).

### c) La régulation de la dynamique mitochondriale

La morphologie du réseau mitochondrial est différente selon le type cellulaire étudié. En effet, dans de nombreuses cellules comme les neurones ou les cellules du pancréas, la dynamique mitochondriale inclut, en plus de la fission et la fusion, de petits mouvements oscillatoires ainsi que de grands déplacements, et la formation d'un long réseau. Inversement, dans les cardiomyocytes ou les cellules du muscle squelettique, les mitochondries apparaissent plutôt fixes, et distribuées de façon régulière. Ces variations seraient spécifiques de la fonction et des besoins de chaque type cellulaire (Kuznetsov *et al.*, 2009).

De manière générale, la fission et la fusion mitochondriales se produisent à une fréquence relativement égale. Une modification de la morphologie du réseau résulte ainsi de l'augmentation d'une des deux forces et/ou la diminution de l'autre force. Par exemple, un réseau mitochondrial tubulaire résulte de l'augmentation des forces de fusion et/ou la diminution des forces de fission. Ainsi, l'augmentation de la fusion mitochondriale augmente la probabilité que la fission se produise et l'augmentation de la fission augmente la probabilité que la fusion se produise, maintenant la morphologie du réseau par un simple contrôle en feedback (Yoon *et al.*, 2011).

La dynamique mitochondriale est étroitement liée au RE. Ces contacts, observables au microscope électronique, sont un lieu d'échange de phospholipides entre ces organelles, et permettent aussi le maintien du métabolisme calcique mitochondrial (**Figure 27A**). L'association des mitochondries avec le RE forme les « mitochondria-associated ER membrane » (Giorgi *et al.*, 2009; Raturi and Simmen, 2013; Zorzano and Claret, 2015). Les mitofusines ont aussi un rôle important dans le maintien de la morphologie du RE et sont responsables du contact mitochondrie-RE (de Brito and Scorrano, 2008). Le site de contact de ces deux organelles définit aussi le site où s'agrègent les protéines de fission mitochondriale et par conséquent où sera adressée DRP1 par la suite (Friedman *et al.*, 2011) (**Figure 27B**).



Les recherches actuelles étudient l'existence de relations entre la forme des mitochondries et leurs fonctions. Une morphologie anormale des mitochondries, par exemple via un contrôle en feedback défaillant, est souvent associée à une pathologie. Ainsi, une dynamique mitochondriale anormale chez l'Homme a été montrée comme impliquée, entre autres, dans l'hypertension artérielle pulmonaire (Marsboom *et al.*, 2012; Ryan *et al.*, 2015), le cancer du poumon (Chiang *et al.*, 2009; Rehman *et al.*, 2012) ainsi que dans les maladies neurodégénératives telles que Parkinson, Alzheimer et Huntington (Burté *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2015; Duboff *et al.*, 2013; Knott *et al.*, 2008; Simcox *et al.*, 2013).

Depuis une dizaine d'années, de nombreux travaux ont également mis en évidence l'existence d'altérations de la dynamique mitochondriale dans le cas de pathologies métaboliques (Bach *et al.*, 2003; Liesa and Shirihai, 2013; Putti *et al.*, 2015; Yoon *et al.*, 2011; Zorzano *et al.*, 2009). De par le rôle important des mitochondries dans la régulation de l'homéostasie énergétique, il paraît en effet évident qu'un défaut de leur métabolisme va être fortement impliqué dans les maladies telles que l'obésité et le diabète.

#### **d) Dynamique mitochondriale et homéostasie énergétique**

De récentes études montrent qu'il existe un lien entre les apports et demandes énergétiques de la cellule et les changements dans la morphologie et le nombre de mitochondries, et ce dans différents types cellulaires ou tissus. Dans la cellule  $\beta$  pancréatique, la dynamique mitochondriale est modifiée en fonction de la disponibilité des AG et du glucose. Il a en effet été montré que les cellules  $\beta$  présentent un réseau mitochondrial fragmenté chez les modèles animaux diabétiques ainsi que chez les patients, principalement dû à une diminution de la fusion mitochondriale. Inversement, en cas de privation, les mitochondries apparaissent fusionnées. Cependant, ces études montrent que la perturbation de la dynamique mitochondriale, que ce soit une augmentation de la fragmentation ou de la fusion, altère la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Molina *et al.*, 2009; Mulder and Ling, 2009; Stiles and Shirihai, 2012).

Une fission mitochondriale aberrante, induite par l'exposition excessive au palmitate dans les cellules musculaires squelettiques, induit une augmentation du stress oxydatif, la dépolarisation des mitochondries ainsi qu'une diminution de la production



d'ATP, associés à une résistance à l'insuline (Jheng *et al.*, 2012). De même, l'inhibition de MFN2 dans les fibres musculaires ou dans le foie résulte en la fragmentation du réseau mitochondrial, l'altération du métabolisme mitochondrial via la réduction du  $\Delta\psi_m$  et une diminution de l'oxydation du glucose associée à une résistance à l'insuline (Bach *et al.*, 2003; Sebastián *et al.*, 2012). L'ensemble de ces conséquences sont principalement causées par le stress du RE et l'augmentation de la production de ROS (Molina *et al.*, 2009; Ozcan *et al.*, 2004).

Plusieurs études ont montré l'implication de la dynamique mitochondriale dans la production de mROS en réponse à une hyperglycémie. Ainsi, une exposition aigüe de lignées cellulaires (hépatocytes et myocytes) à une concentration élevée en glucose (25 ou 50 mM) induit une augmentation de la concentration de ROS dans un délai de 15min, avec un retour à la normale en 60min. Cette production de ROS est accompagnée d'une fragmentation mitochondriale marquée, et un retour à la morphologie basale selon la même cinétique que la production de ROS observées dans les mêmes conditions (Yu *et al.*, 2006). L'inhibition de la fission mitochondriale par la mutation de protéine DRP1, ou l'augmentation de la fusion par la surexpression de MFN2, empêche la production de ROS en réponse à une concentration élevée en glucose. Cette étude montre que les modifications morphologiques des mitochondries sont nécessaires à la production de ROS lors d'une stimulation hyperglycémique, et permet de suggérer un rôle régulateur de la dynamique mitochondriale (Yu *et al.*, 2006).

Une autre étude a également montré, sur une culture de cellule INS1, que l'inhibition de l'expression de FIS1 diminue la production de ROS et la sécrétion d'insuline lors d'une forte stimulation par du glucose (22 mM), dû à l'accumulation de protéines oxydées, à une respiration mitochondriale diminuée et à l'inhibition de la mitophagie (Twig *et al.*, 2008). Cependant, les mécanismes mis en jeu lors des changements morphologiques des mitochondries et qui modifient la bioénergétique mitochondriale responsable de la production de ROS restent à élucider. Lors d'une hyperglycémie, la fragmentation mitochondriale est donc réversible, suggérant un processus physiologique permettant une signalisation redox, la fission mitochondriale facilitant la production de ROS. Le retour à une morphologie basale par re-fusion de mitochondries et/ou ralentissement de la fission permettrait de maintenir une concentration de ROS non délétère (Twig *et al.*, 2008).



Les modifications de la morphologie mitochondriale ainsi observées, lors d'une forte concentration de glucose, semble être une réponse cellulaire adaptée lors d'une augmentation de la quantité de substrats énergétiques. Leur utilisation serait ainsi facilitée grâce aux modifications dynamiques de la structure interne des mitochondries, qui ont été montrées comme étroitement associées à l'état fonctionnel des mitochondries (Mannella, 2006). Ainsi, un aspect condensé des crêtes internes de la mitochondrie ralentit le transport d'ADP à travers la membrane interne, visualisé lors d'un excès d'ADP dans les hépatocytes. A l'inverse, lorsque la concentration en ADP est limitante, les crêtes mitochondriales apparaissent décondensées et permettent une production plus efficace d'ATP (Mannella, 2006). Le lien entre la disposition des crêtes de la membrane interne de la mitochondrie et l'efficacité de la respiration mitochondriale est que la forme de ces crêtes détermine l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire, en formant des super-complexes, permettant d'augmenter l'efficacité de la production d'ATP selon l'état énergétique (Cogliati *et al.*, 2013). Les modifications morphologiques des mitochondries lors d'une hyperglycémie modifieraient l'organisation des complexes de la chaîne respiratoire, et conduiraient à une modification de son activité ou de son couplage à la synthèse d'ATP. Ainsi, lors d'une fragmentation mitochondriale induite par une hyperglycémie, les modifications des flux métaboliques, de l'organisation des complexes de la chaîne respiratoire, de l'efficacité de la phosphorylation oxydative, et de la fluidité membranaire seraient des événements possibles pouvant conduire à une augmentation de la production de ROS (Men *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2008).

En cas de complications pathologiques, il est difficile de savoir si la fission mitochondriale est induite par la production de ROS, ou inversement. Dans les neurones, l'inhibition du complexe II induit une production de ROS et la fragmentation des mitochondries. Un traitement avec un antioxydant, la N-Acétyl-L-Cystéine, diminue la fission dans ces conditions, indiquant que les ROS seraient dans ce cas responsables de la fragmentation des mitochondries (Liot *et al.*, 2009). De la même façon, l'augmentation du stress oxydatif sur une culture de cellules endothéliales ou de neurones, provoque la fission mitochondriale de façon transitoire et dépendante de DRP1 (Barsoum *et al.*, 2006; Jendrach *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'incubation d'une culture de cellules  $\beta$  ou de cardiomyocytes avec une forte concentration de glucose induit la fission mitochondriale et la production de ROS. Ces effets sont bloqués par la mutation du gène de DRP1



(Men *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2008). Ces études rapportent donc que le blocage de la fission mitochondriale inhibe la production de ROS normalement induite par une hyperglycémie, suggérant que la fragmentation des mitochondries lors d'une hyperglycémie est nécessaire à la production de ROS.

### **e) Dynamique mitochondriale, détection centrale de l'hyperglycémie et production de ROS**

Récemment, notre équipe a montré que la fission mitochondriale joue un rôle important dans la détection hypothalamique du glucose. Ainsi, une injection intracarotidienne de glucose vers le cerveau (9 mg/kg ; 100µl en 30s) induit la translocation de DRP1 à la mitochondrie dans l'hypothalamus, de façon concomitante à la production de ROS observée dans les mêmes conditions. L'inhibition de DRP1 par l'injection ICV d'ARN interférents (réduisant de plus de 75% l'expression de la protéine) inhibe la production de ROS et le pic de sécrétion d'insuline normalement induit par le glucose ainsi injecté. Ces animaux présentent aussi une diminution de la respiration mitochondriale, ainsi qu'une forte diminution de l'effet satiétogène du glucose (Carneiro *et al.*, 2012). Ces résultats montrent l'importance de la dynamique mitochondriale dans la détection hypothalamique du glucose et la régulation centrale de l'homéostasie énergétique. Il est cependant difficile de déterminer *in vivo* le type cellulaire mis en jeu dans ce mécanisme (astrocytes et/ou neurones).

### **f) La dynamique mitochondriale et la régulation hypothalamique de l'homéostasie énergétique**

Les neurones NPY/AgRP et les neurones POMC, de par leur fonction opposée en ce qui concerne le contrôle de la PA (faim versus satiété), présentent des états d'activations opposés. Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces activations réciproques ne sont pas encore parfaitement connus, mais ces dernières années, des avancées ont été faites concernant la dynamique mitochondriale.

#### **i) Les neurones NPY-AgRP**

Une balance énergétique négative (pendant un jeûne par exemple) augmente l'aspect fragmenté du réseau mitochondrial dans les neurones NPY/AgRP



(mitochondries sphériques), alors que la PA ou la suralimentation induit la formation d'un réseau mitochondrial tubulaire (mitochondries allongées) (Dietrich *et al.*, 2013; Minokoshi *et al.*, 2004). La régulation de la fusion mitochondriale par MFN1 et MFN2 est fondamentale pour l'activation des neurones NPY-AgRP après une exposition à un régime HFD. En effet, l'exposition à un régime HFD chez la souris conduit à la fusion des mitochondries dans les neurones NPY/AgRP, aboutissant à une élévation paradoxale de l'activité électrique de ces neurones orexigènes, bien que les niveaux de glycémie et leptinémie soient élevés. Ces effets sont réversés si MFN1 ou MFN2 sont spécifiquement délétés dans les neurones NPY/AgRP (Dietrich *et al.*, 2013). Ces résultats suggèrent que la dynamique mitochondriale participe à la régulation de l'activité neuronale dans un modèle de souris nourries avec un régime HFD.

Les observations décrites ci-dessus ont fourni de nouvelles informations sur les mécanismes par lesquels les neurones NPY/AgRP répondent aux différents états métaboliques. Cependant, les différences dans les mécanismes qui interviennent dans l'activation des neurones NPY/AgRP pendant le jeûne (un processus supporté par la fission mitochondriale) et la suralimentation (qui repose sur la fusion mitochondriale) n'ont pas encore été élucidées. Une hypothèse est que les neurones NPY/AgRP se transforment en un phénotype POMC lors de l'exposition à un HFD (Nasrallah and Horvath, 2014).

## ii) Les neurones POMC

L'inhibition spécifique de MFN1 dans les neurones POMC n'entraîne pas de phénotype métabolique particulier, suggérant que MFN1 n'est pas essentielle pour les fonctions de ces neurones. Toutefois, l'inhibition spécifique de MFN2 dans les neurones POMC, chez des animaux nourris avec un régime standard entraîne une diminution des contacts mitochondries-ER, une diminution de l'expression de  $\alpha$ -MSH et le développement d'une obésité morbide (Schneeberger *et al.*, 2013). De plus, les souris nourries avec un régime HFD présentent une diminution de l'expression de MFN2 ainsi qu'une réduction des interactions RE-mitochondries dans les neurones POMC. La fonction prédominante de MFN2 dans les neurones POMC, outre la fusion mitochondriale, est de faciliter les interactions RE-mitochondries (Schneeberger *et al.*, 2013). L'absence de MFN2 dans les neurones à POMC conduit à une augmentation de l'expression des marqueurs de stress du RE, induisant une résistance à la leptine.



La double fonction de MFN2 (fusion mitochondriale et contacts mitochondries-RE) suggère que cette protéine a un rôle important dans la coordination entre les fonctions du RE et de la mitochondrie afin de promouvoir l'utilisation correcte des nutriments par les neurones POMC et NPY/AgRP. Le fait que ces interactions ne soient pas compromises dans les neurones NPY/AgRP en absence de MFN2 suggère que cette protéine à une fonction spécifique pour chaque type cellulaire (Dietrich *et al.*, 2013).



# Objectifs

---

Les travaux de notre équipe se portent tout particulièrement sur les mécanismes physiologiques impliqués dans la détection hypothalamique du glucose, processus indispensable dans la régulation de l'homéostasie énergétique, en particulier glucidique. Lors d'une hyperglycémie, cette détection permet le déclenchement de réponses nerveuses périphériques permettant la régulation à court terme de la glycémie, telles que la sécrétion d'insuline, l'inhibition de la production hépatique de glucose, ou encore le contrôle de la prise alimentaire. Ces mécanismes sont de plus en plus étudiés, et il apparaît maintenant bien établi qu'une altération de la détection centrale de l'hyperglycémie est étroitement liée au développement de pathologies métaboliques.

Au cours de ces dix dernières années, notre équipe a mis en évidence que la détection d'une augmentation de la concentration de glucose au niveau hypothalamique entraînait une activation électrique des neurones du NA, responsable d'une sécrétion rapide d'insuline en périphérie. Cette détection fait intervenir une voie de signalisation redox, impliquant la production de mROS dans l'hypothalamus (Leloup *et al.*, 2006), qui a également été montrée dans un autre site sensible aux variations de glucose, la cellule  $\beta$  du pancréas (Leloup *et al.*, 2009; Pi *et al.*, 2007).

L'importance de cette production de mROS a aussi été mise en évidence dans le modèle de rat Zucker, obèse et insulino-résistant, pour lequel on observe une hypersensibilité hypothalamique au glucose. Celle-ci se traduit par le déclenchement d'une activation électrique du NA et d'une sécrétion d'insuline pour une dose cérébrale de glucose normalement sans effet chez des rats non obèses. Cette hypersensibilité au glucose est aussi associée à un déséquilibre redox, une production hypothalamique de mROS anormalement élevée associée à un stress oxydant et une augmentation des capacités respiratoires mitochondriales (Colombani *et al.*, 2009). Ces travaux montrent ainsi l'importance de la production de mROS en réponse à l'hyperglycémie mais aussi la nécessité d'un état redox équilibré.

En parallèle, de nombreuses études ont mis en évidence l'existence d'une étroite relation entre la morphologie mitochondriale et la production de mROS. Ainsi, il a été démontré, *in vitro*, que l'hyperglycémie déclenchait la fragmentation des mitochondries de cellules sensibles au statut métabolique, une augmentation de la respiration



mitochondriale et une production de mROS. L'inhibition de la fission mitochondriale bloque ces effets (Yu *et al.*, 2006). Notre équipe a également pu mettre en évidence, *in vivo*, que l'hyperglycémie cérébrale déclenchait les mécanismes impliqués dans la fission mitochondriale dans l'hypothalamus (via l'adressage de DRP1 à la mitochondrie), et que l'inhibition de ce processus altère la respiration mitochondriale et la production de mROS en réponse à l'hyperglycémie (Carneiro *et al.*, 2012). De plus, l'altération de la dynamique mitochondriale dans certaines sous populations neuronales hypothalamiques, impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique, aboutit au développement de pathologies métaboliques (Dietrich *et al.*, 2013; Schneeberger *et al.*, 2013), démontrant ainsi l'importance de l'ensemble de ces mécanismes au niveau hypothalamique pour le maintien du statut énergétique.

Cependant, les études citées précédemment ont consisté à empêcher l'action d'un des acteurs de la dynamique pour en révéler son rôle. Toutefois, la dynamique mitochondriale touchant, entre autres, à la bioénergétique de la cellule, cette approche ne pouvait que révéler son importance. Ce type d'approche ne permet donc pas de révéler spécifiquement si un acteur est impliqué dans un contexte pathologique, si lors de la pathologie elle-même, la dérégulation de cet acteur n'a pas été démontrée comme réellement présente.

Ainsi, l'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier si l'exposition à un régime hypercalorique à court terme (induisant obésité et diabète à long terme) pouvait affecter précocement la détection hypothalamique du glucose, en affectant la dynamique mitochondriale et la signalisation redox. Mon travail s'est ainsi décomposé en trois parties :

- 1) Tout d'abord, mettre en place le modèle d'étude expérimentale où un défaut précoce du contrôle de l'axe hypothalamo-pancréatique en réponse à la stimulation hypothalamique par le glucose soit présent. Pour cela, des rats Wistar mâles ont été exposés à un régime gras enrichi en saccharose (connu pour être obésogène et diabétogène à long terme chez le rongeur), pendant 3, 6 ou 9 semaines, et comparés à des rats témoins, nourris avec un régime standard de laboratoire. Une fois le temps d'exposition au régime défini pour obtenir le phénotype voulu (i.e., un défaut du contrôle nerveux de la sécrétion d'insuline en réponse à la stimulation hypothalamique



par le glucose), les paramètres de la PA, du poids, ainsi que ceux métaboliques et endocriniens de ces animaux ont été caractérisés.

2) La suite de ce travail a été alors de focaliser sur les paramètres mitochondriaux d'intérêt : déterminer si un défaut de la production hypothalamique de mROS était impliqué dans l'altération de la détection hypothalamique du glucose observée chez ces rats, et si oui, d'étudier plus particulièrement si un défaut de la dynamique mitochondriale était présent. Notre hypothèse était, compte tenu des résultats préliminaires dans l'équipe, que l'adressage de DRP1 en réponse au glucose était modifié. Cette partie impliquait alors de disséquer plus finement les désordres mitochondriaux induits (caractéristiques d'OXPPOS) et l'équilibre redox.

3) Enfin, le dernier objectif était, dans le cas où l'adressage de DRP1 en réponse au glucose soit effectivement altéré, d'améliorer cet adressage pour observer si les désordres présents chez l'animal soumis à un régime hypercalorique sur un temps court pouvaient être réversés.

<b>Régime STD</b>		<b>Régime HFHS</b>	
<b>Protéines</b>	16,7 %	Protéines	15,5 %
<b>Glucides</b>	60,9 %	Glucides	38,4 %
<b>Lipides</b>	22,4 %	Lipides	46,1 %
<b>2 900 kcal/kg</b>		<b>4 397 kcal/kg</b>	

Tableau 1 : Composition centésimale et apport calorique total des régimes STD et HFHS utilisés pour les expérimentations

# Partie 1 : Mise en place du modèle expérimental

---

## 1) Approches méthodologiques

### a) Animaux et régime alimentaire

Des rats Wistar Han mâles, âgés de 5 semaines (Charles River) ont été hébergés dans un environnement contrôlé (cycle jour/nuit de 12h avec lumière à 7h, 22±1°C, 50±5 % d'humidité) avec un accès *ad libitum* à l'eau et la nourriture. Un temps d'acclimatation minimum d'une semaine a été laissé aux animaux afin qu'ils s'habituent à leur nouvel environnement avant le début des expériences.

Dans le but d'induire le développement d'un syndrome métabolique, les animaux ont été exposés à un régime gras enrichi en saccharose (régime HFHS, #HF235, SAFE) et comparés à des rats nourris avec un régime standard de laboratoire (régime STD, #A04, SAFE). Le **tableau 1** rapporte la composition centésimale et la valeur énergétique totale de ces deux régimes.

Le poids et la PA ont été mesurés quotidiennement, 3h après le début de la période de jour. La composition corporelle des animaux a été déterminée à l'aide d'un EchoMRI-700, appareil qui permet d'analyser par résonance magnétique nucléaire le pourcentage de masse grasse et de masse maigre chez un animal éveillé.

Les chirurgies et les tests métaboliques ont été effectués sous anesthésie (pentobarbital sodique, 60 mg/kg de poids corporel [Ceva, 54,7 mg/ml]). Chacune des expériences a été réalisée 4h après retrait de la nourriture, permettant ainsi une bonne homogénéisation des valeurs basales des paramètres métaboliques (nutritionnelles et hormonales).

### b) Test de détection hypothalamique du glucose

Ce test, décrit pour la première fois chez le lapin (Niijima, 1975), a été adapté par notre équipe pour les études chez le rat (Atef *et al.*, 1995; Leloup *et al.*, 1998). L'objectif de ce test est d'induire une hyperglycémie uniquement cérébrale en injectant un bolus de glucose dans l'artère carotide pendant 30s, en direction du cerveau. Cela permet



d'activer l'axe nerveux hypothalamo-pancréatique (via un contrôle vagal), provoquant une sécrétion transitoire d'insuline.

Les rats anesthésiés ont ainsi subi une chirurgie de la carotide, consistant à isoler l'artère carotide afin d'y insérer, en direction du cerveau, un cathéter (#60-011-02, HelixMark, VWR) rempli d'une solution de NaCl héparinée (50 UI/ml, héparine choay 25 000 UI/5 ml). Lorsque la glycémie est stable, une injection intra-carotidienne de glucose (9 mg/kg, 100 µl en 30s) est réalisée et du sang prélevé à la queue avant (T0) puis 1, 3, 5 et 10 min après l'injection de glucose. A la fin de l'expérience, les cerveaux ont été prélevés, les MBH ont été rapidement disséqués puis congelés dans de l'azote liquide pour être ultérieurement analysés par western blot. Les plasmas et échantillons de cerveau ont été stockés à -80°C jusqu'à analyses.

### **c) Capacité sécrétoire des cellules $\beta$ pancréatiques**

La capacité sécrétoire des cellules  $\beta$  pancréatiques a été mesurée par le Dr. Stephan Collins, spécialiste de la cellule  $\beta$  pancréatique, et membre de notre équipe. Les îlots pancréatiques, isolés chez des rats STD et HFHS, ont été placés dans des plaques 96 puits, à raison de 10 îlots par puits, 9 à 12 réplicats par rat, 3 rats par condition. Les îlots ont été pré-incubés pendant 1h dans 250 µl d'un tampon Krebs-Ringer-HEPES (KRH) contenant : 140 mM NaCl, 3,6 mM KCl, 2,6 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 5 mM HEPES (pH 7,4 avec NaOH), 2 mM NaHCO<sub>3</sub> et 2 mM glucose. La solution a été supplémentée avec 0,2% de sérum albumine bovine (BSA). La sécrétion d'insuline en réponse au glucose a été mesurée après 1h d'incubation statique dans le KRH contenant 2, 12 ou 20 mM de glucose. Toutes les incubations ont été réalisées à 37°C dans un environnement humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Après l'heure d'incubation, le surnageant a été prélevé et stocké à -20°C jusqu'à dosage. Pour déterminer le contenu total en insuline, les îlots ont été incubés une nuit à -20°C avec une solution acidifiée d'éthanol (95% éthanol, 5% acide acétique).

### **d) Enregistrements du tonus parasympathique**

L'enregistrement du tonus parasympathique a été réalisé en collaboration avec le Pr. Christophe Magnan et les résultats analysés par le Dr. Céline Cruciani-Guglielmacci, de l'unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative de l'Université Paris Diderot (Magnan *et al.*, 1999; Picard *et al.*, 2013).



La branche thoracique du nerf vague, située le long de l'artère carotide, a été isolée des tissus adjacents sur une distance approximative de 1 cm. Avec précautions, le nerf a été placé entre des électrodes d'enregistrement en argent (diamètre 0,6 mm). Les électrodes ont été connectées à une sonde de forte impédance et les potentiels d'action ont été visualisés et enregistrés sur ordinateur après une amplification initiale via un amplificateur « low-noise » (BIO amplifier, AD Instrument). Après stabilisation de la glycémie, les rats ont reçu un bolus de glucose similaire à celui du test de détection hypothalamique du glucose. L'activité nerveuse a été enregistrée avant, pendant et après l'injection de glucose. Les données ont été digitalisées avec « PowerLab/4sp digitizer ». Les signaux ont été amplifiés 105 fois et filtrés en utilisant un seuil haut et bas compris entre 1 et 30 Hz (Chart 4 computer program).

### e) Imagerie calcique

L'imagerie calcique sur les neurones hypothalamiques fraîchement isolés a été réalisée par Chloé Chrétien, étudiante en thèse dans l'équipe, qui a développé cette approche pendant sa thèse. L'isolement des neurones hypothalamiques (MBH) a été réalisé à partir de cerveau de rats STD ou HFHS âgés de 8 semaines. Les MBH ont été dissociés mécaniquement dans une solution contenant de la papaine à l'aide du kit « neural tissue dissociator » (MACS Miltenyi Biotec). Les cellules hypothalamiques, homogénéisées dans le milieu Neurobasal-A (Invitrogen), ont été placées sur des lamelles recouvertes de poly-L-lysine afin de permettre leur adhérence.

Les cellules ont été chargées avec une sonde calcique fluorescente, Fura-2 (0,5  $\mu\text{M}$  ; # Fura-2/AM ; Molecular Probes) pendant 20 min à 37°C dans une solution tamponnée (tampon Hank's, contenant 25 mM HEPES ; 121 mM NaCl ; 4,7 mM KCl ; 1,2 mM  $\text{MgSO}_4$  ; 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ; 5 mM  $\text{NaHCO}_3$  ; 2 mM  $\text{CaCl}_2$  ; 2,5 mM D-glucose ; pH 7,4).

Les images de la fluorescence de la sonde Fura-2 ont été acquises toutes les 10s en alternant les excitations à 340 et 380 nm. Les changements des niveaux intracellulaires de calcium ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) ont été enregistrés sur des cellules maintenues à 2,5 mM de glucose et en réponse à une augmentation de la concentration de glucose à 10 mM. Les changements de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ont été quantifiés par le calcul de l'aire sous la courbe (AUC) de chaque réponse au glucose avec le logiciel « TiLL Photonics ». Les neurones étaient qualifiés de GE s'ils présentaient une augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en réponse à l'augmentation de la concentration de glucose (de 2,5 à 10 mM) dans les 2 à 20 min



après le traitement, avec une amplitude  $>0,1$  ( $\Delta$ ratio 340/380) et une durée transitoire  $>30s$ . A la fin de chaque enregistrement, l'excitabilité neuronale a été vérifiée en appliquant une dose de 50 mM de KCl, les neurones ne répondant pas à cette dose étaient retirés de l'étude.

### **f) Caractérisation métabolique**

Afin de reproduire les mêmes conditions que dans le test de détection hypothalamique du glucose, les tests de caractérisation métabolique ont été réalisés sur des animaux anesthésiés.

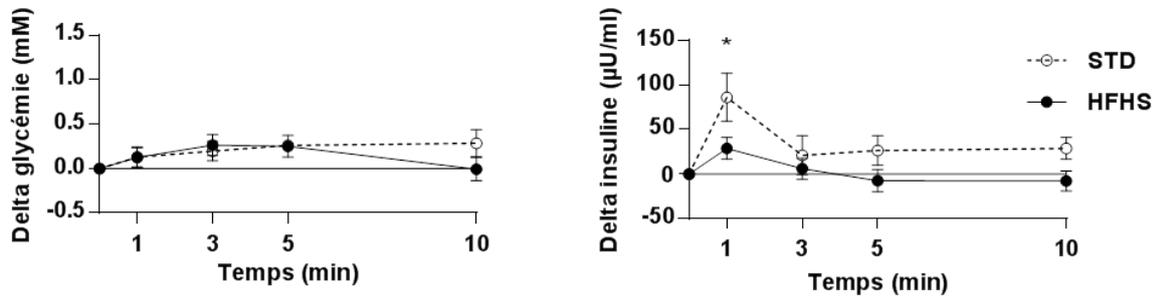
Le test de tolérance au glucose (GTT) a consisté à injecter un bolus de glucose (2 g/kg) par voie sous cutanée (cette voie permet une diffusion homogène et reproductible, comparée à la voie intrapéritonéale). Du sang a été prélevé à la queue toutes les 15 min pendant 1h puis toutes les 30 min pendant 3h afin de mesurer l'hyperglycémie provoquée par l'injection de glucose et la réponse insulinémique des animaux.

Le test de sensibilité à l'insuline (ITT) a consisté à injecter un bolus d'insuline (1 U/kg) par voie sous cutanée. Du sang a été prélevé à la queue toutes les 15 min pendant 1h puis toutes les 30 min pendant 2h afin de mesurer la réponse hypoglycémique des animaux.

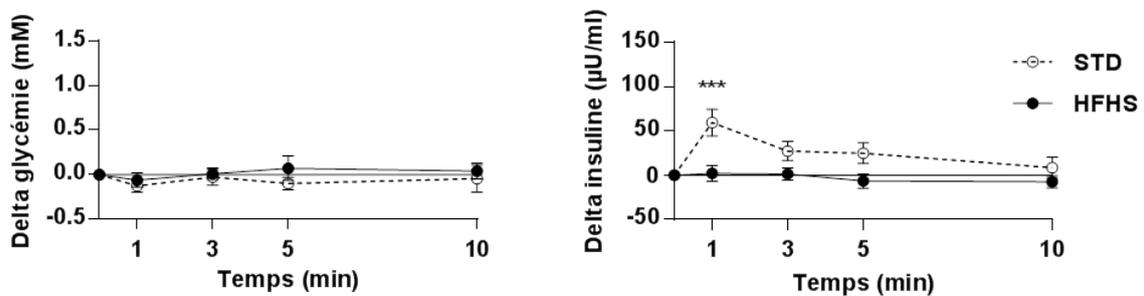
### **g) Dosages sanguins et plasmatiques**

Le sang a été collecté à la queue des animaux. La glycémie a été mesurée à partir d'une goutte de sang avec un lecteur glycémique Performa AccuChek (Roche diagnostics). Pour les dosages d'insuline et de leptine plasmatiques, le plasma a été isolé du sang après centrifugation (5 000 g, 5 min, 4°C) et les dosages ont été réalisés avec un kit ELISA (#80-INSRT, AlpCo pour l'insuline et #RD291001200R, Biovendor pour la leptine, Eurobio). Le dosage plasmatique de la ghréline acylée a été réalisé à l'aide d'un kit ELISA (#RD394062400R, Biovendor, Eurobio) après une préparation particulière des plasmas (protocole fourni par le fournisseur) : le sang a été prélevé dans des tubes contenant de l'EDTA et de l'acide p-hydroxymercuribenzoïque puis a été centrifugé à 3 500 rpm (10 min à 4°C). Du HCl 1M a été immédiatement ajouté aux surnageants puis les échantillons ont été centrifugés à 3 500 rpm (5 min à 4°C). Le dosage des

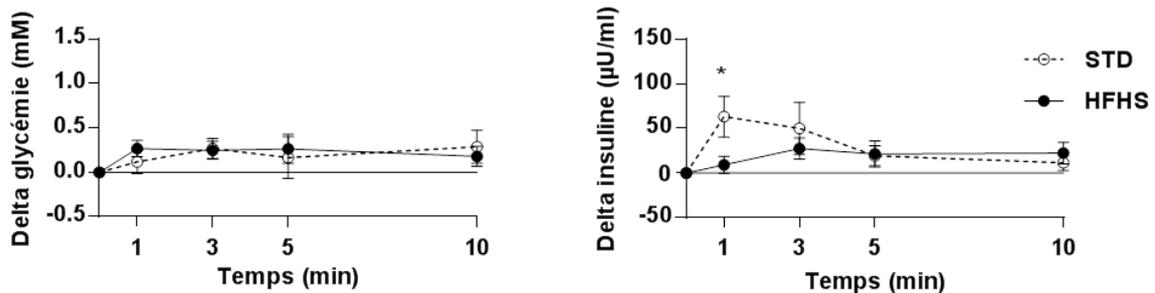
### 3 semaines



### 6 semaines



### 9 semaines



**Figure 28 : Les rats HFHS présentent une diminution de la détection hypothalamique du glucose *in vivo* dès 3 semaines d'exposition au régime HFHS**

Les rats sont testés après 3 semaines de régime (STD n=9 ; HFHS n=12), après 6 semaines de régime (STD n=10 ; HFHS n=15) ou après 9 semaines de régime (STD n=6 ; HFHS n=8). Lors du test de détection hypothalamique du glucose, les rats STD présentent un pic de sécrétion d'insuline 1 min après une injection intra-carotidienne de glucose (9 mg/kg). Ce pic est significativement diminué chez les rats HFHS dès 3 semaines d'exposition au régime. La glycémie est restée stable tout au long du test. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM. Les \* représentent une différence significative entre les groupes STD et HFHS, après analyse statistique adaptée (\*  $p < 0,05$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

triglycérides plasmatiques a été réalisé avec un kit de dosage colorimétrique (#TR0100, Sigma aldrich).

## h) Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 6. La normalité des données a été testée à l'aide du test de Shapiro-Wilk qui a permis de définir l'analyse statistique à réaliser : un test T de Student pour les données paramétriques, ou un test de Mann-Whitney pour les données non paramétriques. Quand cela a été nécessaire, une analyse des variances à deux facteurs (two-way ANOVA) a été réalisée, suivie d'un post test de Fisher's LSD, ou suivie d'un post test de Bonferroni lorsque les mesures étaient répétées. Les données sont toujours représentées par la moyenne  $\pm$  SEM (écart à la moyenne). Les astérisques (\*) ou dièses (#) représentent les différences significatives avec \* ou #  $p < 0,05$  ; \*\* ou ##  $p < 0,01$  ; \*\*\* ou ###  $p < 0,001$ .

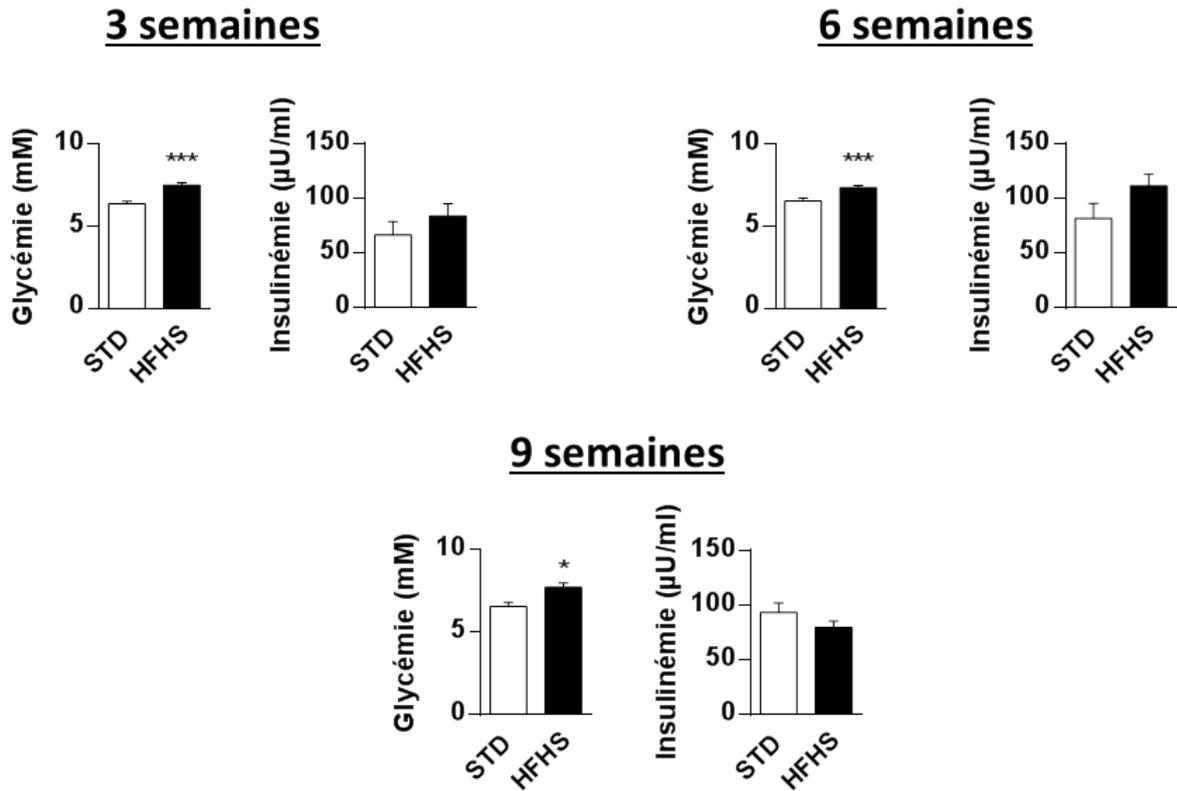
## 2) Résultats

### a) Altération de la détection hypothalamique du glucose *in vivo*

Dans un premier temps, le but était de déterminer le temps d'exposition au régime HFHS nécessaire pour induire une altération de la détection hypothalamique du glucose. Nous avons choisi de tester trois temps d'exposition à ce régime, 3, 6 et 9 semaines, afin de définir celui qui nous permettrait d'étudier ces défauts le plus précocement possible.

Après 3 semaines de régime, les rats STD présentent un pic de sécrétion transitoire d'insuline, 1 min après l'injection intra-carotidienne de glucose (T0min vs. T1min :  $+86,2 \pm 27,0$   $\mu\text{U/ml}$  ;  $p < 0,001$ ) (**Figure 28**). Ce pic est fortement diminué chez les rats HFHS (T0min vs. T1min :  $+28,9 \pm 12,2$   $\mu\text{U/ml}$  ;  $p = 0,416$ ) (**Figure 28**). A ce temps de régime, les rats HFHS présentent une augmentation significative de la glycémie basale par rapport aux rats STD (STD =  $6,4 \pm 0,2$  vs. HFHS =  $7,5 \pm 0,1$  mM ;  $p < 0,001$ ) sans modification de leur insulïnémie (STD =  $66,7 \pm 12,1$  vs. HFHS =  $84,0 \pm 11,1$   $\mu\text{U/ml}$  ;  $p = 0,188$ ) (**Figure 29**).

Après 6 semaines de régime, ces résultats sont confirmés. Les rats STD présentent aussi un pic de sécrétion transitoire d'insuline, 1 min après l'injection intra-carotidienne



**Figure 29 : Effets de 3, 6 ou 9 semaines d'exposition au régime HFHS sur la glycémie et l'insulinémie**

La glycémie et l'insulinémie ont été mesurées après 3 semaines de régime (STD n=9 ; HFHS n=12), après 6 semaines de régime (STD n=10 ; HFHS n=15) ou après 9 semaines de régime (STD n=6 ; HFHS n=8). Les rats HFHS présentent une hyperglycémie basale dès 3 semaines d'exposition au régime, sans modification de leur insulinémie. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM. Les \* représentent une différence significative entre les groupes STD et HFHS, après analyse statistique adaptée (Test de Student ou test de Mann Whitney sur données non appariées) (\*  $p < 0,05$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

de glucose (T0min vs. T1min :  $+59,3 \pm 14,9$   $\mu\text{U/ml}$  ;  $p < 0,001$ ), et les rats HFHS présentent une forte diminution de ce pic (T0min vs. T1min :  $+2,0 \pm 8,7$   $\mu\text{U/ml}$  ;  $p > 0,999$ ) (**Figure 28**). Les rats HFHS présentent aussi une augmentation significative de leur glycémie basale par rapport aux rats STD (STD =  $6,6 \pm 0,2$  vs. HFHS =  $7,4 \pm 0,1$  mM ;  $p < 0,001$ ), toujours sans modification de leur insulïnémie (STD =  $81,6 \pm 13,8$  vs. HFHS =  $111,4 \pm 10,9$   $\mu\text{U/ml}$  ;  $p = 0,070$ ) (**Figure 29**).

Après 9 semaines de régime, ces résultats sont de nouveau confirmés. Les rats STD présentent un pic de sécrétion transitoire d'insuline, 1 min après l'injection intracarotidienne de glucose (T0min vs. T1min :  $+63,4 \pm 22,9$   $\mu\text{U/ml}$  ;  $p < 0,01$ ), et les rats HFHS présentent une forte diminution de ce pic (T0min vs. T1min :  $+9,2 \pm 9,6$   $\mu\text{U/ml}$  ;  $p > 0,999$ ) (**Figure 28**). Les rats HFHS présentent une augmentation significative de leur glycémie basale par rapport aux rats STD (STD =  $6,6 \pm 0,2$  vs. HFHS =  $7,7 \pm 0,3$  mM ;  $p < 0,05$ ), toujours sans modification de leur insulïnémie (STD =  $93,4 \pm 8,5$  vs. HFHS =  $79,8 \pm 5,6$   $\mu\text{U/ml}$  ;  $p = 0,565$ ) (**Figure 29**).

Lors du test *in vivo* de détection hypothalamique du glucose, la glycémie étant restée stable tout au long du test, ces résultats montrent que dès 3 semaines d'exposition à un régime gras enrichi en saccharose, les rats présentent un défaut du contrôle nerveux de la sécrétion d'insuline. Les rats nourris pendant 3 semaines avec le régime HFHS semblent donc présenter de façon précoce une altération de la détection hypothalamique du glucose. Ce modèle expérimental a été choisi pour le reste de cette étude. En effet, l'altération précoce de l'axe hypothalamo-pancréatique lors de la détection hypothalamique du glucose n'a jamais été décrite auparavant lors d'un régime diabétoène.

## **b) Caractérisations métabolique et endocrinienne du modèle expérimental**

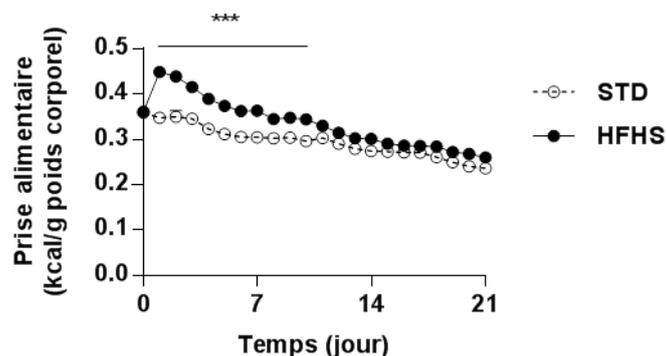
Avant d'aller plus loin dans l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans le défaut de détection centrale de l'hyperglycémie chez les rats nourris pendant 3 semaines avec le régime HFHS, il paraissait important de caractériser ce modèle expérimental en termes de paramètres métaboliques et endocriniens.

L'ensemble des paramètres mesurés est récapitulé dans le **tableau 2**. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que les rats ne présentaient pas d'augmentation de leur poids corporel, malgré une prise alimentaire moyenne significativement augmentée sur

	STD (n>8)	HFHS (n>8)	Significativité
<b>Paramètres phénotypiques</b>			
Poids (g)	298,9 ± 3,4	305,1 ± 3,8	ns
PA (kcal/j)	69,01 ± 1,03	79,36 ± 1,11	***
Masse maigre (% poids corporel)	76,32 ± 0,52	72,48 ± 0,54	***
Masse grasse (% poids corporel)	11,86 ± 0,63	15,14 ± 0,82	**
Taille (cm)	21,58 ± 0,14	21,54 ± 0,05	ns
<b>Paramètres circulants</b>			
Glycémie (mM)	6,38 ± 0,16	7,51 ± 0,14	***
Insuline (μU/ml)	66,68 ± 12,10	84,04 ± 11,12	ns
Leptine (ng/ml)	3,02 ± 0,17	5,72 ± 0,42	***
Ghréline acylée (pg/ml)	38,07 ± 5,01	39,10 ± 4,23	ns
Triglycérides (mg/dl)	125,0 ± 7,3	198,2 ± 25,4	*

**Tableau 2 : Paramètres mesurés chez les rats nourris pendant 3 semaines avec un régime STD vs. HFHS**

Les résultats sont exprimés par la moyenne ± SEM. Les \* représentent une différence significative après analyse statistique par un test T de Student sur des données non appariées (ns= non significatif ; \* p<0,05 ; \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001).



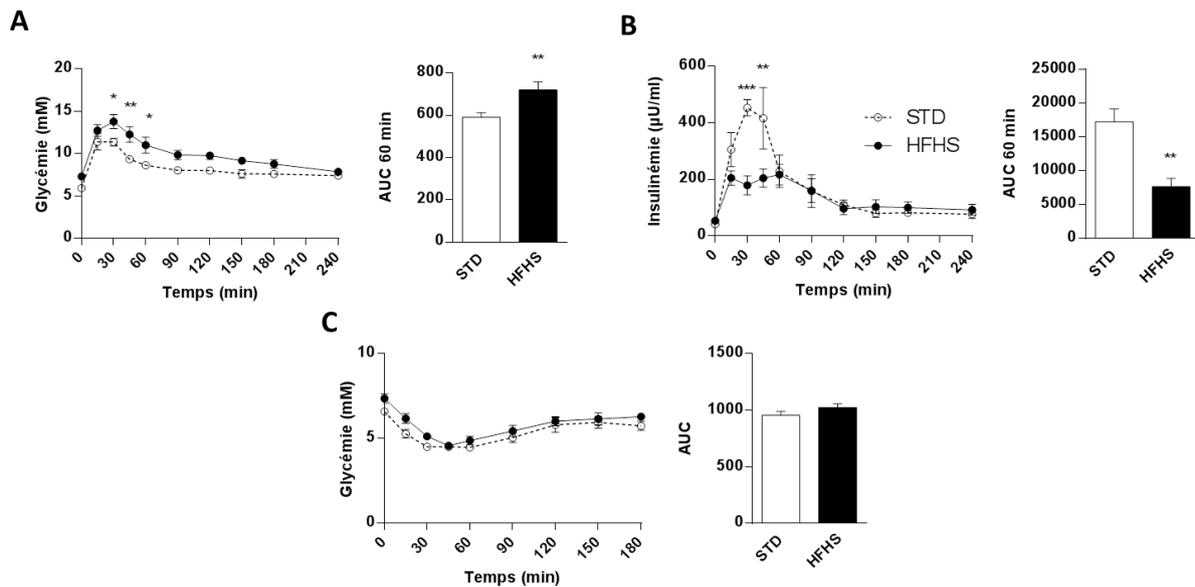
**Figure 30 : Prise alimentaire mesurée chez les rats STD vs. HFHS au cours des 3 semaines de régime**

Les résultats sont exprimés par la moyenne ± SEM. Les \* représentent une différence significative après analyse statistique par une ANOVA à deux facteurs sur mesures répétées (\*\*\*p<0,001).

l'ensemble des 3 semaines (STD =  $69,0 \pm 1,0$  vs. HFHS =  $79,4 \pm 1,1$  kcal/j ;  $p < 0,001$ ). Cependant, cette augmentation de PA n'est retrouvée que pendant les 10 premiers jours de régime et revient à la normale pendant les 10 derniers jours de régime (**Figure 30**). Toutefois, nous avons observé une augmentation significative de leur masse grasse (STD =  $11,9 \pm 0,6$  vs. HFHS =  $15,1 \pm 0,8$  % du poids corporel ;  $p < 0,01$ ) associée à une diminution de leur masse maigre (STD =  $76,3 \pm 0,5$  vs. HFHS =  $72,5 \pm 0,5$  % du poids corporel ;  $p < 0,001$ ). L'absence d'effet du régime sur la taille des rats a montré qu'il n'y avait pas d'altération de la croissance des animaux. En ce qui concerne les paramètres endocriniens, nous avons déjà évoqué que les animaux nourris avec le régime HFHS présentaient une hyperglycémie sans modification de leur insulinémie. De façon cohérente avec l'augmentation de leur masse grasse, nous avons observé une augmentation du taux de leptine plasmatique (STD =  $3,0 \pm 0,2$  vs. HFHS =  $5,7 \pm 0,4$  ng/ml ;  $p < 0,001$ ) ainsi que du taux de triglycérides circulant (STD =  $125,0 \pm 7,3$  vs. HFHS =  $198,2 \pm 25,4$  mg/dl ;  $p < 0,05$ ). Enfin, le taux de ghréline acylée, forme active de la ghréline, n'était pas modifié chez les rats HFHS par rapport aux rats STD.

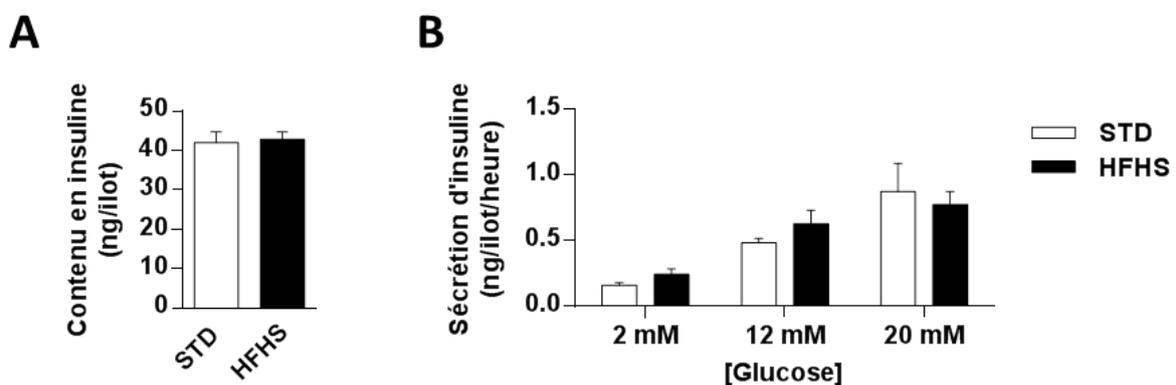
Nous avons ensuite effectué des tests physiologiques sur ces animaux afin de tester leur réponse métabolique suite à une injection périphérique de glucose ou d'insuline. La question était alors de savoir si ce défaut de contrôle nerveux de la sécrétion d'insuline pouvait à lui seul provoquer un défaut général de contrôle de la glycémie. Pour cela, un test de tolérance au glucose a été réalisé et l'insulinémie a été mesurée.

Les mesures lors du test de tolérance au glucose (GTT) montrent que les rats HFHS présentent une hyperglycémie plus élevée que les rats STD, représentée par une augmentation de l'AUC lors de la première heure (STD =  $590,4 \pm 21,6$  ; HFHS =  $719,1 \pm 37,9$  mmol.h/l ;  $p < 0,01$ ) (**Figure 31A**). Cette intolérance au glucose chez les rats HFHS s'accompagne d'une insulinémie plus basse pendant le test, représentée par une diminution de plus de moitié de l'AUC lors de la première heure (STD =  $17207 \pm 1907$  ; HFHS =  $7665 \pm 1223$   $\mu$ U.h/ml ;  $p < 0,01$ ) (**Figure 31B**), suggérant ainsi qu'un défaut de sécrétion d'insuline puisse être, *in vivo*, à l'origine de cette intolérance au glucose. En effet, les rats HFHS présentent par ailleurs une sensibilité normale à l'insuline, comme l'indique le test de sensibilité à l'insuline (ITT) (AUC des STD =  $955 \pm 34$  vs. HFHS =  $1026 \pm 32$  mmol.h/l ;  $p = 0,180$ ) (**Figure 31C**). L'utilisation de glucose par les tissus insulino-sensibles n'est donc pas en cause pour expliquer cette intolérance.



**Figure 31 : : Tests de tolérance au glucose et de sensibilité à l'insuline chez les rats nourris pendant 3 semaines avec un régime STD vs. HFHS**

(A) glycémie et (B) insulinémie lors d'un test de tolérance au glucose (injection sous cutanée de 2 g/kg de glucose) chez des rats STD et HFHS (n=6-7), ainsi que leur aire sous la courbe (AUC) associée. (C) Glycémie lors d'un test de sensibilité à l'insuline (injection sous-cutanée de 1 U/kg d'insuline) chez des rats STD et HFHS (n=6) ainsi que l'AUC associée. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM. Les \* représentent une différence significative après analyse statistique par une ANOVA à deux facteurs sur mesures répétées ou d'un test de Student pour les AUC (\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).



**Figure 32 : 3 semaines d'exposition au régime HFHS n'entraîne pas de modification de la capacité sécrétoire des cellules  $\beta$  du pancréas ni de leur contenu en insuline.**

(A) Contenu en insuline des îlots pancréatiques. (B) Sécrétion d'insuline des îlots pancréatiques incubés en présence de concentrations croissantes de glucose (2 mM, 12 mM et 20 mM). Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM. Les analyses statistiques (test de Student sur les contenus insulinémiques, ANOVA à deux facteurs sur les sécrétions d'insuline) n'ont pas montré d'effet significatif du régime HFHS sur la capacité sécrétoire des cellules  $\beta$  pancréatiques en réponse au glucose.

### c) Etude de la capacité sécrétoire des cellules $\beta$ pancréatiques

L'absence de sécrétion d'insuline lors du test de détection hypothalamique du glucose *in vivo* chez les rats HFHS peut avoir plusieurs origines : une altération de la capacité sécrétoire des cellules  $\beta$  du pancréas, et ce, dès 3 semaines d'exposition au régime HFHS, une origine purement nerveuse, ou les deux défauts concomitants.

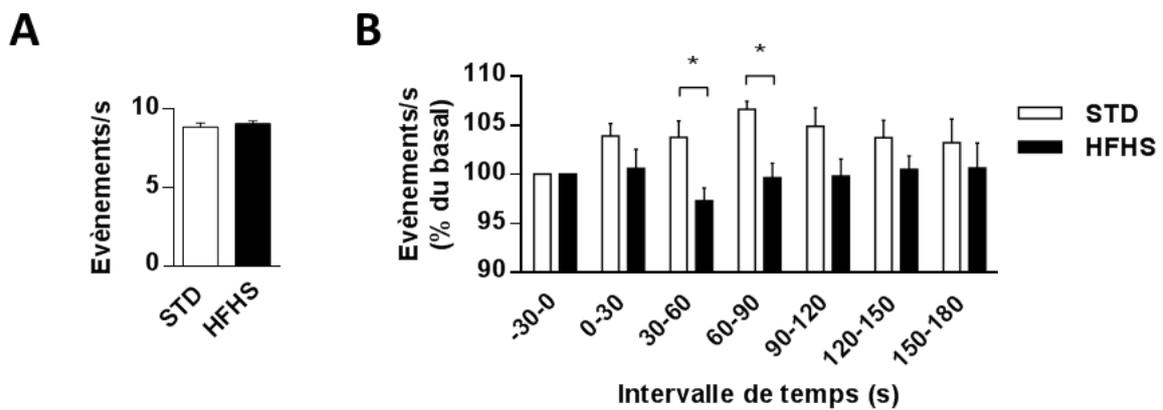
Afin de déterminer si les rats nourris avec le régime HFHS pendant 3 semaines présentent déjà une altération des cellules  $\beta$ , leur capacité sécrétoire a été testée *in vitro*, sur îlots isolés, en présence de concentrations croissantes de glucose.

Les résultats ne montrent pas de différence de contenu en insuline des îlots pancréatiques chez les rats STD et HFHS (STD =  $41,9 \pm 2,7$  vs. HFHS =  $42,8 \pm 1,8$  ng/îlot ;  $p=0,800$ ) (**Figure 32**), ni de la sécrétion d'insuline entre les îlots des rats STD et les îlots des rats HFHS, en situation basale (glucose 2 mM) ou après stimulation (glucose 12 mM et 20 mM) (à 2 mM de glucose : STD =  $0,162 \pm 0,019$  vs. HFHS =  $0,245 \pm 0,040$  ng/îlot/h ;  $p=0,648$  ; à 12 mM de glucose, STD =  $0,484 \pm 0,032$  vs. HFHS =  $0,630 \pm 0,104$  ng/îlot/h ;  $p=0,387$  et à 20 mM de glucose, STD =  $0,876 \pm 0,214$  vs. HFHS =  $0,776 \pm 0,099$  ng/îlot/h ;  $p=0,533$ ) (**Figure 32**).

Les rats nourris avec le régime HFHS pendant 3 semaines ne présentent donc pas d'altération du contenu en insuline, ni de la capacité sécrétoire des cellules  $\beta$  du pancréas *in vitro*, ce qui suggère que l'îlot lui-même n'est pas à l'origine de l'altération du pic d'insuline en réponse à l'injection intra-carotidienne de glucose *in vivo*, et que la commande vagale pourrait être la cause première du défaut observé.

### d) Hyperglycémie cérébrale et tonus parasympathique de l'axe hypothalamo-pancréatique

La communication nerveuse entre l'hypothalamus et le pancréas, relayée par le système nerveux parasympathique, est responsable de la commande nerveuse de la sécrétion d'insuline. Ainsi, dans le but de déterminer si l'altération de la sécrétion observée chez les rats nourris pendant 3 semaines avec le régime HFHS a pour origine un défaut de l'activité nerveuse de l'axe hypothalamo-pancréatique, nous avons enregistré l'activité du nerf vague suite au test de détection hypothalamique du glucose (injection intra-carotidienne d'un bolus de glucose à 9 mg/kg).



**Figure 33 : Les rats HFHS présentent une diminution du tonus parasympathique en réponse à une injection intra-carotidienne de glucose**

(A) Le nombre de potentiels d'action par seconde en condition basale chez les rats STD (n=8) et chez les rats HFHS (n=7) n'est pas significativement modifié (test de Student). (B) Le nombre de potentiel d'action par seconde, exprimé ici en % du basal (-30-0s) est significativement diminué chez les rats HFHS par rapport aux rats STD, 30 à 90s après l'injection intra-carotidienne de glucose. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM. Les \* représentent une différence significative entre les groupes STD et HFHS, d'après une ANOVA à deux facteurs sur mesures répétées (\*p<0,05).

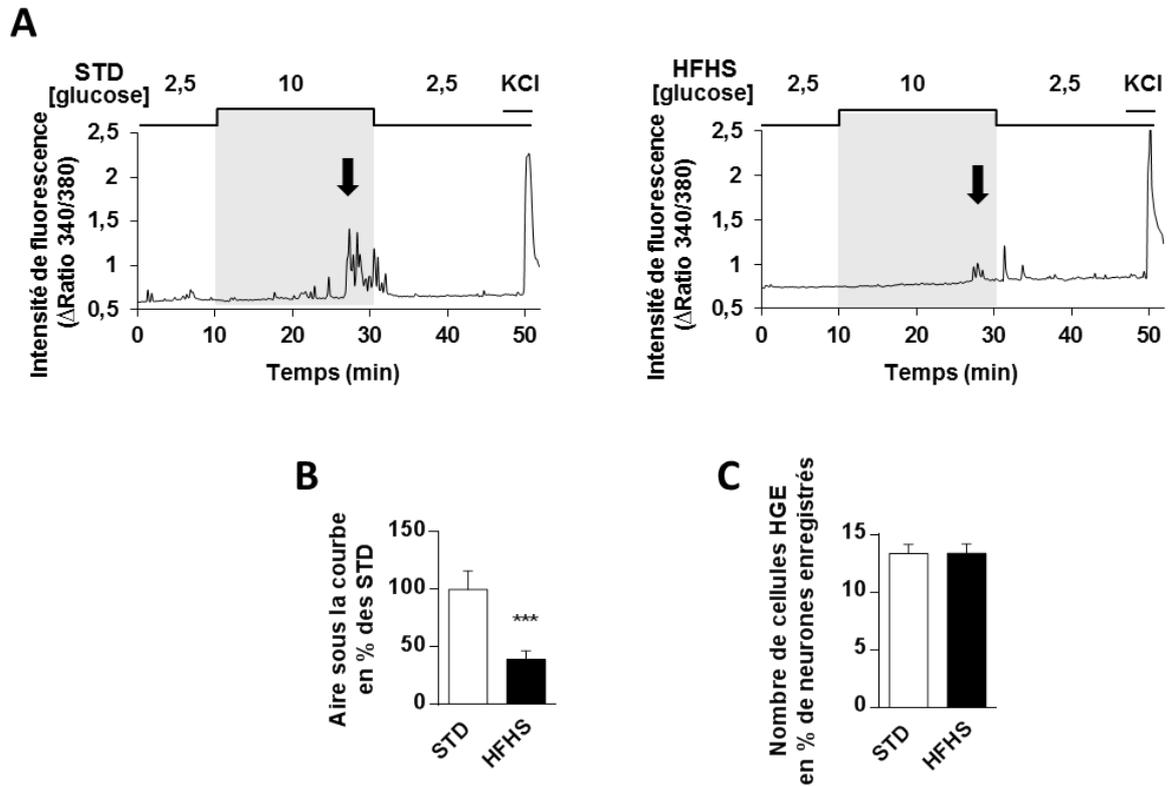
Les résultats montrent que le nombre de potentiels d'action n'est pas modifié en condition basale chez les rats HFHS par rapport aux rats STD (STD =  $8,89 \pm 0,25$  vs. HFHS =  $9,10 \pm 0,18$  événements/s ;  $p=0.506$ ) (**Figure 33A**). En revanche, on observe une diminution significative de la fréquence de ces potentiels d'action chez les rats HFHS, entre 30 et 90s après l'injection de glucose, période qui correspond au pic d'insuline (entre 30 et 60s : STD =  $103,93 \pm 1,24$  vs. HFHS =  $100,60 \pm 1,95$  % de l'activité basale ;  $p < 0,05$  ; entre 60 et 90s : STD =  $106,61 \pm 0,84$  vs. HFHS =  $99,65 \pm 1,48$  % de l'activité basale ;  $p < 0,05$ ) (**Figure 33B**). Ces résultats indiquent une diminution du tonus parasympathique en réponse à une hyperglycémie cérébrale chez les rats nourris pendant 3 semaines avec le régime HFHS, ce qui pourrait expliquer l'absence de pic de sécrétion d'insuline observé chez ces animaux.

#### e) Effet du régime HFHS sur la détection hypothalamique du glucose *in vitro*

Afin de déterminer si l'altération de la commande nerveuse du pic d'insuline observée *in vivo* en réponse au glucose est bien due à un défaut de la détection de l'hyperglycémie par les neurones HGE de l'hypothalamus, l'activité nerveuse de neurones hypothalamiques fraîchement dissociés a été analysée indirectement en mesurant leur activité calcique en réponse à une augmentation de la concentration de glucose (la dépolarisation des neurones entraînant l'ouverture de canaux calciques voltages-dépendants).

Ainsi, les neurones d'hypothalami fraîchement isolés de rats nourris avec les régimes STD ou HFHS pendant 3 semaines ont été étudiés par imagerie calcique, en réponse à une augmentation de la concentration de glucose, afin de mimer une hyperglycémie *in vitro* (**Figure 34A**). Les résultats montrent une diminution de la réponse des neurones hypothalamiques sensibles au glucose chez les rats HFHS, représentée par l'aire sous la courbe (STD vs. HFHS = -60%) (**Figure 34B**), alors que le nombre de neurones HGE (STD =  $13,3 \pm 0,8$  % ; HFHS =  $13,3 \pm 0,8$  % ;  $p > 0,05$ ) n'est pas différent entre les groupes STD et HFHS (**Figure 34C**).

Ces résultats montrent donc que dès 3 semaines d'exposition au régime HFHS, les neurones HGE de l'hypothalamus présentent un défaut d'activité électrique en réponse à une augmentation de la concentration de glucose. L'altération de cette réponse pourrait ainsi être à l'origine du défaut de communication via l'axe hypothalamo-pancréatique, et



**Figure 34 : Détection hypothalamique du glucose *in vitro* chez les rats nourris pendant 3 semaines avec un régime STD vs. HFHS.**

(A) Traces d'imagerie calcique représentatives montrant les réponses de neurones HGE hypothalamiques chez un rat STD (à gauche) et un rat HFHS (à droite) lors d'une augmentation de la concentration de glucose de 2,5 mM à 10 mM. (B) Quantification de l'amplitude de la réponse au glucose (AUC) des neurones HGE (STD : n=31 ; HFHS n=34 ; 3 cultures indépendantes). (C) Quantification du % de neurones HGE enregistrés dans les cultures issues d'hypothalamus de rats STD ou HFHS. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM. Les \* représentent une différence significative après analyse statistique par un test de Mann-Whitney sur des données non appariées (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

finalement être responsable de l'absence de sécrétion d'insuline lors d'une hyperglycémie cérébrale.

### 3) Conclusion

Au cours de cette première partie de mes travaux de thèse, nous avons mis en place un modèle d'étude de l'altération précoce de la détection hypothalamique du glucose. Les rats, nourris pendant 3 semaines avec un régime gras enrichi en saccharose, présentaient les caractéristiques typiques d'un diabète précoce, avec une hyperglycémie basale et une intolérance au glucose, sans modification de leur insulinémie ni de leur sensibilité à l'insuline.

Ces animaux ne présentaient pas encore de phénotype obèse avec un poids corporel non modifié par le régime HFHS, mais leur masse grasse était significativement augmentée, associée à une forte augmentation du taux circulant de leptine et de TG. De plus, les rats nourris avec le régime HFHS pendant 6 ou 9 semaines présentaient une augmentation significative de leur poids corporel (données non présentées) confirmant le potentiel obésogène de ce régime.

De façon intéressante, les rats présentaient déjà une altération de la détection hypothalamique du glucose. En effet, une injection intra-carotidienne de glucose à une dose de 9 mg/kg, n'induisait pas de sécrétion d'insuline chez les rats HFHS alors qu'elle engendrait cette sécrétion chez les rats STD. L'étude de la capacité sécrétoire en insuline des îlots du pancréas, ainsi que l'étude de la détection *in vitro* du glucose par les neurones HGE hypothalamiques indique que l'absence de sécrétion d'insuline dans le test de détection hypothalamique du glucose *in vivo* a très probablement pour origine une altération au niveau central et non intrinsèque à la cellule  $\beta$  pancréatique. Le fait que les neurones HGE ne soient plus capables de détecter correctement une hyperglycémie induirait une diminution de l'activation du tonus parasympathique, indispensable pour la commande hypothalamo-pancréatique.

Le modèle expérimental que nous avons mis en place semble donc être un excellent modèle d'étude pour déterminer l'importance et l'implication des défauts centraux dans le développement du diabète. La suite de ce travail a consisté à étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans ces défauts centraux, et plus particulièrement, l'implication de la dynamique mitochondriale et de la production hypothalamique des mROS en réponse à l'hyperglycémie.



# Partie 2 : Implication de la dynamique mitochondriale et des mROS dans l'altération de la détection hypothalamique du glucose

---

## 1) Approches méthodologiques

### a) Dosage ROS

Les rats anesthésiés ont reçu une injection intra-carotidienne de glucose (9 mg/kg) ou de NaCl, selon le protocole du test de détection hypothalamique du glucose (voir partie 1). Les MBH ont ensuite été prélevés 1 min après l'injection (temps correspondant au pic de sécrétion d'insuline enregistré chez les animaux STD en réponse à l'injection de glucose (voir partie 1)), immédiatement congelés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C.

Le protocole utilisé a été adapté d'une publication sur le muscle cardiaque (Szabados *et al.*, 1999). Le principe du dosage est d'utiliser la sonde dichlorodihydrofluorescéine (H<sub>2</sub>-DCFDA, #C2938 ; Molecular Probes) sur des tissus frais, molécule qui émet une fluorescence mesurable lorsqu'elle est oxydée par les ROS, et plus spécifiquement par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Les tissus ont été homogénéisés dans 500 µl de tampon A (150 mM KCl, 20 mM Tris, 0,5 mM EDTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM glucose, 0,5 mM acide octanoïque, pH 7,4) à l'aide d'un potter. Les échantillons ont ensuite été incubés avec la sonde H<sub>2</sub>-DCFDA, à concentration finale de 10 µM, pendant 30 min à 37°C. La réaction a ensuite été stoppée avec 250 µl d'éthanol 70% et 250 µl de HCl 0,1 M puis les échantillons ont été centrifugés (3 000 g, 15 min, 4°C), le surnageant contient la sonde fluorescente et le culot contient les protéines. Les culots ont été homogénéisés avec un tampon B (210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 10 mM HEPES, 10 mM DTT, cocktail d'anti-protéases (#05892970001 ; Roche diagnostics)) afin de réaliser un dosage protéique. Les surnageants ont été neutralisés avec 1 M NaHCO<sub>3</sub> puis centrifugés (6 000 g, 15 min, 4°C). La fluorescence, mesurée grâce à un lecteur de plaque (Perkin Elmer) avec une excitation à 490 nm et à une émission à 535 nm, est exprimée en pourcentage de la



fluorescence mesurée chez les rats contrôles (STD-NaCl), rapportée à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon.

### **b) Détermination de l'état oxydé/réduit du glutathion**

Le dosage de l'état oxydé/réduit du glutathion a été réalisé en collaboration avec le Dr. Anne Galinier, service de biochimie nutritionnelle, à Toulouse.

Après anesthésie des rats, les MBH ont été rapidement disséqués après décapitation. Les tissus ont été lysés dans un tampon de lyse (3 mM EDTA, 150 mM KCl, pH=7,4), 50 µl d'homogénat ont été mixés avec 450 µl d'acide métaphosphorique à 5% puis centrifugé (10,000 g, 10 min, 4°C). Les dosages de la quantité de GSSG et GSH ont été mesurés sur les surnageants par HPLC (Galinier *et al.*, 2006).

### **c) Mesure de la respiration mitochondriale**

La respiration mitochondriale a été mesurée à l'aide d'un oxygraphe (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments). Les MBH, fraîchement disséqués, ont été homogénéisés dans un milieu de respiration adaptée aux mitochondries (MiR05) contenant de la saponine pour la perméabilisation des membranes. Approximativement 3mg de tissu ont été transférés dans la chambre d'enregistrement de l'oxygraphe.

Les différents états de la chaîne respiratoire ont été étudiés selon la convention adoptée en 1956, qui suit l'ordre typique d'addition d'agents pharmacologiques lors d'une expérience (Chance and Williams, 1956). Ainsi, l'état 1 correspond à la respiration basale. L'état 2 est mesuré après l'addition de substrats, du glutamate 10 mM pour stimuler le complexe I puis du succinate 10 mM pour stimuler le complexe II. C'est une respiration ralentie due à une faible quantité d'ADP (quantité endogène présente). L'état 3 est mesuré après l'addition de 2,5 mM d'ADP, correspondant à la respiration mitochondriale couplée avec une synthèse d'ATP maximale. L'état 4 (respiration non couplée) est mesuré après l'addition de 0,75 mM de carboxy-atractyloside (Catr), un inhibiteur indirect de l'ATP synthase. Afin de mesurer la capacité maximale de la respiration mitochondriale, un agent découplant est ajouté, le carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (2,5 µM, CCCP). Le CCCP est un découplant, responsable de la fuite des protons. Enfin, afin de différencier la contribution des complexes I et II à la chaîne respiratoire, 5 µM de roténone est ajouté afin de bloquer le complexe I.



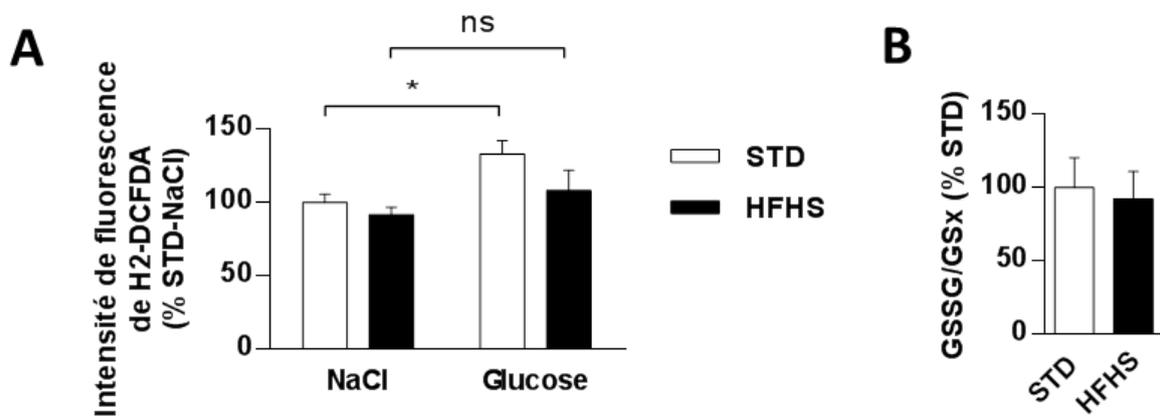
La consommation en oxygène est mesurée via le logiciel « DataGraph » et normalisée au poids du tissu. Tous les produits chimiques ont été achetés chez Sigma Aldrich. Le milieu de respiration a été préparé selon le protocole fourni par Oroboros Instruments. Pour plus d'information, consulter <http://www.orooboros.at/>.

#### **d) Constitution des fractions mitochondriales**

Les rats anesthésiés ont reçu une injection intra-carotidienne de glucose (9 mg/kg) ou de NaCl, selon le protocole du test de détection hypothalamique du glucose (voir partie 1). Les MBH ont ensuite été prélevés 1 min après l'injection, puis homogénéisés dans un tampon glacé MB+ (10 mM HEPES, 210 mM mannitol, 10 mM DTT, 70 mM sucrose, cocktail d'inhibiteurs de protéases [complete EDTA, Roche diagnostics]) à l'aide d'un potter. Les homogénats ont été centrifugés à 1,000g, 10 min à 4°C, puis les surnageants à 10,000g, 10 min à 4°C. Les culots restants, enrichis en mitochondries, ont été re-homogénéisés dans le tampon MB+ puis stockés à -80°C jusqu'aux analyses par Western blot.

#### **e) Western blot**

Les protéines (20 µg) ont été séparées sur des gels à 12% d'acrylamide par SDS-PAGE. Après transfert sur membranes PVDF, puis blocage 1h à RT dans une solution de 5% de lait écrémé (#1706404, Biorad), les membranes ont été incubées avec une solution de 1% de lait écrémé contenant les anticorps primaires anti-OXPHOS (1/1,000 ; souris ; Mitosciences), anti-Actine (1/10,000 ; souris ; Millipore), anti-DRP1 (1/10,000 ; souris ; BD Biosciences), anti-OPA1 (1/500 ; souris ; BD Biosciences), anti-FIS1 (1/500 ; lapin ; Clinisciences) ou anti-MFN2 (1/500 ; souris ; Abnova), sur la nuit à 4°C. Les bandes spécifiques ont été détectées avec les anticorps secondaires conjugués à une peroxydase, anti-souris (1/10 000 ; mouton ; GE healthcare) ou anti-lapin (1/10 000 ; âne ; GE healthcare), 1h à RT. Les bandes ont été révélées par chemiluminescence par l'addition d'enhanced chemiluminescence (ECL) (#1705060, Bio-Rad) et visualisées à l'aide d'un ChemiDoc (XRS+ system ; BioRad) pour l'analyse densitométrique.



**Figure 35 : Altération de la signalisation redox dans l'hypothalamus des rats HFHS en réponse à l'hyperglycémie cérébrale**

(A) Production de ROS dans le MBH 1 min après une injection intra-carotidienne de glucose (9 mg/kg) ou de NaCl chez des rats STD et HFHS (n=10). (B) Etat oxydé/(oxydé+réduit) du glutathion dans le MBH de rats STD et HFHS (n=7). Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM. Les \* représentent une différence significative après analyse statistique par une ANOVA à deux facteurs ou un test de Student (ns = non significatif; \*  $p < 0,05$ ).

## 2) Résultats

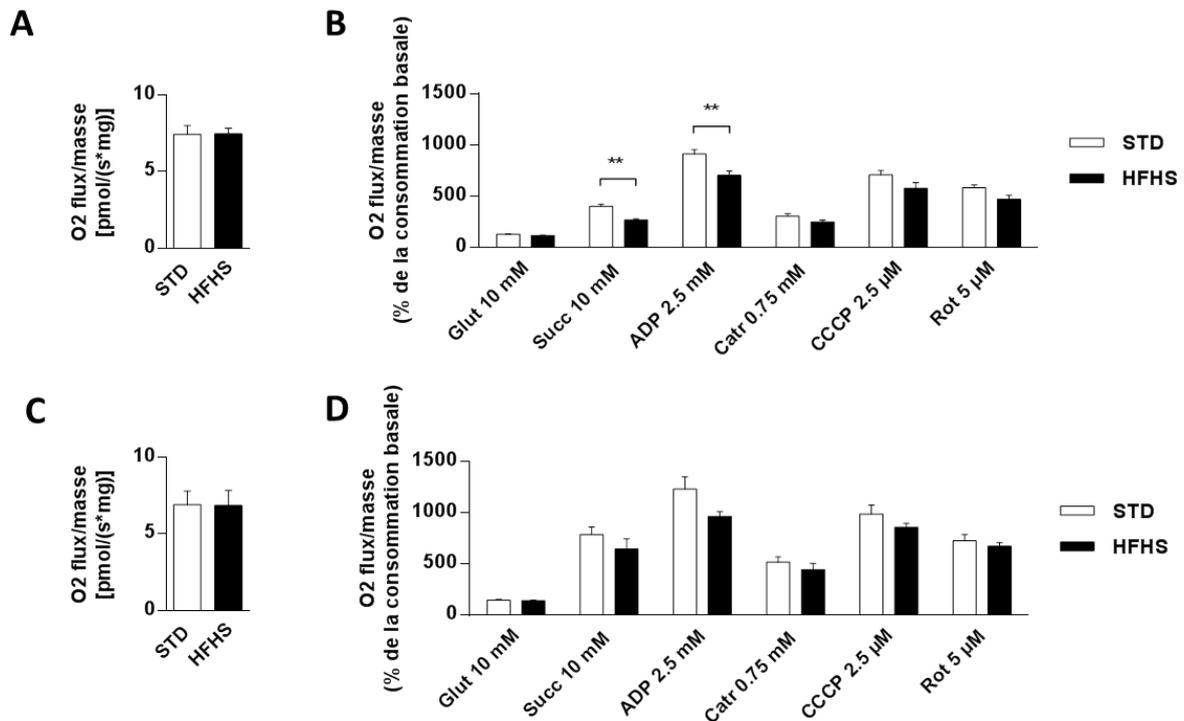
### a) Altération de la signalisation ROS chez les rats HFHS

Notre équipe ayant précédemment montré que la détection hypothalamique du glucose requiert une signalisation ROS (Leloup *et al.*, 2006), nous avons donc étudié si l'altération de la détection hypothalamique du glucose chez les rats HFHS implique un défaut de cette signalisation. Comme dans nos études précédentes (Carneiro *et al.*, 2012; Colombani *et al.*, 2009; Leloup *et al.*, 2006), l'injection de glucose chez les rats STD induit une augmentation significative de la production hypothalamique de ROS (NaCl vs. Glucose : +33% ;  $p < 0,05$ ) (**Figure 35A**). Cependant, cette augmentation est absente chez les rats HFHS (NaCl vs. Glucose : +16% ;  $p = 0,2$ ) et la production de ROS après l'injection de glucose tend à être inférieure chez les rats HFHS par rapport aux rats STD (STD =  $133,0 \pm 9,3$  vs. HFHS =  $108,2 \pm 13,8$  % ;  $p = 0,067$ ) (**Figure 35A**). Ce résultat montre donc qu'il existe effectivement une altération de la signalisation ROS dans l'hypothalamus des rats HFHS en réponse à une hyperglycémie.

De façon intéressante, le niveau basal de ROS, évalué après l'injection intracarotidienne de NaCl, est similaire entre les deux groupes de rats (STD =  $100,0 \pm 5,5$  vs. HFHS =  $91,6 \pm 5,1$  % ;  $p = 0,5$ ) (**Figure 35A**). Ce résultat suggère que l'état redox de l'hypothalamus n'a pas été affecté par le régime HFHS. Pour vérifier cette hypothèse, le statut oxydé/réduit du glutathion a été mesuré, par le ratio GSSG/GSx. Les résultats ne montrent pas de différence de l'état oxydé/réduit du glutathion dans les MBH des rats HFHS par rapport aux rats STD (STD =  $100,0 \pm 20,3$  vs. HFHS =  $92,0 \pm 19,0$  % ;  $p = 0,78$ ) (**Figure 35B**). La consommation du régime HFHS n'a donc pas encore engendré de stress oxydant au niveau central, montrant que le défaut observé est spécifique de la réponse à l'hyperglycémie.

### b) Dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale

Comme nous l'avons vu en introduction, un défaut de la production de mROS en réponse au glucose peut avoir deux origines : une altération du système antioxydant, et/ou un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les derniers résultats ne montrant pas de modification de l'état oxydé/réduit du glutathion, nous pouvons conclure que le système antioxydant n'entre pas en jeu dans ce cas. Nous avons

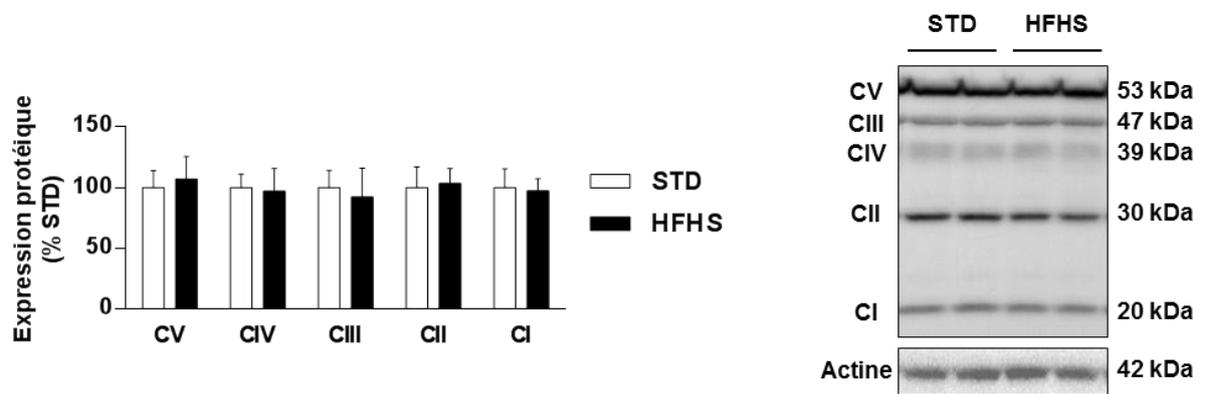


**Figure 36 : Dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale chez les rats HFHS**

Consommation en oxygène mesurée sur les MBH (A-B) ou les cortex (C-D) de rats STD et HFHS (n=5) en condition basale ou en réponse à des agents pharmacologiques. Le glutamate permet la stimulation du complexe I et le succinate stimule le complexe II. L'ajout d'ADP permet la stimulation maximale du complexe V, et donc de la respiration couplée, et l'inhibition indirecte du complexe V par l'ajout de carboxy atractyloside (Catr) permettant d'étudier la respiration non couplée. L'addition du CCCP, va permettre la fuite des protons et donc une respiration maximale non couplée. Enfin, l'inhibiteur du complexe I, la roténone, permet à ce stade de mesurer le transfert des électrons à une vitesse maximale entre les complexes II à IV. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM. Les \* représentent une différence significative après analyse statistique par un test de Mann Whitney (\*\*  $p < 0,01$ ).

donc orienté notre étude sur l'étude du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, par une méthode d'oxygraphie. Cette méthode permet l'analyse très précise de la consommation d'oxygène en présence d'agents pharmacologiques capables de moduler la vitesse de transfert des électrons le long de la chaîne respiratoire. Par une séquence préalablement déterminée d'ajouts successifs de ces stimulateurs ou inhibiteurs, il est alors possible de déterminer la contribution de chaque complexe dans la respiration mitochondriale.

Tout d'abord, la consommation d'oxygène en condition basale n'est pas différente entre les groupes (STD =  $7,4 \pm 0,5$  vs. HFHS =  $7,4 \pm 0,3$  pmol/(s.mg) ;  $p=0,944$ ) (**Figure 36A**), ce qui indique que la respiration est normale en condition de repos chez les rats HFHS. Cependant, la stimulation de la chaîne respiratoire avec ses substrats, par les ajouts successifs du glutamate (stimulation du complexe I) et du succinate (stimulation du complexe II), montre une moindre stimulation de la respiration chez les rats HFHS par rapport aux rats STD (ajout du glutamate : STD =  $128,6 \pm 3,5$  vs. HFHS =  $115,6 \pm 3,5\%$  de la consommation basale ;  $p=0,056$  ; ajout du succinate : STD =  $400,7 \pm 20,8$  vs. HFHS =  $269,1 \pm 10,2\%$  de la consommation basale ;  $p<0,01$ ) (**Figure 36B**). La diminution de la consommation en oxygène dans les MBH des rats HFHS est toujours présente après l'ajout d'une concentration saturante d'ADP (stimulation maximale du complexe V, et donc de la respiration couplée) (STD =  $911,8 \pm 41,3$  vs. HFHS =  $702,6 \pm 40,4\%$  de la consommation basale ;  $p<0,05$ ) (**Figure 36B**). Cependant, l'inhibition du complexe V par l'ajout de Catr (permettant d'étudier la respiration non couplée) restaure une respiration similaire entre les deux groupes lorsqu'elle est indépendante du complexe V (STD =  $304,2 \pm 25,7$  vs. HFHS =  $248,2 \pm 17,8\%$  de la consommation basale ;  $p=0,095$ ) (**Figure 36B**). De même, l'ajout du CCCP, qui va permettre la fuite des protons et donc une respiration maximale non couplée, ne modifie pas la consommation en oxygène chez les rats HFHS par rapport aux rats STD (STD =  $707,2 \pm 42,4$  vs. HFHS =  $576,9 \pm 53,8\%$  de la consommation basale ;  $p=0,095$ ) (**Figure 36B**). Enfin, l'inhibiteur du complexe I, la roténone, qui permet à ce stade de mesurer le transfert à une vitesse maximale des électrons entre les complexes II à IV, montre une forte tendance à diminuer la respiration mitochondriale chez les rats HFHS par rapport aux rats STD (STD =  $580,2 \pm 28,3$  vs. HFHS =  $469,6 \pm 38,0\%$  de la consommation basale ;  $p=0,056$ ) (**Figure 36B**).



**Figure 37 : Quantification relative de l'expression des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale**

Analyse par Western Blot et immunoblot représentatif de l'expression des cinq complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale dans le MBH de rats STD (n=8) et HFHS (n=6). La densité optique correspondant à chaque complexe est rapportée à la densité optique de l'actine pour normalisation. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM et exprimés en pourcentage des STD. Aucune différence n'a été trouvée après analyse statistique par un test de Mann Whitney.

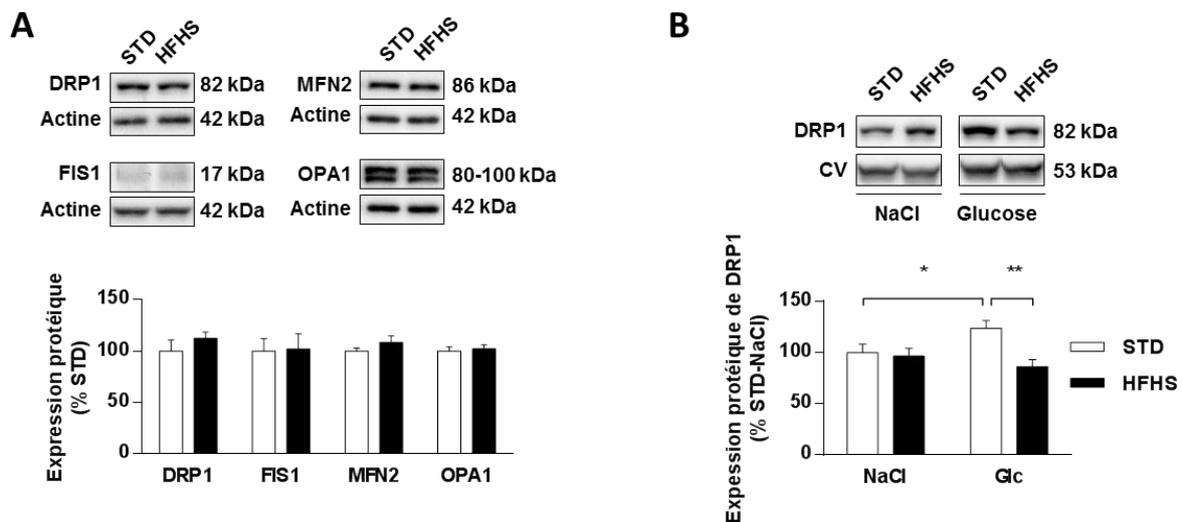
L'ensemble de ces résultats met en avant une diminution du fonctionnement de la respiration couplée chez les rats HFHS par rapport aux rats STD, lorsque celle-ci est stimulée par des substrats, impliquant plus particulièrement les complexes II et V. Ce dysfonctionnement implique le transfert d'électrons à travers la chaîne respiratoire dépendante de la phosphorylation de l'ADP. Par ailleurs, ces modifications dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire sont spécifiques à l'hypothalamus, en effet, aucune modification de la respiration mitochondriale n'a été observée dans le cortex, que nous avons étudié comme région contrôle (**Figures 36C-D**).

L'étude semi-quantitative des protéines composant la chaîne respiratoire ne montre pas de différence entre les rats STD et HFHS (Complexe I :  $p=0,929$  ; Complexe II :  $p=0,565$  ; Complexe III :  $p=0,632$  ; Complexe IV :  $p=0,811$  ; Complexe V :  $p=0,835$ ) (**Figure 37**), indiquant que le dysfonctionnement observé n'est pas dû à une diminution du nombre de complexes mitochondriaux, mais bien à une altération directe de leur fonctionnement.

### c) Altération de la dynamique mitochondriale

Notre équipe a précédemment montré qu'une hyperglycémie cérébrale induit la translocation de la protéine de fission DRP1 à la mitochondrie dans le MBH. De plus, L'inhibition de la protéine DRP1 dans le MBH bloque la production de ROS en réponse à une injection intra-carotidienne de glucose, ainsi que le contrôle nerveux de la sécrétion d'insuline (Carneiro *et al.*, 2012). Dans ce contexte, nous avons fait l'hypothèse que les défauts de la production de ROS observés chez les rats HFHS, associés à l'altération de la chaîne respiratoire mitochondriale, étaient liés à un défaut de l'adressage de DRP1 à la mitochondrie en réponse au glucose.

Nous avons tout d'abord mesuré la quantité totale des protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale dans les MBH des rats STD et HFHS. Aucune différence n'a été constatée, que ce soit pour les protéines de fission DRP1 ( $p=0,431$ ) et FIS1 ( $p=0,912$ ), ou pour les protéines de fusion MFN2 ( $p=0,262$ ) et OPA1 ( $p=0,696$ ) (**Figure 38A**). Nous avons ensuite mesuré la translocation de DRP1 à la mitochondrie en réponse à une injection intra-carotidienne de glucose. L'analyse a été effectuée sur des fractions enrichies en mitochondries extraites des MBH, 1 min après l'injection de glucose. Comme notre équipe l'a précédemment montré (Carneiro *et al.*, 2012),



**Figure 38 : Quantification relative des acteurs de la dynamique mitochondriale par Western blot**

(A) Analyse par Western Blot et immunoblots représentatifs de la quantité relative des principaux acteurs de la dynamique mitochondriale dans les MBH des rats STD et HFHS ( $n=7$ ). (B) Analyse par Western Blot et immunoblots représentatifs de la quantité relative de la protéine de fission DRP1 dans les fractions enrichies en mitochondries de MBH des rats STD et HFHS ( $n=6$ ), après injection intra-carotidienne de glucose (9 mg/kg) ou de NaCl, à 1 min. La densité optique correspondant à chaque protéine est rapportée à la densité optique de l'actine pour normalisation. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM et exprimés en pourcentage des STD ou STD-NaCl. Il n'y a pas de différence significative de la quantité relative totale des acteurs de la dynamique. Les \* représentent une différence significative après analyse statistique par une ANOVA à deux facteurs pour l'adressage de DRP1 (\*  $p<0,05$  ; \*\*  $p<0,01$ ).

l'hyperglycémie cérébrale induit une augmentation significative de la quantité de DRP1 à la mitochondrie chez les rats STD (NaCl vs. Glucose : +24% ;  $p < 0,05$ ) (**Figure 38B**). Cependant, l'adressage de la protéine DRP1 à la mitochondrie n'est plus présent chez les rats HFHS (NaCl vs. Glucose : -10% ;  $p = 0,354$ ) (**Figure 38B**). De plus, la quantité de DRP1 à la mitochondrie suite à l'injection de glucose est significativement plus faible chez les rats HFHS par rapport aux rats STD (STD =  $123,6 \pm 7,5$  vs. HFHS =  $86,1 \pm 6,9\%$  ;  $p < 0,01$ ) (**Figure 38B**). Ces résultats montrent donc qu'il existe une altération de la dynamique mitochondriale, et plus particulièrement de l'adressage de la protéine DRP1 à la mitochondrie au niveau hypothalamique en réponse à une hyperglycémie cérébrale.

### 3) Conclusion

Dans cette deuxième partie, nous avons mis en évidence l'implication de défauts mitochondriaux dans l'altération de la détection hypothalamique du glucose, et plus particulièrement de la signalisation ROS et de la dynamique mitochondriale.

Au vu des résultats, il semblerait que l'exposition au régime HFHS modifie les événements de dynamique mitochondriale, altérant ainsi la réponse à une hyperglycémie cérébrale. Plus particulièrement, l'adressage de la protéine DRP1 à la mitochondrie n'est pas induit par cette augmentation de la concentration de glucose hypothalamique chez les rats HFHS. Ces modifications de dynamique peuvent alors avoir des effets négatifs sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire. En effet, on observe une consommation mitochondriale en oxygène diminuée chez les rats HFHS lorsque que le complexe II et V sont stimulés en condition de respiration couplée, ce qui peut expliquer l'absence de production de ROS en réponse à l'hyperglycémie.

La suite de ce travail a consisté à déterminer quel(s) acteur(s) moléculaire(s) dérégulé(s) pourrai(en)t être à l'origine de l'ensemble des défauts observés, notamment concernant le défaut de translocation de la protéine DRP1. Ainsi, la réversion de cet ou ces acteur(s) permettrait de rétablir une détection hypothalamique du glucose similaire à celle observée chez les rats STD.



# Partie 3 : Réversion du phénotype

---

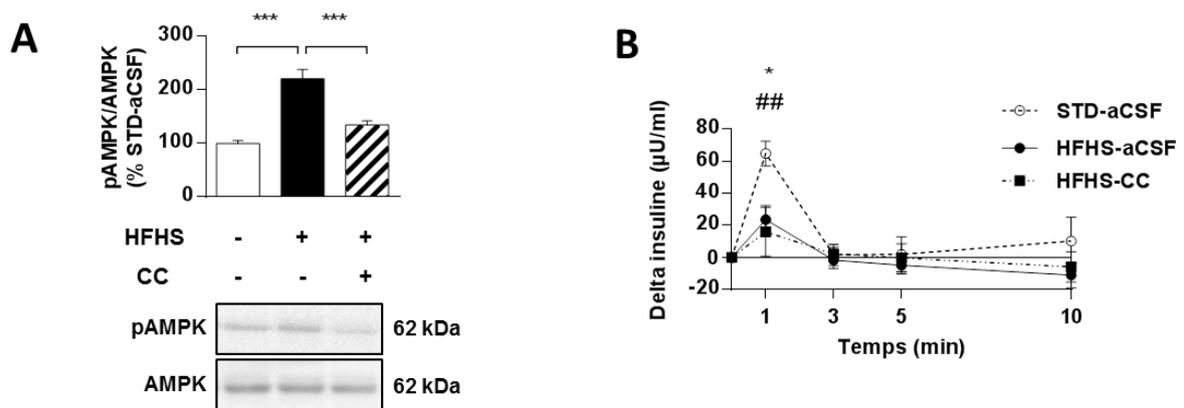
## 1) Approches méthodologiques

### a) Injections ICV

Après anesthésie, les rats ont été implantés avec un cathéter dans la carotide (**voir partie 1 - 1) b) Test de détection hypothalamique du glucose**). A la suite de cette chirurgie vasculaire, les rats ont été installés dans un cadre stéréotaxique dans le but de recevoir différents traitements dans le 3V, selon la question posée (coordonnés : 2,4 mm en arrière de bregma, 9 mm de profondeur). Ainsi, les rats ont reçu une injection ICV soit de leptine murine recombinante (5 µg dans 5 µl en 5 min ; Peprotech), soit un inhibiteur de l'AMPK, la dorsomorphine, aussi appelée composé C (CC ; 100 nM dans 10 µl en 10 min ; sc-361173, Santa Cruz). Les rats ont ensuite reçu une injection intra-carotidienne de glucose (9 mg/kg), respectivement 30 ou 60 min après l'injection ICV. Les rats contrôles ont reçu une injection ICV de liquide cérébro-spinal artificiel (aCSF, Tocris). A la fin de l'expérience, les cerveaux ont été rapidement prélevés, les MBH disséqués et immédiatement congelés dans de l'azote liquide. Les plasmas et cerveaux ont été conservés à -80°C jusqu'aux analyses ultérieures.

### b) Western Blot

Le protocole de WB utilisé dans cette partie est quasiment identique à la partie précédente, avec quelques modifications. Les protéines (40 µg) ont été séparées sur des gels à 10% d'acrylamide par SDS-PAGE. Après transfert sur membranes de nitrocellulose, puis blocage 1h à RT dans une solution de 5% de BSA, les membranes ont été incubées avec une solution de 1% de lait écrémé contenant les anticorps primaires anti-phospho AMPK (1/1,000 ; lapin ; Cell signaling), anti-AMPK (1/1,000 ; lapin ; Cell signaling), anti-phospho STAT3 (1/2,000 ; lapin ; Abcam), anti-STAT3 (1/2,000 ; lapin ; Abcam), anti-phospho AKT (1/1 000 ; lapin ; Cell signaling) ou anti-AKT (1/1 000 ; lapin ; Cell signaling). La suite du protocole est identique à la partie précédente (**voir partie 2 - 1) e) Western blot**).



**Figure 39 : Une sur-activation de l'AMPK n'est pas impliquée dans l'altération de la détection hypothalamique du glucose observée chez les rats HFHS**

(A) Analyse par WB et immunoblot représentatif de la forme phosphorylée par rapport à la forme totale de l'AMPK dans les MBH des rats STD et HFHS (n=6-7) injectés ou non avec l'inhibiteur de l'AMPK, le composé C (CC). (B) Test de détection hypothalamique du glucose chez les rats STD et HFHS (n=6-7) injectés ou non avec le CC. Les résultats sont exprimés par les moyennes  $\pm$  SEM. Les \* représentent une différence significative entre les rats STD-aCSF et HFHS-aCSF ; les # représentent une différence significative entre les rats STD-aCSF et HFHS-CC après analyse statistique par une ANOVA à deux facteurs sur mesures répétées ou non (\*  $p < 0,05$  ; ##  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## 2) Résultats

### a) L'AMPK et la régulation de la dynamique mitochondriale

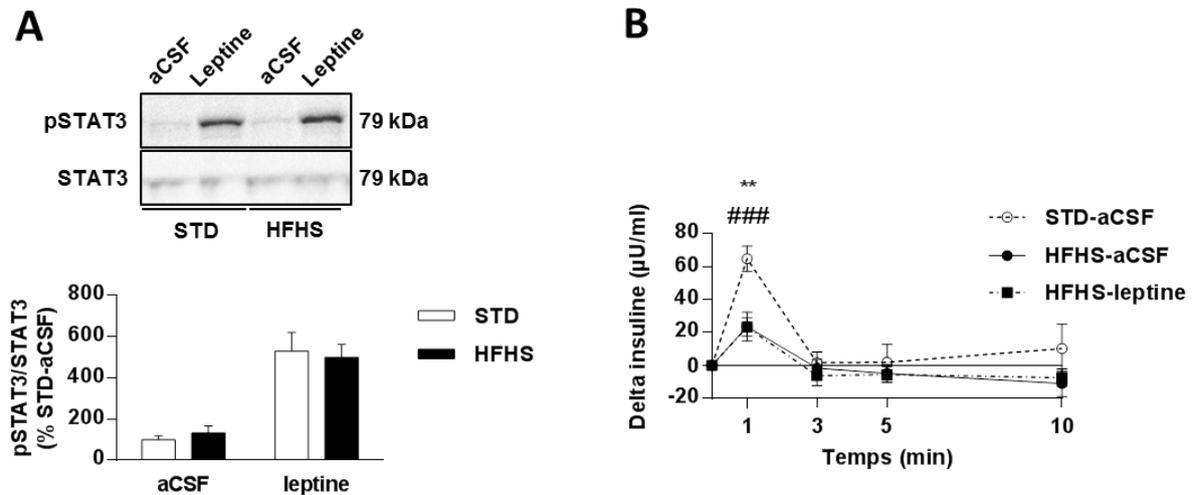
La fission mitochondriale est un mécanisme très complexe qui implique de nombreuses modifications post-traductionnelles (Archer, 2013). Parmi ces modifications, la phosphorylation de DRP1 permet son adressage à la mitochondrie. De plus, récemment, une étude a montré que l'AMPK est impliqué dans la phosphorylation de DRP1, modulant ainsi sa translocation (Wikstrom *et al.*, 2013). Ces travaux ont en effet montré qu'une augmentation de la forme active de l'AMPK (forme phosphorylée) bloque la phosphorylation de DRP1 et aboutit à un réseau mitochondrial tubulaire. Dans ce contexte, nous avons fait l'hypothèse que l'AMPK, dont le niveau d'activation est sensible aux taux de glucose, pourrait être anormalement suractivée par le régime hypercalorique chez les rats HFHS et ainsi bloquer la translocation de DRP1.

Les résultats montrent que les rats HFHS présentent effectivement une augmentation significative du ratio pAMPK/AMPK dans le MBH (STD vs. HFHS : +120% ;  $p < 0,001$ ) (**Figure 39A**). L'injection aigue en ICV de l'inhibiteur de l'AMPK, le Compound C (CC) chez ces animaux permet un retour à la normale du ratio pAMPK/AMPK (HFHS-aCSF =  $220,9 \pm 17,3$  vs. HFHS-CC =  $134,7 \pm 7,6\%$  ;  $p < 0,001$  ; STD-aCSF vs. HFHS-CC :  $p = 0,112$ ) (**Figure 39A**). Cependant, la réversion du niveau d'AMPK phosphorylée ne permet pas de restaurer, même en partie, le pic d'insuline en réponse à l'injection intra-carotidienne de glucose chez les rats nourris avec le régime HFHS (insuline plasmatique 1 min après l'injection intra-carotidienne de glucose : STD-aCSF =  $64,7 \pm 7,7$  vs. HFHS-CC =  $16,0 \pm 15,1$   $\mu\text{U/ml}$  ;  $p < 0,01$ ) (**Figure 39B**).

Ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'activation de l'AMPK n'est pas, à elle seule, responsable de l'altération de la détection hypothalamique du glucose que nous observons chez les rats HFHS.

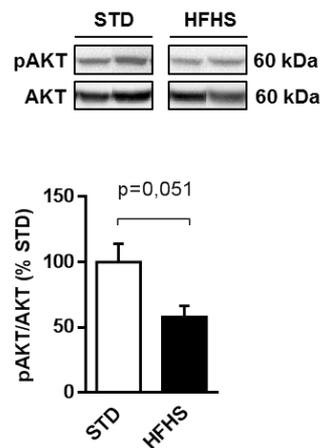
### b) Résistance centrale à la leptine et détection hypothalamique de l'hyperglycémie

Comme décrit dans la partie 1 des résultats, les rats HFHS présentent une forte augmentation de leur taux de leptine circulant (multiplié par 2). Notre seconde hypothèse a donc été que la leptine, dérégulée dans ce modèle, pouvait être à l'origine



**Figure 40 : La voie de signalisation de STAT3 n'est pas impliquée dans l'altération de la détection hypothalamique du glucose observée chez les rats HFHS**

(A) Analyse par WB et immunoblot représentatif de la forme phosphorylée et de la forme totale de STAT3 dans les MBH des rats STD et HFHS (n=6-7) injectés ou non avec la leptine. (B) Test de détection hypothalamique du glucose chez les rats STD et HFHS (n=6-7) injectés ou non avec la leptine. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM. Les \* représentent une différence significative entre les rats STD-aCSF et HFHS-aCSF ; les # représentent une différence significative entre les rats STD-aCSF et HFHS-leptine après analyse statistique par une ANOVA à deux facteurs sur mesures répétées ou non (\*\* p<0,01 ; ### p<0,001).



**Figure 41 : Les rats HFHS présentent une modification de la voie de signalisation impliquant AKT**

Analyse par WB et immunoblot représentatif de l'expression protéique de la forme phosphorylée sur la forme totale de AKT dans les MBH des rats STD et HFHS (n=6-7) en condition basale. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  SEM. Une forte tendance a été détectée après analyse statistique par un test de Man-Whitney (p=0,051).

du défaut de détection hypothalamique du glucose que nous observons. Ces rats ne présentent pas de modification de leur PA dans les 10 derniers jours de régime, suggérant le développement d'une résistance à la leptine au niveau central. Deux mécanismes peuvent être impliqués dans cette résistance : soit la leptine n'est pas capable d'atteindre sa cible, par une diminution du transport cérébral de l'hormone à travers la BHE, mais qui peut être réversée par une injection centrale de leptine, soit la leptine n'est plus capable d'induire sa cascade de signalisation, quel que soit le mode d'injection, dans quel cas la résistance se trouve aussi au niveau cellulaire (Münzberg and Myers, 2005).

Nous avons donc étudié la voie de signalisation de la leptine après une injection centrale de l'hormone, via l'état de phosphorylation de STAT3. Nos résultats montrent que chez les rats STD comme chez les rats HFHS, l'injection ICV de leptine induit la phosphorylation de STAT3 (STD-leptine =  $529,6 \pm 90,0$  vs. HFHS-leptine =  $500,1 \pm 62,3\%$ ;  $p=0,729$ ) (**Figure 40A**). Cependant, l'injection ICV de leptine et la restauration de la signalisation n'ont pas permis de restaurer le pic d'insuline lors d'un test de détection hypothalamique du glucose chez les rats nourris avec le régime HFHS (insuline plasmatique 1 min après l'injection intra-carotidienne de glucose : STD-aCSF =  $64,7 \pm 7,7$  vs. HFHS-leptine =  $23,3 \pm 5,4 \mu\text{U/ml}$  ;  $p < 0,001$ ) (**Figure 40B**).

Ces résultats indiquent qu'une éventuelle résistance à la leptine développée par les rats HFHS n'est pas impliquée dans l'altération de la détection hypothalamique du glucose.

### c) Résistance centrale à l'insuline et détection hypothalamique de l'hyperglycémie

Une autre hypothèse serait que les rats HFHS aurait développé une résistance centrale à l'insuline, malgré un taux circulant non modifié par rapport aux rats STD. Nous avons ainsi quantifié, en condition basale, le niveau de phosphorylation de AKT, voie de signalisation principale de l'insuline, mais aussi une des composantes des voies de signalisation de la leptine. Les résultats montrent une forte tendance à la diminution de l'activation d'AKT chez les rats HFHS (STD =  $100,0 \pm 13,8$  vs HFHS =  $57,8 \pm 20,7\%$  ;  $p=0,051$ ) (**Figure 41**), suggérant ainsi la présence d'une résistance centrale à l'insuline puisque AKT fait partie de la voie canonique de cette hormone.



# Discussion générale et perspectives

---

La détection hypothalamique du glucose est un mécanisme complexe qui participe au maintien de l'homéostasie glucidique, et plus généralement à l'équilibre énergétique de l'organisme. Elle permet la mise en place de réponses périphériques adaptées telles que la sécrétion d'insuline par le pancréas, ou la régulation de la PA.

Ces dernières années, notre équipe cherche à mettre en évidence les mécanismes moléculaires impliqués dans la détection centrale de l'hyperglycémie. Ainsi, il a été démontré que la signalisation par les mROS était indispensable à l'activation électrique du NA, évènement clé pour la mise en place des réponses périphériques (Leloup *et al.*, 2006). Cette signalisation redox a aussi été identifiée dans un autre type cellulaire gluco-sensible, la cellule  $\beta$  du pancréas (Leloup *et al.*, 2009; Pi *et al.*, 2007), mais dans les deux cas, les cibles de cette signalisation n'ont pas été identifiées (Leloup *et al.*, 2011). Toutefois, des travaux en cours dans l'équipe s'orientent vers l'implication des canaux TRP-C à conductance cationique, dont l'activité est, entre autre, sensible aux ROS.

En parallèle, de nombreuses études ont mis en évidence l'existence d'une étroite relation entre la morphologie mitochondriale et la production de mROS, *in vitro*, et leur implications dans les réponses à l'hyperglycémie (Yu *et al.*, 2006, 2008, 2011). Notre équipe a également montré l'existence de ces mêmes relations dans l'hypothalamus lors de la détection du glucose, *in vivo*. (Carneiro *et al.*, 2012).

Mes travaux de thèses se sont intéressés à l'implication de l'ensemble de ces mécanismes, dans un modèle pathologique. En effet, notre équipe a montré qu'un modèle de rats génétiquement obèses et diabétiques présentaient une hypersensibilité au glucose, associé à une augmentation du stress oxydant et une diminution de la signalisation redox en réponse au glucose (Colombani *et al.*, 2009). De plus, le lien entre le développement d'une insulino-résistance et l'installation d'un stress oxydant a largement été montré, et ces dernières années, l'étude de la morphologie mitochondriale dans l'hypothalamus apparait comme un élément important dans la régulation de l'homéostasie énergétique.



### ***L'exposition au régime HFHS pendant seulement 3 semaines est suffisant pour induire un phénotype pré-diabétique***

Afin d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués lors de l'installation d'un défaut de la détection hypothalamique du glucose, nous avons développé un modèle de rats susceptibles de développer obésité et diabète, suite à l'exposition à un régime gras enrichi en saccharose. Il a très récemment été montré que l'exposition de rats à un régime hypercalorique induisait le développement d'une altération de la détection hypothalamique du glucose (de Andrade *et al.*, 2015). Cependant, contrairement à cette étude, nous n'avons utilisé que des rats mâles afin de nous affranchir des effets induits par les cycles hormonaux chez la femelle. Pour notre étude, seulement 3 semaines de régime HFHS était suffisantes pour induire les défauts cérébraux recherchés, alors que l'étude de de Andrade *et al.* a été réalisée chez des animaux après 8 semaines de régime. Ainsi, à l'issue de cette courte période de régime, notre modèle de rats présentait toutes les caractéristiques d'un phénotype pré-diabétique, avec une hyperglycémie à jeun sans modification de leur insulïnémie, une intolérance au glucose et une sensibilité à l'insuline normale.

### ***Les rats HFHS présentent une altération précoce de la détection hypothalamique du glucose qui pourrait être responsable du développement d'un phénotype pré-diabétique***

Le prérequis de notre modèle était donc le développement précoce d'une altération de la détection hypothalamique du glucose. Ainsi, une injection intra-carotidienne de glucose, à une dose induisant une hyperglycémie uniquement cérébrale a été préalablement montrée comme capable d'induire une sécrétion d'insuline par un contrôle nerveux parasympathique chez des rats contrôles (Leloup *et al.*, 2006; Niiijima, 1975). Or, cette dose n'est plus capable d'induire ces réponses chez les rats HFHS. En effet, le pic de sécrétion d'insuline lors du test était fortement diminué suite à l'injection intra-carotidienne de glucose. De plus, nous avons observé une forte diminution du tonus parasympathique, mesuré sur la branche thoracique du nerf vague le long de l'artère carotide.

Ce défaut précoce de sécrétion d'insuline, observé lors du test de détection hypothalamique du glucose semble avoir pour origine l'hypothalamus. En effet, les cellules  $\beta$  du pancréas des rats HFHS étaient toujours capables de sécréter de l'insuline,



et dans les mêmes concentrations que les rats STD, lorsque les îlots isolés étaient incubés avec des concentrations croissantes de glucose. De plus, l'étude *in vitro* de l'activation des neurones HGE de l'hypothalamus, en réponse à une augmentation de la concentration de glucose, a montré une diminution de la détection du glucose chez les rats HFHS comparés aux rats STD. Ainsi, la diminution de la capacité de détection du glucose par les neurones HGE de l'hypothalamus pourrait être responsable de l'absence de stimulation du tonus parasympathique, mesurée *in vivo*, suite à l'hyperglycémie cérébrale. Les cellules  $\beta$  du pancréas ne seraient pas suffisamment stimulées par la libération de neurotransmetteurs d'origine vagale (acétylcholine, NPY, PYY...), qui se lie aux récepteurs muscariniques de type M3 (pour l'acétylcholine) pour déclencher la sécrétion d'insuline.

La détection hypothalamique du glucose est d'une grande importance en ce qui concerne la régulation de l'homéostasie énergétique. En effet, il a été montré que l'inhibition de la détection du glucose via un inhibiteur de la glucokinase (GK) dans l'hypothalamus induit une intolérance au glucose (Osundiji *et al.*, 2012). Ainsi, l'injection ICV de glucosamine (atteignant l'hypothalamus), bloquant l'activité de l'enzyme GK, dont le rôle est normalement de transformer le glucose en glucose-6-phosphate (première étape de métabolisation du glucose après son entrée dans la cellule), induit une intolérance au glucose, de façon similaire à celle observée chez nos rats HFHS. Cette étude montre l'importance de la détection hypothalamique de l'hyperglycémie pour la régulation de l'homéostasie énergétique et implique que l'altération de la détection hypothalamique du glucose observée chez les rats HFHS pourrait être seule responsable de leur phénotype pré-diabétique.

### *L'implication d'un défaut de signalisation redox dans l'altération de la détection hypothalamique du glucose serait la conséquence d'un défaut de la dynamique mitochondriale*

Nos résultats montrent que l'injection intra-carotidienne de glucose n'est plus capable d'induire une production hypothalamique de ROS chez les rats HFHS, contrairement aux rats STD. Ce défaut de signalisation redox n'est pas associé à l'existence d'un stress oxydant au niveau hypothalamique, attesté par un état redox normal du glutathion. Ainsi, le défaut de cette signalisation serait dû à une diminution de la production de ROS, et non à l'augmentation des défenses antioxydantes.



Nous avons précédemment montré que la signalisation redox observée lors d'une hyperglycémie était d'origine mitochondriale (Leloup *et al.*, 2006). Nous avons alors exploré le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale par une technique d'oxygraphie, et les résultats montrent une diminution de la consommation d'O<sub>2</sub>, en partie lorsque le complexe II est stimulé, mais surtout lorsque la vitesse de transfert des électrons est limité par l'activité du complexe V (production d'ATP).

Une diminution de l'activité du complexe II de la chaîne respiratoire a déjà été reportée dans le muscle cardiaque suite à l'exposition d'un régime HFHS chez la souris (Sverdlov *et al.*, 2014). Cependant, dans cette étude, les souris sont exposées au régime pendant 8 mois, induisant un statut oxydant fortement réduit comme attesté par l'augmentation du rapport GSH/GSx. Les auteurs ont également montré que l'activité du complexe II était régulée par l'oxydation réversible des cystéines présentes dans sa composition de façon ROS-dépendante, et la modification du statut oxydant serait responsable de la diminution de l'activité du complexe II. Cette hypothèse ne s'applique donc pas dans notre cas puisque nous n'observons pas de modification du statut oxydant chez nos rats HFHS. On peut toutefois émettre l'hypothèse que l'enrichissement du régime alimentaire en lipides conduit, via un mécanisme indéterminé, à l'altération du complexe II (dont le rôle est d'activer la chaîne respiratoire mitochondriale par l'oxydation du FADH<sub>2</sub>, produit majoritaire comparé au NADH, H<sup>+</sup> lors de l'oxydation des lipides) et finalement perturbe la production de ROS normalement nécessaire à la détection centrale du glucose. Une hypothèse pourrait être celle de la modification des contenus en lipides des membranes internes des mitochondries, dont on sait que la composition est primordiale pour la bonne disposition des crêtes, l'insertion des complexes et leurs interactions.

L'activité du complexe V est quant à lui principalement régulé par l'assemblage spatial des complexes de la chaîne respiratoire (Cogliati *et al.*, 2013). Ainsi, lors d'une hyperglycémie, la formation de super-complexes augmente la capacité de synthèse d'ATP. Ces modifications conformationnelles sont aussi dépendantes de la dynamique mitochondriale, permettant la réorganisation des crêtes internes de la mitochondrie. Pour vérifier cette hypothèse, l'étude de l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale par western blot 2D serait nécessaire. Cette technique consiste à séparer une première fois les protéines en condition native (non dénaturante) afin de conserver l'assemblage des complexes. Une deuxième séparation, en condition



dénaturante cette fois-ci dans une 2<sup>e</sup> dimension, permet de déterminer quels complexes étaient assemblés entre eux. Ainsi, il serait possible qu'un défaut de dynamique mitochondriale ne permette pas un assemblage adéquat des complexes de la chaîne respiratoire et serait responsable d'une diminution de la respiration mitochondriale chez les rats HFHS.

Dans le but de vérifier qu'un défaut de la dynamique mitochondriale pourrait être impliqué dans la diminution de la production de ROS en réponse au glucose chez les rats HFHS, nous avons étudié un mécanisme impliqué dans la fission mitochondriale, l'adressage de la protéine DRP1 à la mitochondrie. Notre équipe a préalablement montré que ce processus était indispensable à la détection hypothalamique du glucose en condition normale. En effet, des rats injectés avec des ARN interférents contre DRP1 dans l'hypothalamus (induisant une diminution du nombre de mitochondries par cellule, caractéristique d'un réseau mitochondriale fusionné), présentaient une diminution de l'adressage de DRP1 à la mitochondrie et de la production de ROS en réponse à l'hyperglycémie, associés à la diminution du contrôle nerveux de la sécrétion d'insuline (Carneiro *et al.*, 2012). Ainsi, chez nos rats HFHS, l'adressage de DRP1 était diminué suite à l'injection intra-carotidienne de glucose, comparé aux rats STD. Cependant, afin de vérifier si ce défaut d'adressage de la protéine a effectivement une conséquence sur l'état dynamique du réseau mitochondrial, un contrôle histologique aurait été nécessaire afin de vérifier l'état du réseau mitochondrial. En effet, l'état du réseau dépend d'un équilibre entre les forces de fission et de fusion, et même si nos résultats aboutissent à une diminution de la fission mitochondriale, on ne peut pas conclure sur une modification de la morphologie des mitochondries. Pour vérifier cette hypothèse, et bien qu'on ne connaisse pas tous les types cellulaires impliqués dans la détection hypothalamique du glucose, il serait possible de co-localiser un marqueur mitochondrial, TOM-20, avec un marqueur d'activation cellulaire, c-Fos, dans le but d'évaluer l'état dynamique des mitochondries suite à l'hyperglycémie cérébrale uniquement dans les cellules sensibles à l'hyperglycémie. Le marqueur TOM-20 a déjà été utilisé pour évaluer la morphologie des mitochondries dans les neurones POMC de souris invalidées par MFN2 (Schneeberger *et al.*, 2013) et l'activation c-Fos dans l'hypothalamus de rats a déjà été observé dans notre équipe suite à l'injection intra-carotidienne de glucose (Guillod-maximin *et al.*, 2004). Cette expérience pourrait donner une information supplémentaire sur l'importance de la morphologie mitochondriale



dans la détection hypothalamique du glucose et valider définitivement la corrélation entre morphologie et défaut de l'adressage de DRP1.

*Un état suractivé de l'AMPK ainsi que le développement d'une résistance centrale à la leptine ne seraient pas responsables de l'altération de la détection hypothalamique du glucose chez les rats HFHS*

L'adressage de DRP1 est régulé par de nombreuses modifications post-traductionnelles, dont une des étapes est l'état de phosphorylation. Or, il a récemment été montré que l'activation de l'AMPK empêche indirectement la phosphorylation de DRP1, inhibant son adressage à la mitochondrie (Wikstrom *et al.*, 2013). Nos résultats montrent que l'AMPK est effectivement fortement activé dans l'hypothalamus des rats HFHS comparés aux rats STD. Cependant, l'inhibition de l'AMPK par l'injection ICV de composé C n'a pas permis de rétablir la sécrétion d'insuline en réponse à l'hyperglycémie cérébrale. Ce résultat montre que l'état suractivé de l'AMPK ne serait pas responsable de l'altération de la détection hypothalamique du glucose chez les rats HFHS, et si l'adressage de DRP1 est la cause de ce défaut, alors l'AMPK suractivée ne serait pas impliquée

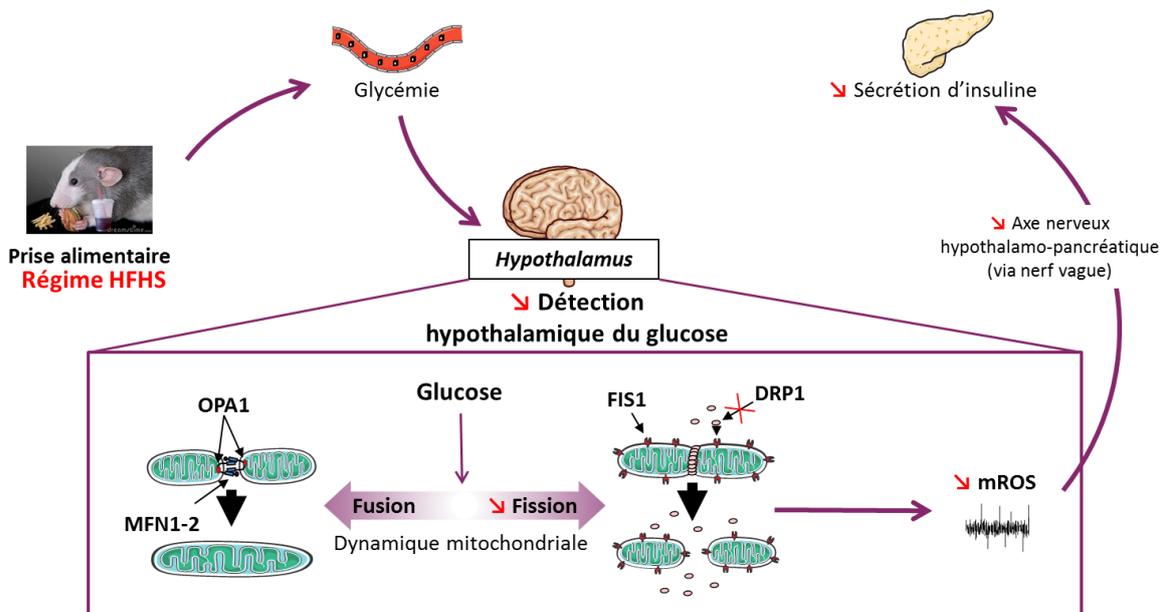
L'activité de l'AMPK dans l'hypothalamus est inhibée par les signaux anorexigènes, tels que l'insuline ou la leptine (Claret *et al.*, 2007). Bien que nous n'ayons pas observé de modification du taux plasmatique d'insuline, celui de la leptine a été multiplié par deux chez les rats HFHS par rapport aux rats STD. Or, nous n'observons pas de modification de la PA dans les 10 derniers jours de régime entre les rats HFHS et les rats STD, montrant que la leptine n'applique pas son effet anorexigène chez les rats HFHS. Ces données suggèrent que les rats aient développé une résistance centrale à la leptine (Münzberg and Myers, 2005). Plusieurs études ont déjà montré que l'exposition à un régime hypercalorique diminue la capacité de la leptine à atteindre sa cible au niveau central (Caro *et al.*, 1996; Ottaway *et al.*, 2015). Dans ce cas, l'injection centrale de leptine permet de rétablir son action. Nous avons donc injecté de la leptine en ICV et mesuré un des principaux acteurs de la voie de signalisation de la leptine, l'activité de STAT3. L'injection ICV de leptine chez les rats HFHS induit la même activation de STAT3 que chez les rats STD mais ne permet pas de rétablir la sécrétion d'insuline en réponse à l'hyperglycémie cérébrale chez les rats HFHS. Ce résultat montre qu'une éventuelle résistance centrale à la leptine n'est pas responsable de l'altération de la détection hypothalamique du glucose observée chez les rats HFHS.



Il est toutefois à noter que la leptine exerce aussi son action au niveau périphérique, notamment via l'inhibition directe de la sécrétion d'insuline. En effet, dans la cellule  $\beta$ , la voie de signalisation de la leptine inhibe aussi bien l'activation des canaux  $K_{ATP}$  induite par une stimulation par le glucose, mais aussi la voie calcique induite par la commande nerveuse via la liaison de l'acétylcholine sur le récepteur M3 (Amitani *et al.*, 2013; Gietzen, 1993; Kieffer and Habener, 2000; Seufert, 2004). Il serait alors possible que la restauration de la signalisation de la leptine, ou d'un niveau normal de l'activité de l'AMPK au niveau central, ne permette pas de restaurer la sécrétion d'insuline dû à l'effet inhibiteur de la leptine directement sur la cellule  $\beta$ . Cette hypothèse impliquerait l'absence de résistance périphérique à la leptine. Il aurait fallu mesurer l'activité parasympathique suite à l'injection simultanée de la leptine ou du composé C en ICV et du glucose en intra-carotide. Cela nous aurait ainsi permis de vérifier que les injections ICV n'étaient peut-être pas suffisantes pour rétablir la détection hypothalamique du glucose chez les rats HFHS. De plus, il serait intéressant de mesurer l'adressage de DRP1 lors de ces différents traitements ICV, afin d'établir un lien entre l'effet de ces injections et la morphologie mitochondriale.

L'injection d'une dose unique de leptine ne permet pas non plus de prouver l'existence d'une résistance centrale à la leptine. La dose est en effet relativement élevée (supra physiologique) et a peut-être permis d'induire la phosphorylation de STAT3 malgré une résistance cellulaire physiologique à la leptine (Münzberg and Myers, 2005). Ainsi, il est possible qu'une dose deux fois moins élevée révèle l'existence d'une résistance cellulaire à la leptine dans l'hypothalamus. Toutefois, la mise en place de dose-réponses dans notre modèle est extrêmement lourde et coûteuse. L'inconvénient de mesurer STAT3 est qu'il n'est détectable qu'au niveau protéique après stimulation par la leptine. Ainsi, on ne peut comparer le niveau d'activation de STAT3 au niveau basale chez les rats STD et HFHS (après l'injection ICV d'aCSF).

De plus, la PA n'est pas modifiée chez les rats HFHS dans les 10 derniers jours de régime. Or, l'augmentation significative de l'activation d'AMPK au niveau cérébrale devrait induire une augmentation de la PA. On peut alors faire l'hypothèse que l'augmentation parallèle du taux de leptine induit l'effet inverse, permettant une compensation entre le message orexigène de l'AMPK et anorexigène de la leptine. Cette hypothèse suggérerait finalement l'absence de résistance à la leptine.



**Figure 42 : Schéma de conclusion**

*L'exposition à un régime HFHS altère la détection hypothalamique du glucose (en rouge). Ainsi, l'hyperglycémie cérébrale ne déclenche pas la fission mitochondriale via l'adressage de DRP1, responsable d'une diminution de la production de mROS. L'axe nerveux hypothalamo-pancréatique, via l'activation du tonus parasympathique, n'induit alors plus la sécrétion d'insuline.*

La mesure à l'état basal montre une diminution de l'activation de la protéine AKT chez les rats HFHS. AKT est un acteur issu de la convergence des voies de signalisation de la leptine et de l'insuline. Si on émet l'hypothèse que les rats HFHS ne présentent finalement pas de résistance à la leptine, il serait alors possible qu'ils aient développé une résistance centrale à l'insuline. Afin de tester cette hypothèse, de nouvelles expériences seraient nécessaires, notamment la mesure d'autres acteurs des voies de signalisation de la leptine et de l'insuline, respectivement PI3K et IRS.

Dans le but de réverser le phénotype observé chez les rats HFHS, de nombreuses autres pistes doivent encore être explorées. Ainsi, l'identification du « signal manquant », induit par le glucose et enclenchant l'adressage de DRP1, pourrait être une cible dérégulée dans le cadre du développement de pathologies métaboliques, autre que celles que nous avons testées. Le rétablissement de l'adressage de DRP1 en réponse au glucose démontrerait alors que les défauts observés de la signalisation ROS, l'activation du tonus parasympathique et finalement la sécrétion d'insuline sont des événements causatifs dans ce phénotype. Un premier pas consisterait à tester des doses de glucose plus importantes dans le test de détection hypothalamique du glucose (>9 mg/kg) ce qui pourrait améliorer la détection centrale de l'hyperglycémie chez les rats HFHS en augmentant l'adressage, mais ne permettrait pas toutefois de déterminer le « signal manquant ». Par ailleurs, à notre connaissance, si bloquer l'adressage de DRP1 est possible, il n'existe pas d'agent pharmacologique permettant d'induire sa translocation, ce qui aurait permis de valider que cette étape était importante (si la restauration, au moins partielle, des paramètres, avait pu être observée).

### *Conclusion*

En conclusion, ce travail de thèse nous a permis de mettre en évidence, pour la première fois, l'implication d'un défaut de la signalisation ROS associé à une inhibition d'un événement de la dynamique mitochondriale, l'adressage de la protéine DRP1 à la mitochondrie, dans l'altération de la détection hypothalamique du glucose, chez un modèle de rats pré-diabétiques dont le phénotype a été induit par l'exposition à un régime gras enrichi en saccharose (**Figure 42**).



# Communications scientifiques

---

## 1) Présentations

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

### a) Présentations orales

- Journées Francophones de Nutrition (JFN 2014) Bruxelles, Belgique  
« Modification précoce de la détection hypothalamique du glucose lors d'un régime gras et sucré : rôle de la dynamique mitochondriale »
- Forum des Jeunes Chercheurs (FJC 2014) Besançon, France.  
« Sensibilité hypothalamique au glucose chez le rat soumis à un régime gras enrichi en saccharose : rôle de la dynamique mitochondriale et des mROS »

### b) Posters

- Annual meeting of European Association for the Study of Diabetes (EASD 2014) Vienne, Autriche.  
« Alteration of hypothalamic glucose sensing in High Fat-High Sucrose diet fed rats: Early defects linked to mitochondrial dynamics and mROS signaling »
- Société Francophone du Diabète (SFD 2014) Paris, France.  
« Effet de l'exposition à un régime gras enrichi en saccharose sur la sensibilité hypothalamique au glucose chez le rat »
- Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité (AFERO 2014), Dijon, France.  
« Effet de l'exposition à un régime gras enrichi en saccharose sur la sensibilité hypothalamique au glucose chez le rat : rôle de la dynamique mitochondriale »
- Forum des Jeunes Chercheurs (FJC 2013) Dijon, France. Prix du meilleur poster  
« Effet d'un régime gras enrichi en saccharose sur la détection hypothalamique du glucose »



## 2) Participation à des travaux de recherche

Au cours de ma thèse, j'ai également participé à d'autres études, dans le cadre de collaborations.

- Une étude menée par Lionel Carneiro *et al.*, dans l'équipe, sur l'effet de la ghréline sur l'altération de la détection hypothalamique du glucose, via la diminution de la respiration mitochondriale et de la signalisation redox chez le rat. J'ai participé à la caractérisation du modèle de rats injectés avec un antagoniste du récepteur à la ghréline. Ce travail donnera lieu à la publication d'un article.
- Une étude réalisée par Na Li *et al.*, sur l'effet d'une restriction alimentaire chez l'adulte présentant des altérations oxydatives, métaboliques et cardiovasculaires induits par une sur-nutrition postnatale. Dans le cadre de cette étude, j'ai participé à l'élaboration d'un protocole d'oxygraphie sur le muscle cardiaque. Ce travail donnera lieu à la publication d'un article.
- Une étude menée par Sébastien Rivière *et al.*, sur l'effet d'un régime diabéto-gène, enrichi en fructose, sur l'épithélium olfactif et le comportement guidé par les odeurs chez la souris. J'ai ainsi participé à la mise en place et la réalisation de western blot afin de mesurer l'expression du récepteur à l'insuline dans l'épithélium olfactif des souris nourries avec le régime fructose comparé aux souris contrôles. Ce travail donnera lieu à la publication d'un article.



# Références

---

- Abizaid, A., and Horvath, T.L. (2008). Brain circuits regulating energy homeostasis. *Regul. Pept.* *149*, 3–10.
- Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M.L., Pérez-Martos, A., and Enriquez, J.A. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol. Cell* *32*, 529–539.
- Addis, P., Shecterle, L.M., and A. St. Cyr, J. (2012). Cellular Protection During Oxidative Stress: A Potential Role for D-ribose and Antioxidants. *J. Diet. Suppl.* *9*, 178–182.
- Alán, L., Smolková, K., Kronusová, E., Santorová, J., and Jezek, P. (2009). Absolute levels of transcripts for mitochondrial uncoupling proteins UCP2, UCP3, UCP4, and UCP5 show different patterns in rat and mice tissues. *J. Bioenerg. Biomembr.* *41*, 71–78.
- Allard, C., Carneiro, L., Collins, S.C., Chrétien, C., Grall, S., Pénicaud, L., and Leloup, C. (2013). Alteration of hypothalamic glucose and lactate sensing in 48h hyperglycemic rats. *Neurosci. Lett.* *534*, 75–79.
- Allard, C., Carneiro, L., Grall, S., Cline, B.H., Fioramonti, X., Chrétien, C., Baba-Aissa, F., Giaume, C., Pénicaud, L., and Leloup, C. (2014). Hypothalamic astroglial connexins are required for brain glucose sensing-induced insulin secretion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *34*, 339–346.
- Alquier, T., Leloup, C., Atef, N., Fioramonti, X., Lorsignol, A., and Pénicaud, L. (2003). Cerebral insulin increases brain response to glucose. *J. Neuroendocrinol.* *15*, 75–79.
- Alvarez, E., Roncero, I., Chowen, J.A., Vázquez, P., and Blázquez, E. (2002). Evidence that glucokinase regulatory protein is expressed and interacts with glucokinase in rat brain. *J. Neurochem.* *80*, 45–53.
- Amiel, S. (1991). Glucose counter-regulation in health and disease: current concepts in hypoglycaemia recognition and response. *Q. J. Med.* *80*, 707–727.
- Amitani, M., Asakawa, A., Amitani, H., and Inui, A. (2013). The role of leptin in the control of insulin-glucose axis. *Front. Neurosci.* *7*, 1–12.
- Anand, B.K., and Brobeck, J.R. (1951). Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J. Biol. Med.* *24*, 123–140.
- Anand, B.K., Chhina, G.S., Sharma, K.N., Dua, S., and Singh, B. (1964). Activity of single neurons in the hypothalamic feeding centers: effect of glucose. *Am. J. Physiol.* *207*, 1146–1154.
- 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., and Ribeiro, E.B. (2015). Diet-induced obesity impairs hypothalamic glucose sensing but not glucose hypothalamic extracellular levels, as measured by microdialysis. *Nutr. Diabetes* *5*, e162.
- Andrews, Z.B., Diano, S., and Horvath, T.L. (2005). Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: in support of function and survival. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 829–840.
- Andrews, Z.B., Liu, Z.-W., Wallingford, N., Erion, D.M., Borok, E., Friedman, J.M., Tschöp, M.H., Shanabrough, M., Cline, G., Shulman, G.I., *et al.* (2008). UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* *454*, 846–851.
- Archer, S.L. (2013). Mitochondrial dynamics--mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N. Engl. J. Med.* *369*, 2236–2251.



- Arletti, R., Benelli, A., and Bertolini, A. (1990). Oxytocin inhibits food and fluid intake in rats. *Physiol. Behav.* *48*, 825–830.
- Arluison, M., Quignon, M., Nguyen, P., Thorens, B., Leloup, C., and Penicaud, L. (2004a). Distribution and anatomical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain--an immunohistochemical study. *J. Chem. Neuroanat.* *28*, 117–136.
- Arluison, M., Quignon, M., Thorens, B., Leloup, C., and Penicaud, L. (2004b). Immunocytochemical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain. II. Electron microscopic study. *J. Chem. Neuroanat.* *28*, 137–146.
- Atalayer, D., Robertson, K.L., Haskell-Luevano, C., Andreasen, A., and Rowland, N.E. (2010). Food demand and meal size in mice with single or combined disruption of melanocortin type 3 and 4 receptors. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *298*, R1667–R1674.
- Atef, N., Ktorza, A., and Pénicaud, L. (1995). CNS involvement in the glucose induced increase of islet blood flow in obese Zucker rats. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* *19*, 103–107.
- Atef, N., Laury, M.C., N'Guyen, J.M., Mokhtar, N., Ktorza, a., and Penicaud, L. (1997). Increased pancreatic islet blood flow in 48-hour glucose-infused rats: Involvement of central and autonomic nervous systems. *Endocrinology* *138*, 1836–1840.
- Avshalumov, M. V, and Rice, M.E. (2003). Activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> (K(ATP)) channels by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> underlies glutamate-dependent inhibition of striatal dopamine release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 11729–11734.
- Babior, B.M. (2004). NADPH oxidase. *Curr. Opin. Immunol.* *16*, 42–47.
- Bach, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Dugaard, J.R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J.R., *et al.* (2003). Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J. Biol. Chem.* *278*, 17190–17197.
- Bagnol, D., Lu, X.Y., Kaelin, C.B., Day, H.E., Ollmann, M., Gantz, I., Akil, H., Barsh, G.S., and Watson, S.J. (1999). Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *J. Neurosci.* *19*, RC26.
- Balkan, B., and Dunning, B.E. (1994). Glucosamine inhibits glucokinase *in vitro* and produces a glucose-specific impairment of *in vivo* insulin secretion in rats. *Diabetes* *43*, 1173–1179.
- Banks, W.A. (2004). The source of cerebral insulin. *Eur. J. Pharmacol.* *490*, 5–12.
- Barson, J.R., Morganstern, I., and Leibowitz, S.F. (2013). Complementary roles of orexin and melanin-concentrating hormone in feeding behavior. *Int. J. Endocrinol.* *2013*, 983964.
- Barsoum, M.J., Yuan, H., Gerencser, A.A., Liot, G., Kushnareva, Y., Gräber, S., Kovacs, I., Lee, W.D., Waggoner, J., Cui, J., *et al.* (2006). Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPases in neurons. *EMBO J.* *25*, 3900–3911.
- Battey, J., and Clayton, D. a (1978). The transcription map of mouse mitochondrial DNA. *Cell* *14*, 143–156.
- Bélanger, M., Allaman, I., and Magistretti, P.J. (2011). Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab.* *14*, 724–738.



Benani, A., Troy, S., Carmona, M.C., Fioramonti, X., Lorsignol, A., Leloup, C., Casteilla, L., and Pénicaud, L. (2007). Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: redox regulation of food intake. *Diabetes* 56, 152–160.

Benoit, C., Ould-Hamouda, H., Crepin, D., Gertler, A., Amar, L., and Taouis, M. (2013). Early leptin blockade predisposes fat-fed rats to overweight and modifies hypothalamic microRNAs. *J. Endocrinol.* 218, 35–47.

Benoit, S.C., Air, E.L., Coolen, L.M., Strauss, R., Jackman, A., Clegg, D.J., Seeley, R.J., and Woods, S.C. (2002). The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J. Neurosci.* 22, 9048–9052.

Benoit, S.C., Clegg, D.J., Seeley, R.J., and Woods, S.C. (2004). Insulin and leptin as adiposity signals. *Recent Prog. Horm. Res.* 59, 267–285.

Benomar, Y., Naour, N., Aubourg, A., Bailleux, V., Gertler, A., Djiane, J., Guerre-Millo, M., and Taouis, M. (2006). Insulin and leptin induce Glut4 plasma membrane translocation and glucose uptake in a human neuronal cell line by a phosphatidylinositol 3-kinase- dependent mechanism. *Endocrinology* 147, 2550–2556.

Bereiter-Hahn, J., and Vöth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Tech.* 27, 198–219.

Bergendi, L., Benes, L., Duracková, Z., and Ferencik, M. (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* 65, 1865–1874.

Berthoud, H.-R. (2002). Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 393–428.

Billington, C.J., Briggs, J.E., Grace, M., and Levine, S. (1991). Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *Am. J. Physiol.* 260, R321–R327.

Björntorp, P. (1997). Body fat distribution, insulin resistance, and metabolic diseases. *Nutrition* 13, 795–803.

Blanco Martínez de Morentin, P., González, C.R., Saha, A.K., Martins, L., Diéguez, C., Vidal-Puig, A., Tena-Sempere, M., and López, M. (2011). Hypothalamic AMP-activated protein kinase as a mediator of whole body energy balance. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 12, 127–140.

Blouet, C., and Schwartz, G.J. (2010). Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behav. Brain Res.* 209, 1–12.

Blouet, C., Jo, Y.-H., Li, X., and Schwartz, G.J. (2009). Mediobasal hypothalamic leucine sensing regulates food intake through activation of a hypothalamus-brainstem circuit. *J. Neurosci.* 29, 8302–8311.

Bolborea, M., and Dale, N. (2013). Hypothalamic tanycytes: potential roles in the control of feeding and energy balance. *Trends Neurosci.* 36, 91–100.

Boldogh, I.R., and Pon, L.A. (2007). Mitochondria on the move. *Trends Cell Biol.* 17, 502–510.

Bolisetty, S., and Jaimes, E. a (2013). Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 6306–6344.



- Borg, M.A., Sherwin, R.S., Borg, W.P., Tamborlane, W. V, and Shulman, G.I. (1997). Local ventromedial hypothalamus glucose perfusion blocks counterregulation during systemic hypoglycemia in awake rats. *J. Clin. Invest.* *99*, 361–365.
- Borg, W.P., During, M.J., Sherwin, R.S., Borg, M.A., Brines, M.L., and Shulman, G.I. (1994). Ventromedial hypothalamic lesions in rats suppress counterregulatory responses to hypoglycemia. *J. Clin. Invest.* *93*, 1677–1682.
- Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P., and Giacobino, J.P. (1997). Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett.* *408*, 39–42.
- Boughton, C.K., and Murphy, K.G. (2013). Can neuropeptides treat obesity? A review of neuropeptides and their potential role in the treatment of obesity. *Br. J. Pharmacol.* *170*, 1333–1348.
- Brand, M.D., Affourtit, C., Esteves, T.C., Green, K., Lambert, A.J., Miwa, S., Pakay, J.L., and Parker, N. (2004). Mitochondrial superoxide: Production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic. Biol. Med.* *37*, 755–767.
- Brandes, N., Schmitt, S., and Jakob, U. (2009). Thiol-based redox switches in eukaryotic proteins. *Antioxid. Redox Signal.* *11*, 997–1014.
- Breen, D.M., Rasmussen, B. a., Cote, C.D., Jackson, V.M., and Lam, T.K. (2013). Nutrient-Sensing Mechanisms in the Gut as Therapeutic Targets for Diabetes. *Diabetes* *62*, 3005–3013.
- Bresgen, N., and Eckl, P.M. (2015). Oxidative stress and the homeodynamics of iron metabolism. *Biomolecules* *5*, 808–847.
- de Brito, O.M., and Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* *456*, 605–610.
- Brown, J.A., Woodworth, H.L., and Leininger, G.M. (2015). To ingest or rest? Specialized roles of lateral hypothalamic area neurons in coordinating energy balance. *Front. Syst. Neurosci.* *9*, 9.
- Brown, L.M., Clegg, D.J., Benoit, S.C., and Woods, S.C. (2006). Intraventricular insulin and leptin reduce food intake and body weight in C57BL/6J mice. *Physiol. Behav.* *89*, 687–691.
- Bruning, J.C. (2000). Role of Brain Insulin Receptor in Control of Body Weight and Reproduction. *Science* (80-. ). *289*, 2122–2125.
- Burté, F., Carelli, V., Chinnery, P.F., and Yu-Wai-Man, P. (2014). Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurol.* *11*, 11–24.
- Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J.P., Ravanat, J.L., and Sauvaigo, S. (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat. Res.* *424*, 9–21.
- Carneiro, L., Allard, C., Guissard, C., Fioramonti, X., Tourrel-Cuzin, C., Bailbé, D., Barreau, C., Offer, G., Nédélec, E., Salin, B., *et al.* (2012). Importance of mitochondrial dynamin-related protein 1 in hypothalamic glucose sensitivity in rats. *Antioxid. Redox Signal.* *17*, 433–444.
- Caro, J.F., Kolaczynski, J.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Opentanova, I., Goldman, W.H., Lynn, R.B., Zhang, P.L., Sinha, M.K., and Considine, R. V. (1996). Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: A possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* *348*, 159–161.



- Carvalho, C., Correia, S.C., Cardoso, S., Plácido, A.I., Candeias, E., Duarte, A.I., and Moreira, P.I. (2015). The role of mitochondrial disturbances in Alzheimer, Parkinson and Huntington diseases. *Expert Rev. Neurother.* *15*, 867–884.
- Casteilla, L., Rigoulet, M., and Pénicaud, L. (2001). Mitochondrial ROS metabolism: modulation by uncoupling proteins. *IUBMB Life* *52*, 181–188.
- Chai, Y., and Lin, Y.-F. (2010). Stimulation of neuronal KATP channels by cGMP-dependent protein kinase: involvement of ROS and 5-hydroxydecanoate-sensitive factors in signal transduction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *298*, C875–C892.
- Chance, B., and Williams, G.R. (1956). The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.* *17*, 65–134.
- Chang, G.-Q., Karatayev, O., Davydova, Z., and Leibowitz, S.F. (2004). Circulating triglycerides impact on orexigenic peptides and neuronal activity in hypothalamus. *Endocrinology* *145*, 3904–3912.
- Chen, A.S., Marsh, D.J., Trumbauer, M.E., Frazier, E.G., Guan, X.M., Yu, H., Rosenblum, C.I., Vongs, A., Feng, Y., Cao, L., *et al.* (2000). Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet* *26*, 97–102.
- Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., and Chan, D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* *160*, 189–200.
- Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Chen, A.S., Weingarth, D.T., Adams, J.R., Frazier, E.G., Shen, Z., Marsh, D.J., Feighner, S.D., Guan, X.-M., *et al.* (2004). Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology* *145*, 2607–2612.
- Chiang, Y.-Y., Chen, S.-L., Hsiao, Y.-T., Huang, C.-H., Lin, T.-Y., Chiang, I.-P., Hsu, W.-H., and Chow, K.-C. (2009). Nuclear expression of dynamin-related protein 1 in lung adenocarcinomas. *Mod. Pathol.* *22*, 1139–1150.
- Cho, S.-H., Lee, C.-H., Ahn, Y., Kim, H., Kim, H., Ahn, C.-Y., Yang, K.-S., and Lee, S.-R. (2004). Redox regulation of PTEN and protein tyrosine phosphatases in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediated cell signaling. *FEBS Lett.* *560*, 7–13.
- Choi, Y.-H., Fujikawa, T., Lee, J., Reuter, A., and Kim, K.W. (2013). Revisiting the Ventral Medial Nucleus of the Hypothalamus: The Roles of SF-1 Neurons in Energy Homeostasis. *Front. Neurosci.* *7*, 71.
- Ciofi, P., Garret, M., Lapirot, O., Lafon, P., Loyens, A., Prévot, V., and Levine, J.E. (2009). Brain-endocrine interactions: a microvascular route in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* *150*, 5509–5519.
- Claret, M., Smith, M.A., Batterham, R.L., Selman, C., Choudhury, A.I., Fryer, L.G.D., Clements, M., Al-Qassab, H., Heffron, H., Xu, A.W., *et al.* (2007). AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *J. Clin. Invest.* *117*, 2325–2336.
- Clegg, D.J., Gotoh, K., Kemp, C., Wortman, M.D., Benoit, S.C., Brown, L.M., D'Alessio, D., Tso, P., Seeley, R.J., and Woods, S.C. (2011). Consumption of a high-fat diet induces central insulin resistance independent of adiposity. *Physiol. Behav.* *103*, 10–16.



- Clément, L., Cruciani-Guglielmacci, C., Magnan, C., Vincent, M., Douared, L., Orosco, M., Assimacopoulos-Jeannet, F., Pénicaud, L., and Ktorza, A. (2002). Intracerebroventricular infusion of a triglyceride emulsion leads to both altered insulin secretion and hepatic glucose production in rats. *Pflugers Arch.* *445*, 375–380.
- Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M.E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., Cipolat, S., Costa, V., Casarin, A., Gomes, L.C., *et al.* (2013). Mitochondrial Cristae Shape Determines Respiratory Chain Supercomplexes Assembly and Respiratory Efficiency. *Cell* *155*, 160–171.
- Cogliati, S., Enriquez, J.A., and Scorrano, L. (2016). Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends Biochem. Sci.* *xx*, 1–13.
- Coll, A.P., and Loraine Tung, Y.C. (2009). Pro-opiomelanocortin (POMC)-derived peptides and the regulation of energy homeostasis. *Mol. Cell. Endocrinol.* *300*, 147–151.
- Coll, A.P., and Yeo, G.S. (2013). The hypothalamus and metabolism: integrating signals to control energy and glucose homeostasis. *Curr. Opin. Pharmacol.* *13*, 970–976.
- Colombani, A., Carneiro, L., Benani, A., Galinier, A., Jaillard, T., Duparc, T., Offer, G., Lorsignol, A., Magnan, C., Casteilla, L., *et al.* (2009). Enhanced hypothalamic glucose sensing in obesity: alteration of redox signaling. *Diabetes* *58*, 2189–2197.
- Cone, R.D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat. Neurosci.* *8*, 571–578.
- Cordeira, J., and Rios, M. (2011). Weighing in the role of BDNF in the central control of eating behavior. *Mol. Neurobiol.* *44*, 441–448.
- Cortese, J.D. (1998). Stimulation of rat liver mitochondrial fusion by an outer membrane-derived aluminum fluoride-sensitive protein fraction. *Exp. Cell Res.* *240*, 122–133.
- Cota, D., Proulx, K., Smith, K.A.B., Kozma, S.C., Thomas, G., Woods, S.C., and Seeley, R.J. (2006). Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* *312*, 927–930.
- Coughlan, K. a., Valentine, R.J., Ruderman, N.B., and Saha, A.K. (2014). AMPK activation: A therapeutic target for type 2 diabetes? *Diabetes, Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* *7*, 241–253.
- Cowdry, E. V, and Olitsky, P.K. (1922). DIFFERENCES BETWEEN MITOCHONDRIA AND BACTERIA. *J. Exp. Med.* *36*, 521–533.
- Cowley, M. a, Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdán, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., and Low, M.J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* *411*, 480–484.
- Cowley, M.A., Smith, R.G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K.L., Strasburger, C.J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M.L., *et al.* (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* *37*, 649–661.
- Cruciani-Guglielmacci, C., Hervalet, A., Douared, L., Sanders, N.M., Levin, B.E., Ktorza, A., and Magnan, C. (2004). Beta oxidation in the brain is required for the effects of non-esterified fatty acids on glucose-induced insulin secretion in rats. *Diabetologia* *47*, 2032–2038.



- Cruciani-Guglielmacci, C., Vincent-Lamon, M., Rouch, C., Orosco, M., Ktorza, A., and Magnan, C. (2005). Early changes in insulin secretion and action induced by high-fat diet are related to a decreased sympathetic tone. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *288*, E148–E154.
- Dan Dunn, J., Alvarez, L.A., Zhang, X., and Soldati, T. (2015). Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol.* *6*, 472–485.
- Davies, V.J., Hollins, A.J., Piechota, M.J., Yip, W., Davies, J.R., White, K.E., Nicols, P.P., Boulton, M.E., and Votruba, M. (2007). Opa1 deficiency in a mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function. *Hum. Mol. Genet.* *16*, 1307–1318.
- Davis, A.F. (1996). In situ localization of mitochondrial DNA replication in intact mammalian cells. *J. Cell Biol.* *135*, 883–893.
- Davis, J.D., Wirtshafter, D., Asin, K.E., and Brief, D. (1981). Sustained intracerebroventricular infusion of brain fuels reduces body weight and food intake in rats. *Science* *212*, 81–83.
- Della-Zuana, O., Presse, F., Ortola, C., Duhault, J., Nahon, J.L., and Levens, N. (2002). Acute and chronic administration of melanin-concentrating hormone enhances food intake and body weight in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* *26*, 1289–1295.
- Dennis, P.B., Jaeschke, A., Saitoh, M., Fowler, B., Kozma, S.C., and Thomas, G. (2001). Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* *294*, 1102–1105.
- Diano, S. (2013). Role of reactive oxygen species in hypothalamic regulation of energy metabolism. *Endocrinol. Metab. (Seoul, Korea)* *28*, 3–5.
- Diano, S., and Horvath, T.L. (2012). Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in glucose and lipid metabolism. *Trends Mol. Med.* *18*, 52–58.
- Dietrich, M.O., and Horvath, T.L. (2009). Feeding signals and brain circuitry. *Eur. J. Neurosci.* *30*, 1688–1696.
- Dietrich, M.O., and Horvath, T.L. (2010). The role of mitochondrial uncoupling proteins in lifespan. *Pflugers Arch.* *459*, 269–275.
- Dietrich, M.O., and Horvath, T.L. (2013). Hypothalamic control of energy balance: insights into the role of synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* *36*, 65–73.
- Dietrich, M.O., Liu, Z.-W., and Horvath, T.L. (2013). Mitochondrial Dynamics Controlled by Mitofusins Regulate Agrp Neuronal Activity and Diet-Induced Obesity. *Cell* *155*, 188–199.
- Dinuzzo, M., Mangia, S., Maraviglia, B., and Giove, F. (2012). The role of astrocytic glycogen in supporting the energetics of neuronal activity. *Neurochem. Res.* *37*, 2432–2438.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* *82*, 47–95.
- Drougard, A., Fournel, A., Valet, P., and Knauf, C. (2015). Impact of hypothalamic reactive oxygen species in the regulation of energy metabolism and food intake. *Front. Neurosci.* *9*, 1–12.
- Dryden, S., Pickavance, L., Henderson, L., and Williams, G. (1998). Hyperphagia induced by hypoglycemia in rats is independent of leptin and hypothalamic neuropeptide Y (NPY). *Peptides* *19*, 1549–1555.
- Dube, M.G., Kalra, S.P., and Kalra, P.S. (1999). Food intake elicited by central administration of orexins/hypocretins: identification of hypothalamic sites of action. *Brain Res.* *842*, 473–477.



Duboff, B., Feany, M., and Götz, J. (2013). Why size matters - balancing mitochondrial dynamics in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 1–11.

Dunlop, M.E., and Muggli, E.E. (2000). Extracellular matrix components cooperate to activate phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 931–937.

Dunn-Meynell, A. a., Routh, V.H., Kang, L., Gaspers, L., and Levin, B.E. (2002). Glucokinase is the likely mediator of glucosensing in both glucose-excited and glucose-inhibited central neurons. *Diabetes* 51, 2056–2065.

Dunn-Meynell, A.A., Rawson, N.E., and Levin, B.E. (1998). Distribution and phenotype of neurons containing the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in rat brain. *Brain Res.* 814, 41–54.

Duret, H. (1874). *Recherches anatomiques sur la circulation de l'encéphale.*

Echtay, K.S., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabsons, M.B., Cadenas, S., Stuart, J.A., Harper, J.A., Roebuck, S.J., Morrison, A., Pickering, S., *et al.* (2002). Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 415, 96–99.

El-Haschimi, K., Pierroz, D.D., Hileman, S.M., Bjørnbæk, C., and Flier, J.S. (2000). Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* 105, 1827–1832.

Elizondo-Vega, R., Cortes-Campos, C., Barahona, M.J., Oyarce, K. a., Carril, C. a., and García-Robles, M. a. (2015). The role of tanycytes in hypothalamic glucosensing. *J. Cell. Mol. Med.* 19, n/a – n/a.

Ellacott, K.L.J., and Cone, R.D. (2006). The role of the central melanocortin system in the regulation of food intake and energy homeostasis: lessons from mouse models. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 361, 1265–1274.

Emsley, H.C.A., Young, C. a, and White, R.P. (2006). Circle of Willis variation in a complex stroke presentation: a case report. *BMC Neurol.* 6, 13.

Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., and Grodsky, G.M. (2003). Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 52, 1–8.

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

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

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

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

Fioramonti, X., Song, Z., Vazirani, R.P., Beuve, A., and Routh, V.H. (2011). Hypothalamic nitric oxide in hypoglycemia detection and counterregulation: a two-edged sword. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 505–517.



- Fisher-Wellman, K.H., Gilliam, L.A.A., Lin, C.-T., Cathey, B.L., Lark, D.S., and Neuffer, P.D. (2013). Mitochondrial glutathione depletion reveals a novel role for the pyruvate dehydrogenase complex as a key H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-emitting source under conditions of nutrient overload. *Free Radic. Biol. Med.* *65*, 1201–1208.
- Fliers, E., Kreier, F., Voshol, P.J., Havekes, L.M., Sauerwein, H.P., Kalsbeek, A., Buijs, R.M., and Romijn, J.A. (2003). White adipose tissue: getting nervous. *J. Neuroendocrinol.* *15*, 1005–1010.
- Flohé, L. (2013). The fairytale of the GSSG/GSH redox potential. *Biochim. Biophys. Acta* *1830*, 3139–3142.
- Fox, E.A., and Powley, T.L. (1985). Longitudinal columnar organization within the dorsal motor nucleus represents separate branches of the abdominal vagus. *Brain Res.* *341*, 269–282.
- Frayling, C., Britton, R., and Dale, N. (2011). ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanycytes. *J. Physiol.* *589*, 2275–2286.
- Frederich, R.C., Hamann, A., Anderson, S., Löllmann, B., Lowell, B.B., and Flier, J.S. (1995). Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat. Med.* *1*, 1311–1314.
- Fridlyand, L.E., and Philipson, L.H. (2010). Glucose sensing in the pancreatic beta cell: a computational systems analysis. *Theor. Biol. Med. Model.* *7*, 15.
- Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., and Voeltz, G.K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* *334*, 358–362.
- Fujikawa, T., Berglund, E.D., Patel, V.R., Ramadori, G., Vianna, C.R., Vong, L., Thorel, F., Chera, S., Herrera, P.L., Lowell, B.B., *et al.* (2013). Leptin engages a hypothalamic neurocircuitry to permit survival in the absence of insulin. *Cell Metab.* *18*, 431–444.
- Fujimoto, K., Sakata, T., Arase, K., Kurata, K., Okabe, Y., and Shiraishi, T. (1985). Administration of D-glucosamine into the third cerebroventricle induced feeding accompanied by hyperglycemia in rats. *Life Sci.* *37*, 2475–2482.
- Galinier, A., Carrière, A., Fernandez, Y., Carpené, C., André, M., Caspar-Bauguil, S., Thouvenot, J.-P., Périquet, B., Pénicaud, L., and Casteilla, L. (2006). Adipose tissue proadipogenic redox changes in obesity. *J. Biol. Chem.* *281*, 12682–12687.
- Gallagher, E.J., Leroith, D., and Karnieli, E. (2009). Insulin resistance in obesity as the underlying cause for the metabolic syndrome. *Mt. Sinai J. Med.* *77*, 511–523.
- Gandhi, G.K., Ball, K.K., Cruz, N.F., and Dienel, G.A. (2010). Hyperglycaemia and diabetes impair gap junctional communication among astrocytes. *ASN Neuro* *2*, e00030.
- Ganong, W.F. (2000). Circumventricular organs: Definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *27*, 422–427.
- Gao, Q., and Horvath, T.L. (2008). Neuronal control of energy homeostasis. *FEBS Lett.* *582*, 132–141.
- Gao, L., Ortega-Sáenz, P., García-Fernández, M., González-Rodríguez, P., Caballero-Eraso, C., and López-Barneo, J. (2014). Glucose sensing by carotid body glomus cells: potential implications in disease. *Front. Physiol.* *5*, 398.
- García, M.A., Millán, C., Balmaceda-Aguilera, C., Castro, T., Pastor, P., Montecinos, H., Reinicke, K., Zúñiga, F., Vera, J.C., Oñate, S.A., *et al.* (2003). Hypothalamic ependymal-glia cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *J. Neurochem.* *86*, 709–724.



Gardès-albert, M., Bonnefont-rousselot, D., Abedinzadeh, Z., and Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? Actual. Chim. 91–96.

Gaur, A., Pal, G.K., Ananthanarayanan, P.H., and Pal, P. (2014). Role of Ventromedial hypothalamus in high fat diet induced obesity in male rats: association with lipid profile, thyroid profile and insulin resistance. *Ann. Neurosci.* 21, 104–107.

Gautam, D., Han, S.-J., Hamdan, F.F., Jeon, J., Li, B., Li, J.H., Cui, Y., Mears, D., Lu, H., Deng, C., *et al.* (2006). A critical role for beta cell M3 muscarinic acetylcholine receptors in regulating insulin release and blood glucose homeostasis *in vivo*. *Cell Metab.* 3, 449–461.

Gerald, C., Walker, M.W., Criscione, L., Gustafson, E.L., Batzl-Hartmann, C., Smith, K.E., Vaysse, P., Durkin, M.M., Laz, T.M., Linemeyer, D.L., *et al.* (1996). A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake. *Nature* 382, 168–171.

Giacco, F., and Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* 107, 1058–1070.

Gietzen, D.W. (1993). Neural mechanisms in the responses to amino acid deficiency. *J. Nutr.* 123, 610–625.

Gilon, P., and Henquin, J. (2001). Mechanisms and Physiological Significance of the Cholinergic Control of Pancreatic  $\beta$ -Cell Function Mechanisms and Physiological Significance of the Cholinergic Control of Pancreatic  $\beta$ -Cell Function. *Online* 22, 565–604.

Giorgi, C., De Stefani, D., Bononi, A., Rizzuto, R., and Pinton, P. (2009). Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1817–1827.

Girard, J. (2003). [Contribution of free fatty acids to impairment of insulin secretion and action: mechanism of beta-cell lipotoxicity]. *Med. Sci. (Paris)*. 19, 827–833.

Godar, R., Dai, Y., Bainter, H., Billington, C., Kotz, C.M., and Wang, C.F. (2011). Reduction of high-fat diet-induced obesity after chronic administration of brain-derived neurotrophic factor in the hypothalamic ventromedial nucleus. *Neuroscience* 194, 36–52.

González-Sánchez, J.L., and Serrano-Ríos, M. (2007). Molecular basis of insulin action. *Drug News Perspect.* 20, 527–531.

Gosnell, B.A., Morley, J.E., and Levine, A.S. (1983). Adrenal modulation of the inhibitory effect of corticotropin releasing factor on feeding. *Peptides* 4, 807–812.

Griffin, E.E., Detmer, S. a, and Chan, D.C. (2006). Molecular mechanism of mitochondrial membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 482–489.

Grivennikova, V.G., and Vinogradov, a D. (2013). Mitochondrial production of reactive oxygen species. *Biochem. Biokhimiia* 78, 1490–1511.

Guan, J.-L., Uehara, K., Lu, S., Wang, Q.-P., Funahashi, H., Sakurai, T., Yanagizawa, M., and Shioda, S. (2002). Reciprocal synaptic relationships between orexin- and melanin-concentrating hormone-containing neurons in the rat lateral hypothalamus: a novel circuit implicated in feeding regulation. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 26, 1523–1532.



- Guillod-maximin, E., Lorsignol, A., Alquier, T., and Pénicaud, L. (2004). Acute intracarotid glucose injection towards the brain induces specific c-fos activation in hypothalamic nuclei: involvement of astrocytes in cerebral glucose-sensing in rats. *J. Neuroendocrinol.* *16*, 464–471.
- Gutteridge, J.M. (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem. Biol. Interact.* *91*, 133–140.
- Gyengesi, E., Paxinos, G., and Andrews, Z.B. (2012). Oxidative Stress in the Hypothalamus: the Importance of Calcium Signaling and Mitochondrial ROS in Body Weight Regulation. *Curr. Neuropharmacol.* *10*, 344–353.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M. (1992). Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett.* *307*, 108–112.
- Hamanaka, R.B., and Chandel, N.S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem. Sci.* *35*, 505–513.
- Hara, J., Beuckmann, C.T., Nambu, T., Willie, J.T., Chemelli, R.M., Sinton, C.M., Sugiyama, F., Yagami, K., Goto, K., Yanagisawa, M., *et al.* (2001). Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* *30*, 345–354.
- Hardie, D.G., Ross, F.A., and Hawley, S.A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 251–262.
- Havrankova, J., Roth, J., and Brownstein, M. (1978). Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature* *272*, 827–829.
- Hay, N., and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* *18*, 1926–1945.
- Henquin, J.C. (2000). Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* *49*, 1751–1760.
- Henriksen, E.J., Diamond-Stanic, M.K., and Marchionne, E.M. (2011). Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* *51*, 993–999.
- Ho, F.M., Liu, S.H., Liau, C.S., Huang, P.J., and Lin-Shiau, S.Y. (2000). High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH(2)-terminal kinase and caspase-3. *Circulation* *101*, 2618–2624.
- Hollenbeck, P.J., and Saxton, W.M. (2005). The axonal transport of mitochondria. *J. Cell Sci.* *118*, 5411–5419.
- Hoppins, S., Lackner, L., and Nunnari, J. (2007). The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 751–780.
- Horvath, T.L., Andrews, Z.B., and Diano, S. (2009). Fuel utilization by hypothalamic neurons: roles for ROS. *Trends Endocrinol. Metab.* *20*, 78–87.
- Huszar, D., Lynch, C.A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Berkemeier, L.R., Gu, W., Kesterson, R.A., Boston, B.A., Cone, R.D., *et al.* (1997). Targeted Disruption of the Melanocortin-4 Receptor Results in Obesity in Mice. *Cell* *88*, 131–141.
- Ibrahim, N., Bosch, M.A., Smart, J.L., Qiu, J., Rubinstein, M., Rønnekleiv, O.K., Low, M.J., and Kelly, M.J. (2003). Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels. *Endocrinology* *144*, 1331–1340.



- Ikegami, M., Ikeda, H., Ishikawa, Y., Ohsawa, M., Ohashi, T., Kai, M., Kamei, A., and Kamei, J. (2013). Olanzapine induces glucose intolerance through the activation of AMPK in the mouse hypothalamus. *Eur. J. Pharmacol.* *718*, 376–382.
- Ishihara, N., Nomura, M., Jofuku, A., Kato, H., Suzuki, S.O., Masuda, K., Otera, H., Nakanishi, Y., Nonaka, I., Goto, Y.-I., *et al.* (2009). Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat. Cell Biol.* *11*, 958–966.
- Ito, M., Gomori, A., Ishihara, A., Oda, Z., Mashiko, S., Matsushita, H., Yumoto, M., Ito, M., Sano, H., Tokita, S., *et al.* (2003). Characterization of MCH-mediated obesity in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *284*, E940–E945.
- Janssen-Heininger, Y.M.W., Mossman, B.T., Heintz, N.H., Forman, H.J., Kalyanaraman, B., Finkel, T., Stamler, J.S., Rhee, S.G., and van der Vliet, A. (2008). Redox-based regulation of signal transduction: Principles, pitfalls, and promises. *Free Radic. Biol. Med.* *45*, 1–17.
- Jendrach, M., Mai, S., Pohl, S., Vöth, M., and Bereiter-Hahn, J. (2008). Short- and long-term alterations of mitochondrial morphology, dynamics and mtDNA after transient oxidative stress. *Mitochondrion* *8*, 293–304.
- Jheng, H.-F., Tsai, P.-J., Guo, S.-M., Kuo, L.-H., Chang, C.-R.C.-S., Su, I.-J., and Tsai, Y.-S. (2012). Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 309–319.
- Jo, Y.-H., Su, Y., Gutierrez-Juarez, R., and Chua, S. (2009). Oleic acid directly regulates POMC neuron excitability in the hypothalamus. *J. Neurophysiol.* *101*, 2305–2316.
- Johansson, A., Fredriksson, R., Winnergren, S., Hulting, A.-L., Schiöth, H.B., and Lindblom, J. (2008). The relative impact of chronic food restriction and acute food deprivation on plasma hormone levels and hypothalamic neuropeptide expression. *Peptides* *29*, 1588–1595.
- Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., and Hardie, D.G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* *1*, 15–25.
- Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H., and Wakabayashi, I. (2001). Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* *50*, 2438–2443.
- Kang, L., Routh, V.H., Kuzhikandathil, E. V., Gaspers, L.D., and Levin, B.E. (2004). Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons. *Diabetes* *53*, 549–559.
- Karnani, M., and Burdakov, D. (2011). Multiple hypothalamic circuits sense and regulate glucose levels. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *300*, R47–R55.
- Kennedy, G.C. (1950). The hypothalamic control of food intake in rats. *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.* *137*, 535–549.
- Kieffer, T.J., and Habener, J.F. (2000). The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *278*, E1–E14.
- Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., and Lemasters, J.J. (2007). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch. Biochem. Biophys.* *462*, 245–253.



- Kim, J.D., Leyva, S., and Diano, S. (2014). Hormonal regulation of the hypothalamic melanocortin system. *Front. Physiol.* *5*, 1–7.
- Kim, K.W., Sohn, J.-W., Kohno, D., Xu, Y., Williams, K., and Elmquist, J.K. (2011). SF-1 in the ventral medial hypothalamic nucleus: a key regulator of homeostasis. *Mol. Cell. Endocrinol.* *336*, 219–223.
- King, C.M., and Hentges, S.T. (2011). Relative number and distribution of murine hypothalamic proopiomelanocortin neurons innervating distinct target sites. *PLoS One* *6*, e25864.
- Kinote, A., Faria, J.A., Roman, E.A., Solon, C., Razolli, D.S., Ignacio-Souza, L.M., Sollon, C.S., Nascimento, L.F., de Araújo, T.M., Barbosa, A.P.L., *et al.* (2012). Fructose-induced hypothalamic AMPK activation stimulates hepatic PEPCK and gluconeogenesis due to increased corticosterone levels. *Endocrinology* *153*, 3633–3645.
- Klip, A., and Pâquet, M.R. (1990). Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care* *13*, 228–243.
- Knott, A.B., Perkins, G., Schwarzenbacher, R., and Bossy-Wetzell, E. (2008). Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 505–518.
- Koch, M., and Horvath, T.L. (2014). Molecular and cellular regulation of hypothalamic melanocortin neurons controlling food intake and energy metabolism. *Mol. Psychiatry* *1*–10.
- Kokorovic, A., Cheung, G.W.C., Rossetti, L., and Lam, T.K.T. (2009). Hypothalamic sensing of circulating lactate regulates glucose production. *J. Cell. Mol. Med.* *13*, 4403–4408.
- Kong, D., Vong, L., Parton, L.E., Ye, C., Tong, Q., Hu, X., Choi, B., Brüning, J.C., and Lowell, B.B. (2010). Glucose stimulation of hypothalamic MCH neurons involves K(ATP) channels, is modulated by UCP2, and regulates peripheral glucose homeostasis. *Cell Metab.* *12*, 545–552.
- Könnert, a C., and Brüning, J.C. (2012). Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders. *Cell Metab.* *16*, 144–152.
- Kotz, C.M., Teske, J.A., Levine, J.A., and Wang, C. (2002). Feeding and activity induced by orexin A in the lateral hypothalamus in rats. *Regul. Pept.* *104*, 27–32.
- Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G., and Grüters, a (1998). Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat. Genet.* *19*, 155–157.
- Kuznetsov, A. V., Hermann, M., Saks, V., Hengster, P., and Margreiter, R. (2009). The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 1928–1939.
- Lam, T.K., Gutierrez-Juarez, R., Poci, A., and Rossetti, L. (2005). Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. *Science* *309*, 943–947.
- Langlet, F. (2014). [Role of tanycytes within the blood-hypothalamus interface]. *Biol. Aujourd'hui.* *208*, 225–235.
- Langlet, F., Levin, B.E., Luquet, S., Mazzone, M., Messina, A., Dunn-Meynell, A.A., Balland, E., Lacombe, A., Mazur, D., Carmeliet, P., *et al.* (2013). Tanycytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting. *Cell Metab.* *17*, 607–617.
- Larm, J.A., and Gundlach, A.L. (2000). Galanin-like peptide (GALP) mRNA expression is restricted to arcuate nucleus of hypothalamus in adult male rat brain. *Neuroendocrinology* *72*, 67–71.



- Lau, J., and Herzog, H. (2014). CART in the regulation of appetite and energy homeostasis. *Front. Neurosci.* *8*.
- Lebrun, B., Bariohay, B., Moyses, E., and Jean, A. (2006). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and food intake regulation: a minireview. *Auton. Neurosci.* *126-127*, 30–38.
- de Leeuw van Weenen, J.E., Hu, L., Jansen-Van Zelm, K., de Vries, M.G., Tamsma, J.T., Romijn, J.A., and Pijl, H. (2009). Four weeks high fat feeding induces insulin resistance without affecting dopamine release or gene expression patterns in the hypothalamus of C57Bl6 mice. *Brain Res.* *1250*, 141–148.
- Leloup, C., Arluison, M., Lepetit, N., Cartier, N., Marfaing-Jallat, P., Ferré, P., and Pénicaud, L. (1994). Glucose transporter 2 (GLUT 2): expression in specific brain nuclei. *Brain Res.* *638*, 221–226.
- Leloup, C., Arluison, M., Kassis, N., Lepetit, N., Cartier, N., Ferré, P., and Pénicaud, L. (1996). Discrete brain areas express the insulin-responsive glucose transporter GLUT4. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *38*, 45–53.
- Leloup, C., Orosco, M., Serradas, P., Nicolaïdis, S., and Pénicaud, L. (1998). Specific inhibition of GLUT2 in arcuate nucleus by antisense oligonucleotides suppresses nervous control of insulin secretion. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *57*, 275–280.
- Leloup, C., Magnan, C., Benani, A., Bonnet, E., Alquier, T., Offer, G., Carriere, A., Périquet, A., Fernandez, Y., Ktorza, A., *et al.* (2006). Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing. *Diabetes* *55*, 2084–2090.
- Leloup, C., Tourrel-Cuzin, C., Magnan, C., Karaca, M., Castel, J., Carneiro, L., Colombani, A., Ktorza, A., Casteilla, L., and Pénicaud, L. (2009). Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* *58*, 673–681.
- Leloup, C., Casteilla, L., Carrière, A., Galinier, A., Benani, A., Carneiro, L., and Pénicaud, L. (2011). Balancing mitochondrial redox signaling: a key point in metabolic regulation. *Antioxid. Redox Signal.* *14*, 519–530.
- Leloup, C., Allard, C., Carneiro, L., Fioramonti, X., Collins, S.C., and Pénicaud, L. (2015). Glucose and hypothalamic astrocytes: More than a fueling role? *Neuroscience*.
- Lenaers, G., Hamel, C., Delettre, C., Amati-Bonneau, P., Procaccio, V., Bonneau, D., Reynier, P., and Milea, D. (2012). Dominant optic atrophy. *Orphanet J. Rare Dis.* *7*, 46.
- Lewis, M.R., and Lewis, W.H. (1914). Mitochondria in tissue culture. *Science* (80- ). *39*, 330–333.
- Liesa, M., and Shrihail, O.S. (2013). Mitochondrial Dynamics in the Regulation of Nutrient Utilization and Energy Expenditure. *Cell Metab.* *17*, 491–506.
- Liesa, M., Palacín, M., and Zorzano, A. (2009). Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol. Rev.* *89*, 799–845.
- Ligon, L.A., and Steward, O. (2000). Movement of mitochondria in the axons and dendrites of cultured hippocampal neurons. *J. Comp. Neurol.* *427*, 340–350.
- Lin, H. V., Plum, L., Ono, H., Gutie, R., Shanabrough, M., Gutiérrez-Juárez, R., Borok, E., Horvath, T.L., Rossetti, L., and Accili, D. (2010). Divergent regulation of energy expenditure and hepatic glucose production by insulin receptor in agouti-related protein and POMC neurons. *Diabetes* *59*, 337–346.



- Lin, H.-Y., Lai, R., Lin, S.-T., Lin, R.-C., Wang, M.-J., Lin, C., Lee, H., Wang, F., and Chen, J. (2013). Suppressor of cytokine signaling 6 (SOCS6) promotes mitochondrial fission via regulating DRP1 translocation. *Cell Death Differ.* *20*, 139–153.
- Liot, G., Bossy, B., Lubitz, S., Kushnareva, Y., Sejbuk, N., and Bossy-Wetzel, E. (2009). Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. *Cell Death Differ.* *16*, 899–909.
- Di Lisa, F., Kaludercic, N., Carpi, A., Menabò, R., and Giorgio, M. (2009). Mitochondrial pathways for ROS formation and myocardial injury: the relevance of p66(Shc) and monoamine oxidase. *Basic Res. Cardiol.* *104*, 131–139.
- Liu, Y., Fiskum, G., and Schubert, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J. Neurochem.* *80*, 780–787.
- Lovy, A., Molina, A.J. a., Cerqueira, F.M., Trudeau, K., and Shirihai, O.S. (2012). A Faster, High Resolution, mtPA-GFP-based Mitochondrial Fusion Assay Acquiring Kinetic Data of Multiple Cells in Parallel Using Confocal Microscopy. *J. Vis. Exp.* 3–7.
- Luckman, S.M., and Lawrence, C.B. (2003). Anorectic brainstem peptides: more pieces to the puzzle. *Trends Endocrinol. Metab.* *14*, 60–65.
- Ludwig, D.S., Tritos, N.A., Mastaitis, J.W., Kulkarni, R., Kokkotou, E., Elmquist, J., Lowell, B., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2001). Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* *107*, 379–386.
- Luiten, P.G., ter Horst, G.J., and Steffens, A.B. (1987). The hypothalamus, intrinsic connections and outflow pathways to the endocrine system in relation to the control of feeding and metabolism. *Prog. Neurobiol.* *28*, 1–54.
- Luquet, S., Perez, F. a, Hnasko, T.S., and Palmiter, R.D. (2005). NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science* *310*, 683–685.
- Lynch, R.M., Tompkins, L.S., Brooks, H.L., Dunn-Meynell, A.A., and Levin, B.E. (2000). Localization of glucokinase gene expression in the rat brain. *Diabetes* *49*, 693–700.
- MacKenzie, R.G. (2006). Obesity-associated mutations in the human melanocortin-4 receptor gene. *Peptides* *27*, 395–403.
- Maekawa, F., Toyoda, Y., Torii, N., Miwa, I., Thompson, R.C., Foster, D.L., Tsukahara, S., Tsukamura, H., and Maeda, K. (2000). Localization of glucokinase-like immunoreactivity in the rat lower brain stem: for possible location of brain glucose-sensing mechanisms. *Endocrinology* *141*, 375–384.
- Magnan, C., Collins, S., Berthault, M.F., Kassis, N., Vincent, M., Gilbert, M., Pénicaud, L., Ktorza, A., and Assimacopoulos-Jeannet, F. (1999). Lipid infusion lowers sympathetic nervous activity and leads to increased beta-cell responsiveness to glucose. *J. Clin. Invest.* *103*, 413–419.
- Mahjoub, S., and Masrour-Roudsari, J. (2012). Role of oxidative stress in pathogenesis of metabolic syndrome. *Casp. J. Intern. Med.* *3*, 386–396.
- Maier, C.M., and Chan, P.H. (2002). Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist* *8*, 323–334.



- Maity-Kumar, G., Thal, D.R., Baumann, B., Scharffetter-Kochanek, K., and Wirth, T. (2015). Neuronal redox imbalance results in altered energy homeostasis and early postnatal lethality. *FASEB J.* *29*, 2843–2858.
- Majdic, G., Young, M., Gomez-Sanchez, E., Anderson, P., Szczepaniak, L.S., Dobbins, R.L., McGarry, J.D., and Parker, K.L. (2002). Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology* *143*, 607–614.
- Mannella, C.A. (2006). The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. *Biochim. Biophys. Acta* *1762*, 140–147.
- Margulis, L. (1975). Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 21–38.
- Marino, J.S., Xu, Y., and Hill, J.W. (2011). Central insulin and leptin-mediated autonomic control of glucose homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.* *22*, 275–285.
- Marks, J.L., Porte, D., Stahl, W.L., and Baskin, D.G. (1990). Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* *127*, 3234–3236.
- Marnett, L.J., Riggins, J.N., and West, J.D. (2003). Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J. Clin. Invest.* *111*, 583–593.
- Marsboom, G., Toth, P.T., Ryan, J.J., Hong, Z., Wu, X., Fang, Y.-H., Thenappan, T., Piao, L., Zhang, H.J., Pogoriler, J., *et al.* (2012). Dynamin-related protein 1-mediated mitochondrial mitotic fission permits hyperproliferation of vascular smooth muscle cells and offers a novel therapeutic target in pulmonary hypertension. *Circ. Res.* *110*, 1484–1497.
- Marsollier, N., Kassis, N., Mezghenna, K., Soty, M., Fioramonti, X., Lacombe, A., Joly, A., Pillot, B., Zitoun, C., Vilar, J., *et al.* (2009). Deregulation of hepatic insulin sensitivity induced by central lipid infusion in rats is mediated by nitric oxide. *PLoS One* *4*, e6649.
- Marty, N., Dallaporta, M., Foretz, M., Emery, M., Tarussio, D., Bady, I., Binnert, C., Beermann, F., and Thorens, B. (2005). Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors. *J. Clin. Invest.* *115*, 3545–3553.
- Marty, N., Dallaporta, M., and Thorens, B. (2007). Brain glucose sensing, counterregulation, and energy homeostasis. *Physiology (Bethesda)*. *22*, 241–251.
- Matsumoto, Y., Watanabe, T., Adachi, Y., Itoh, T., Ohtaki, T., Onda, H., Kurokawa, T., Nishimura, O., and Fujino, M. (2002). Galanin-like peptide stimulates food intake in the rat. *Neurosci. Lett.* *322*, 67–69.
- Mayer, J. (1953). Glucostatic mechanism of regulation of food intake. *N. Engl. J. Med.* *249*, 13–16.
- Mayer, C.H., Fink, H., Rex, a., and Voigt, J.P. (2006). Changes in extracellular hypothalamic glucose in relation to feeding. *Eur. J. Neurosci.* *24*, 1695–1701.
- McClung, J.P., Roneker, C.A., Mu, W., Lisk, D.J., Langlais, P., Liu, F., and Lei, X.G. (2004). Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 8852–8857.
- Mccowen, K.C., Chow, J.C., and Smith, R.J. (1998). Leptin signaling in the hypothalamus of normal rats *in vivo*. *Endocrinology* *139*, 4442–4447.



McCrimmon, R.J., Fan, X., Ding, Y., Zhu, W., Jacob, R.J., and Sherwin, R.S. (2004). Potential role for AMP-activated protein kinase in hypoglycemia sensing in the ventromedial hypothalamus. *Diabetes* 53, 1953–1958.

McCrimmon, R.J., Fan, X., Cheng, H., McNay, E., Chan, O., Shaw, M., Ding, Y., Zhu, W., and Sherwin, R.S. (2006). Activation of AMP-activated protein kinase within the ventromedial hypothalamus amplifies counterregulatory hormone responses in rats with defective counterregulation. *Diabetes* 55, 1755–1760.

McCrimmon, R.J., Shaw, M., Fan, X., Cheng, H., Ding, Y., Vella, M.C., Zhou, L., McNay, E.C., and Sherwin, R.S. (2008). Key role for AMP-activated protein kinase in the ventromedial hypothalamus in regulating counterregulatory hormone responses to acute hypoglycemia. *Diabetes* 57, 444–450.

McGowan, M.K., Andrews, K.M., and Grossman, S.P. (1992). Chronic intrahypothalamic infusions of insulin or insulin antibodies alter body weight and food intake in the rat. *Physiol. Behav.* 51, 753–766.

McNay, E.C., and Gold, P.E. (1999). Extracellular glucose concentrations in the rat hippocampus measured by zero-net-flux: effects of microdialysis flow rate, strain, and age. *J. Neurochem.* 72, 785–790.

Medina, R.A., and Owen, G.I. (2002). Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biol. Res.* 35, 9–26.

Mellinkoff, S.M., Frankland, M., Boyle, D., and Greipel, M. (1997). Relationship between serum amino acid concentration and fluctuations in appetite. 1956. *Obes. Res.* 5, 381–384.

Men, X., Wang, H., Li, M., Cai, H., Xu, S., Zhang, W., Xu, Y., Ye, L., Yang, W., Wollheim, C.B., *et al.* (2009). Dynamin-related protein 1 mediates high glucose induced pancreatic beta cell apoptosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 879–890.

El Messari, S., Aït-Ikhlef, A., Ambroise, D.H., Penicaud, L., and Arluison, M. (2002). Expression of insulin-responsive glucose transporter GLUT4 mRNA in the rat brain and spinal cord: an in situ hybridization study. *J. Chem. Neuroanat.* 24, 225–242.

Messina, G., Dalia, C., Tafuri, D., Monda, V., Palmieri, F., Dato, A., Russo, A., De Blasio, S., Messina, A., De Luca, V., *et al.* (2014). Orexin-A controls sympathetic activity and eating behavior. *Front. Psychol.* 5, 997.

Miki, T., and Seino, S. (2005). Roles of KATP channels as metabolic sensors in acute metabolic changes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38, 917–925.

Miki, T., Liss, B., Minami, K., Shiuchi, T., Saraya, A., Kashima, Y., Horiuchi, M., Ashcroft, F., Minokoshi, Y., Roeper, J., *et al.* (2001). ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nat. Neurosci.* 4, 507–512.

Millán, C., Martínez, F., Cortés-Campos, C., Lizama, I., Yañez, M.J., Llanos, P., Reinicke, K., Rodríguez, F., Peruzzo, B., Nualart, F., *et al.* (2010). Glial glucokinase expression in adult and post-natal development of the hypothalamic region. *ASN Neuro* 2, e00035.

Minokoshi, Y., Kim, Y.-B., Peroni, O.D., Fryer, L.G.D., Müller, C., Carling, D., and Kahn, B.B. (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415, 339–343.

Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y.-B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Fougelle, F., Ferré, P., Birnbaum, M.J., *et al.* (2004). AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428, 569–574.



- Mishra, P., Carelli, V., Manfredi, G., and Chan, D.C. (2014). Proteolytic cleavage of opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation. *Cell Metab.* *19*, 630–641.
- Mitchell, P., and Moyle, J. (1967). Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature* *213*, 137–139.
- Molina, a. J. a, and Shirihai, O.S. (2009). Chapter 16 Monitoring Mitochondrial Dynamics with Photoactivateable Green Fluorescent Protein (Elsevier Inc.).
- Molina, A.J. a, Wikstrom, J.D., Stiles, L., Las, G., Mohamed, H., Elorza, A., Walzer, G., Twig, G., Katz, S., Corkey, B.E., *et al.* (2009). Mitochondrial networking protects ??-cells from nutrient-induced apoptosis. *Diabetes* *58*, 2303–2315.
- Morgan, K., Obici, S., and Rossetti, L. (2004). Hypothalamic responses to long-chain fatty acids are nutritionally regulated. *J. Biol. Chem.* *279*, 31139–31148.
- Morton, G.J. (2007). Hypothalamic leptin regulation of energy homeostasis and glucose metabolism. *J. Physiol.* *583*, 437–443.
- Mouli, P.K., Twig, G., and Shirihai, O.S. (2009). Frequency and selectivity of mitochondrial fusion are key to its quality maintenance function. *Biophys. J.* *96*, 3509–3518.
- Mountjoy, P.D., Bailey, S.J., and Rutter, G.A. (2007). Inhibition by glucose or leptin of hypothalamic neurons expressing neuropeptide Y requires changes in AMP-activated protein kinase activity. *Diabetologia* *50*, 168–177.
- Mulder, H., and Ling, C. (2009). Mitochondrial dysfunction in pancreatic beta-cells in Type 2 diabetes. *Mol. Cell. Endocrinol.* *297*, 34–40.
- Muller, F.L., Liu, Y., and Van Remmen, H. (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* *279*, 49064–49073.
- Mullier, A., Bouret, S.G., Prevot, V., and Dehouck, B. (2010). Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *J. Comp. Neurol.* *518*, 943–962.
- Münzberg, H., and Myers, M.G. (2005). Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat. Neurosci.* *8*, 566–570.
- Muroya, S., Yada, T., Shioda, S., and Takigawa, M. (1999). Glucose-sensitive neurons in the rat arcuate nucleus contain neuropeptide Y. *Neurosci. Lett.* *264*, 113–116.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* *417*, 1–13.
- Murphy, M.P. (2013). Mitochondrial Dysfunction Indirectly Elevates ROS Production by the Endoplasmic Reticulum. *Cell Metab.* *18*, 145–146.
- Nakada, K., Inoue, K., Ono, T., Isobe, K., Ogura, A., Goto, Y.I., Nonaka, I., and Hayashi, J.I. (2001). Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat. Med.* *7*, 934–940.
- Nakahara, K., Katayama, T., Maruyama, K., Ida, T., Mori, K., Miyazato, M., Kangawa, K., and Murakami, N. (2010). Comparison of feeding suppression by the anorexigenic hormones neuromedin U and neuromedin S in rats. *J. Endocrinol.* *207*, 185–193.



- Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K., and Matsukura, S. (2001). A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* *409*, 194–198.
- Nasrallah, C.M., and Horvath, T.L. (2014). Mitochondrial dynamics in the central regulation of metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* *10*, 650–658.
- Nemoto, S., Takeda, K., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., and Finkel, T. (2000). Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 7311–7318.
- Netchiporouk, L.I., Shram, N.F., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., and Cespluglio, R. (1996). *In vivo* brain glucose measurements: differential normal pulse voltammetry with enzyme-modified carbon fiber microelectrodes. *Anal. Chem.* *68*, 4358–4364.
- Nicholls, D.G., and Locke, R.M. (1984). Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol. Rev.* *64*, 1–64.
- Nichols, C.G. (2006). KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* *440*, 470–476.
- Nijijima, A. (1975). The effect of glucose on the activity of the adrenal nerve and pancreatic branch of the vagus nerve in the rabbit. *Neurosci. Lett.* *1*, 159–162.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M.A., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H.P., *et al.* (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* *404*, 787–790.
- Nonogaki, K. (2000). New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia* *43*, 533–549.
- Novak, C.M., and Levine, J.A. (2009). Daily intraparaventricular orexin-A treatment induces weight loss in rats. *Obesity (Silver Spring)*. *17*, 1493–1498.
- Nunnari, J., Marshall, W.F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J.W., and Walter, P. (1997). Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Cell* *8*, 1233–1242.
- Obici, S., Feng, Z., Karkanias, G., Baskin, D.G., and Rossetti, L. (2002a). Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat. Neurosci.* *5*, 566–572.
- Obici, S., Feng, Z., Morgan, K., Stein, D., Karkanias, G., and Rossetti, L. (2002b). Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* *51*, 271–275.
- Ogunnowo-Bada, E.O., Heeley, N., Brochard, L., and Evans, M.L. (2014). Brain glucose sensing, glucokinase and neural control of metabolism and islet function. *Diabetes. Obes. Metab.* *16 Suppl 1*, 26–32.
- Ollmann, M., Wilson, B.D., Yang, Y.K., Kerns, J.A., Chen, Y., Gantz, I., and Barsh, G.S. (1997). Antagonism of central melanocortin receptors *in vitro* and *in vivo* by agouti-related protein. *Science* *278*, 135–138.
- Oomura, Y., Ono, T., Ooyama, H., and Wayner, M.J. (1969). Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. *Nature* *222*, 282–284.
- Oomura, Y., Nakamura, T., Sugimori, M., and Yamada, Y. (1975). Effect of free fatty acid on the rat lateral hypothalamic neurons. *Physiol. Behav.* *14*, 483–486.



Osundiji, M. a, Lam, D.D., Shaw, J., Yueh, C.-Y., Markkula, S.P., Hurst, P., Colliva, C., Roda, A., Heisler, L.K., and Evans, M.L. (2012). Brain glucose sensors play a significant role in the regulation of pancreatic glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 61, 321–328.

Ottaway, N., Mahbod, P., Rivero, B., Norman, L.A., Gertler, A., D'Alessio, D.A., and Perez-Tilve, D. (2015). Diet-Induced Obese Mice Retain Endogenous Leptin Action. *Cell Metab.* 21, 877–882.

Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.-H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L.H., and Hotamisligil, G.S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306, 457–461.

Pacher, P., Beckman, J.S., and Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 87, 315–424.

Pagotto, U. (2009). Where does insulin resistance start? The brain. *Diabetes Care* 32 *Suppl* 2, 0–3.

Park, S., Kim, D.S., Kang, S., and Shin, B.K. (2014). Chronic activation of central AMPK attenuates glucose-stimulated insulin secretion and exacerbates hepatic insulin resistance in diabetic rats. *Brain Res. Bull.* 108, 18–26.

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

Pellerin, L., and Magistretti, P.J. (2012). Sweet sixteen for ANLS. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 1152–1166.

Pénicaud, L. (2003). Détection du glucose : le point sur les mécanismes cellulaires et moléculaires. *Nutr. Clin. Métabolisme* 17, 89–93.

Pénicaud, L., Leloup, C., Lorsignol, A., Alquier, T., and Guillod, E. (2002). Brain glucose sensing mechanism and glucose homeostasis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 5, 539–543.

Pénicaud, L., Leloup, C., Fioramonti, X., Lorsignol, A., and Benani, A. (2006). Brain glucose sensing: a subtle mechanism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 9, 458–462.

Perry, R.J., Samuel, V.T., Petersen, K.F., and Shulman, G.I. (2014). The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 510, 84–91.

Pi, J., and Collins, S. (2010). Reactive oxygen species and uncoupling protein 2 in pancreatic  $\beta$ -cell function. *Diabetes. Obes. Metab.* 12 *Suppl* 2, 141–148.

Pi, J., Bai, Y., Zhang, Q., Wong, V., Floering, L.M., Daniel, K., Reece, J.M., Deeney, J.T., Andersen, M.E., Corkey, B.E., *et al.* (2007). Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 56, 1783–1791.

Picard, M., Shirihai, O.S., Gentil, B.J., and Burrelle, Y. (2013). Mitochondrial morphology transitions and functions: implications for retrograde signaling? *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 304, R393–R406.

Pitocco, D., Zaccardi, F., Di Stasio, E., Romitelli, F., Santini, S. a, Zuppi, C., and Ghirlanda, G. (2010). Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *Rev. Diabet. Stud.* 7, 15–25.

Pitts, K.R., Yoon, Y., Krueger, E.W., and McNiven, M. a (1999). The dynamin-like protein DLP1 is essential for normal distribution and morphology of the endoplasmic reticulum and mitochondria in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 10, 4403–4417.



Plum, L., Belgardt, B.F., and Brüning, J.C. (2006). Central insulin action in energy and glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* *116*, 1761–1766.

Pocai, A., Lam, T.K.T., Gutierrez-Juarez, R., Obici, S., Schwartz, G.J., Bryan, J., Aguilar-Bryan, L., and Rossetti, L. (2005). Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature* *434*, 1026–1031.

Polonsky, K.S., Given, B.D., and Van Cauter, E. (1988). Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J. Clin. Invest.* *81*, 442–448.

Porte, D., Baskin, D.G., and Schwartz, M.W. (2002). Leptin and insulin action in the central nervous system. *Nutr. Rev.* *60*, S20–S29; discussion S68–S84, 85–87.

Posey, K. a, Clegg, D.J., Printz, R.L., Byun, J., Morton, G.J., Vivekanandan-Giri, A., Pennathur, S., Baskin, D.G., Heinecke, J.W., Woods, S.C., *et al.* (2009). Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *296*, E1003–E1012.

Poyton, R.O., Ball, K. a, and Castello, P.R. (2009). Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends Endocrinol. Metab.* *20*, 332–340.

Praefcke, G.J.K., and McMahon, H.T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 133–147.

Produit-Zengaffinen, N., Davis-Lameloise, N., Perreten, H., Bécard, D., Gjinovci, A., Keller, P.A., Wollheim, C.B., Herrera, P., Muzzin, P., Assimacopoulos-Jeannet, F. (2007). Increasing uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells does not alter glucose-induced insulin secretion but decreases production of reactive oxygen species. *Diabetologia.* *50*(1):84-93.

Putti, R., Sica, R., Migliaccio, V., and Lionetti, L. (2015). Diet impact on mitochondrial bioenergetics and dynamics. *Front. Physiol.* *6*, 1–7.

Qian, S., Chen, H., Weingarh, D., Myrna, E., Novi, D.E., Guan, X., Yu, H., Feng, Y., Frazier, E., Chen, A., *et al.* (2002). Neither Agouti-Related Protein nor Neuropeptide Y Is Critically Required for the Regulation of Energy Homeostasis in Mice Neither Agouti-Related Protein nor Neuropeptide Y Is Critically Required for the Regulation of Energy Homeostasis in Mice. *Society* *22*, 5027–5035.

Quinlan, C.L., Orr, A.L., Perevoshchikova, I. V, Treberg, J.R., Ackrell, B.A., and Brand, M.D. (2012). Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J. Biol. Chem.* *287*, 27255–27264.

Rains, J.L., and Jain, S.K. (2011). Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* *50*, 567–575.

Ramsden, D.B., Ho, P.W.-L., Ho, J.W.-M., Liu, H.-F., So, D.H.-F., Tse, H.-M., Chan, K.-H., and Ho, S.-L. (2012). Human neuronal uncoupling proteins 4 and 5 (UCP4 and UCP5): structural properties, regulation, and physiological role in protection against oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Brain Behav.* *2*, 468–478.

Raturi, A., and Simmen, T. (2013). Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim. Biophys. Acta* *1833*, 213–224.

Ray, P., Huang, B., and Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* *24*, 981–990.



- Rehman, J., Zhang, H.J., Toth, P.T., Zhang, Y., Marsboom, G., Hong, Z., Salgia, R., Husain, A.N., Wietholt, C., and Archer, S.L. (2012). Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer. *FASEB J.* *26*, 2175–2186.
- Reijnders, L. (1975). The origin of mitochondria. *J. Mol. Evol.* *5*, 167–176.
- Richard, D., Clavel, S., Huang, Q., Sanchis, D., and Ricquier, D. (2001). Uncoupling protein 2 in the brain: distribution and function. *Biochem. Soc. Trans.* *29*, 812–817.
- Rios, M., Fan, G., Fekete, C., Kelly, J., Bates, B., Kuehn, R., Lechan, R.M., and Jaenisch, R. (2001). Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol. Endocrinol.* *15*, 1748–1757.
- Rodríguez, E.M., Blázquez, J.L., and Guerra, M. (2010). The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: The former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides* *31*, 757–776.
- Rojo, M., Legros, F., Chateau, D., and Lombès, A. (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J. Cell Sci.* *115*, 1663–1674.
- Roncero, I., Alvarez, E., Vázquez, P., and Blázquez, E. (2000). Functional glucokinase isoforms are expressed in rat brain. *J. Neurochem.* *74*, 1848–1857.
- Routh, V.H. (2010). Glucose sensing neurons in the ventromedial hypothalamus. *Sensors (Basel)*. *10*, 9002–9025.
- Routh, V.H., Hao, L., Santiago, A.M., Sheng, Z., and Zhou, C. (2014). Hypothalamic glucose sensing: making ends meet. *Front. Syst. Neurosci.* *8*, 236.
- Ruderman, N.B., Carling, D., Prentki, M., and Cacicedo, J.M. (2013). AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* *123*, 2764–2772.
- Ruszkiewicz, J., and Albrecht, J. (2015). Changes in the mitochondrial antioxidant systems in neurodegenerative diseases and acute brain disorders. *Neurochem. Int.* *88*, 66–72.
- Ryan, J., Dasgupta, A., Huston, J., Chen, K.-H., and Archer, S.L. (2015). Mitochondrial dynamics in pulmonary arterial hypertension. *J. Mol. Med. (Berl)*. *93*, 229–242.
- Sakurai, T. (2014). Roles of orexins in the regulation of body weight homeostasis. *Obes. Res. Clin. Pract.* *8*, e414–e420.
- Salgado, M., Tarifeño-Saldivia, E., Ordenes, P., Millán, C., Yañez, M.J., Llanos, P., Villagra, M., Elizondo-Vega, R., Martínez, F., Nualart, F., *et al.* (2014). Dynamic localization of glucokinase and its regulatory protein in hypothalamic tanycytes. *PLoS One* *9*, e94035.
- Sanders, N.M., and Ritter, S. (2000). Repeated 2-deoxy-D-glucose-induced glucoprivation attenuates Fos expression and glucoregulatory responses during subsequent glucoprivation. *Diabetes* *49*, 1865–1874.
- Satoh, N., Ogawa, Y., Katsuura, G., Hayase, M., Tsuji, T., Imagawa, K., Yoshimasa, Y., Nishi, S., Hosoda, K., and Nakao, K. (1997). The arcuate nucleus as a primary site of satiety effect of leptin in rats. *Neurosci. Lett.* *224*, 149–152.
- Schäfer, E., Seelert, H., Reifschneider, N.H., Krause, F., Dencher, N. a, and Vonck, J. (2006).



- Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* *281*, 15370–15375.
- Schatz, G. (2007). The Magic Garden. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 673–678.
- Scheffler, I.E. (2001). Mitochondria make a come back. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *49*, 3–26.
- Scheurink, A.J., and Nolan, L.J. (1996). Food intake, fuel homeostasis, and the autonomic nervous system. *Appetite* *26*, 304.
- Schneeberger, M., and Claret, M. (2012). Recent Insights into the Role of Hypothalamic AMPK Signaling Cascade upon Metabolic Control. *Front. Neurosci.* *6*, 185.
- Schneeberger, M., Dietrich, M.O., Sebastián, D., Imbernón, M., Castaño, C., Garcia, A., Esteban, Y., Gonzalez-Franquesa, A., Rodríguez, I.C., Bortolozzi, A., *et al.* (2013). Mitofusin 2 in POMC Neurons Connects ER Stress with Leptin Resistance and Energy Imbalance. *Cell* *155*, 172–187.
- Schneeberger, M., Gomis, R., and Claret, M. (2014). Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *J. Endocrinol.* *220*, T25–T46.
- Schrader, M. (2006). Shared components of mitochondrial and peroxisomal division. *Biochim. Biophys. Acta* *1763*, 531–541.
- Schuit, F.C., Huypens, P., Heimberg, H., and Pipeleers, D.G. (2001). Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. *Diabetes* *50*, 1–11.
- Schwartz, G.J. (2013). Central leucine sensing in the control of energy homeostasis. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* *42*, 81–87.
- Schwartz, M.W., Figlewicz, D.P., Baskin, D.G., Woods, S.C., and Porte, D. (1992). Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr. Rev.* *13*, 387–414.
- Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Campfield, L.A., Burn, P., and Baskin, D.G. (1996). Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J. Clin. Invest.* *98*, 1101–1106.
- Schwinkendorf, D.R., Tsatsos, N.G., Gosnell, B.A., and Mashek, D.G. (2011). Effects of central administration of distinct fatty acids on hypothalamic neuropeptide expression and energy metabolism. *Int. J. Obes. (Lond)*. *35*, 336–344.
- Sebastián, D., Hernández-Alvarez, M.I., Segalés, J., Soriano, E., Muñoz, J.P., Sala, D., Waget, A., Liesa, M., Paz, J.C., Gopalacharyulu, P., *et al.* (2012). Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 5523–5528.
- Sedelnikova, O.A., Redon, C.E., Dickey, J.S., Nakamura, A.J., Georgakilas, A.G., and Bonner, W.M. (2010). Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutat. Res.* *704*, 152–159.
- Seufert, J. (2004). Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. *Diabetes* *53 Suppl 1*, S152–S158.
- Seyer, P., Vallois, D., Poitry-Yamate, C., Schütz, F., Metref, S., Tarussio, D., Maechler, P., Staels, B., Lanz, B., Grueter, R., *et al.* (2013). Hepatic glucose sensing is required to preserve  $\beta$  cell glucose competence. *J. Clin. Invest.* *123*, 1662–1676.
- Sheridan, C., and Martin, S.J. (2010). Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis. *Mitochondrion* *10*, 640–648.



- Shiba, K., Kageyama, H., Takenoya, F., and Shioda, S. (2010). Galanin-like peptide and the regulation of feeding behavior and energy metabolism. *FEBS J.* *277*, 5006–5013.
- Shimada, M., Tritos, N.A., Lowell, B.B., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (1998). Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* *396*, 670–674.
- Shirihai, O.S., Song, M., and Dorn, G.W. (2015). How Mitochondrial Dynamism Orchestrates Mitophagy. *Circ. Res.* *116*, 1835–1849.
- Silver, I.A., and Erecińska, M. (1998). Glucose-induced intracellular ion changes in sugar-sensitive hypothalamic neurons. *J. Neurophysiol.* *79*, 1733–1745.
- Simcox, E.M., Reeve, A., and Turnbull, D. (2013). Monitoring mitochondrial dynamics and complex I dysfunction in neurons: implications for Parkinson's disease. *Biochem. Soc. Trans.* *41*, 1618–1624.
- Sindelar, D.K., Ste Marie, L., Miura, G.I., Palmiter, R.D., McMinn, J.E., Morton, G.J., and Schwartz, M.W. (2004). Neuropeptide Y is required for hyperphagic feeding in response to neuroglucopenia. *Endocrinology* *145*, 3363–3368.
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.L., and van der Bliek, A.M. (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* *12*, 2245–2256.
- Soenen, S., and Westerterp-Plantenga, M.S. (2008). Proteins and satiety: implications for weight management. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *11*, 747–751.
- Song, Z., Levin, B.E., McArdle, J.J., Bakhos, N., and Routh, V.H. (2001). Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes* *50*, 2673–2681.
- Sorli, C., and Heile, M.K. (2014). Identifying and meeting the challenges of insulin therapy in type 2 diabetes. *J. Multidiscip. Healthc.* *7*, 267–282.
- Spanswick, D., Smith, M.A., Groppi, V.E., Logan, S.D., and Ashford, M.L. (1997). Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Nature* *390*, 521–525.
- Spanswick, D., Smith, M.A., Mirshamsi, S., Routh, V.H., and Ashford, M.L. (2000). Insulin activates ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. *Nat. Neurosci.* *3*, 757–758.
- Stanley, G.B., Kyrkouli, S.E., Lampert, S., and Leibowitz, S.F. (1986). Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: A powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* *7*, 1189–1192.
- Stanley, S., Wynne, K., McGowan, B., and Bloom, S. (2005). Hormonal Regulation of Food Intake. *Physiol. Rev.* *85*, 1131–1158.
- Steffens, A.B., Scheurink, A.J., Porte, D., and Woods, S.C. (1988). Penetration of peripheral glucose and insulin into cerebrospinal fluid in rats. *Am. J. Physiol.* *255*, R200–R204.
- Steinberg, G.R., and Kemp, B.E. (2009). AMPK in Health and Disease. *Physiol. Rev.* *89*, 1025–1078.
- Stiles, L., and Shirihai, O.S. (2012). Mitochondrial dynamics and morphology in beta-cells. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *26*, 725–738.
- Stojanovski, D., Koutsopoulos, O.S., Okamoto, K., and Ryan, M.T. (2004). Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. *J. Cell Sci.* *117*, 1201–1210.
- Su, Y., Lam, T.K.T., He, W., Poci, A., Bryan, J., Aguilar-Bryan, L., and Gutiérrez-Juárez, R. (2012). Hypothalamic leucine metabolism regulates liver glucose production. *Diabetes* *61*, 85–93.



Suzuki, T., Kohno, H., Sakurada, T., Tadano, T., and Kisara, K. (1982). Intracranial injection of thyrotropin releasing hormone (TRH) suppresses starvation-induced feeding and drinking in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *17*, 249–253.

Sverdlov, A.L., Elezaby, A., Behring, J.B., Bachschmid, M.M., Luptak, I., Tu, V.H., Siwik, D.A., Miller, E.J., Liesa, M., Shirihai, O.S., *et al.* (2014). High fat, high sucrose diet causes cardiac mitochondrial dysfunction due in part to oxidative post-translational modification of mitochondrial complex II. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *78*, 165–173.

Szabados, E., Fischer, G.M., Toth, K., Csete, B., Nemeti, B., Trombitas, K., Habon, T., Endrei, D., and Sumegi, B. (1999). Role of reactive oxygen species and poly-ADP-ribose polymerase in the development of AZT-induced cardiomyopathy in rat. *Free Radic. Biol. Med.* *26*, 309–317.

Tartaglia, L. a, Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L. a, Clark, F.T., Deeds, J., *et al.* (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* *83*, 1263–1271.

Teff, K.L. (2009). Visceral nerves: vagal and sympathetic innervation. *JPEN. J. Parenter. Enteral Nutr.* *32*, 569–571.

Thorens, B. (1992). Molecular and cellular physiology of GLUT-2, a high-Km facilitated diffusion glucose transporter. *Int. Rev. Cytol.* *137*, 209–238.

Thorens, B. (2001). GLUT2 in pancreatic and extra-pancreatic gluco-detection (review). *Mol. Membr. Biol.* *18*, 265–273.

Thorens, B. (2012). Sensing of glucose in the brain. *Handb. Exp. Pharmacol.* *209*, 277–294.

Thorens, B. (2014). GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia*.

Toda, C., and Diano, S. (2014). Mitochondrial UCP2 in the central regulation of metabolism. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* *28*, 757–764.

Tong, Q., Ye, C., McCrimmon, R.J., Dhillon, H., Choi, B., Kramer, M.D., Yu, J., Yang, Z., Christiansen, L.M., Lee, C.E., *et al.* (2007). Synaptic glutamate release by ventromedial hypothalamic neurons is part of the neurocircuitry that prevents hypoglycemia. *Cell Metab.* *5*, 383–393.

Treberg, J.R., Quinlan, C.L., and Brand, M.D. (2011). Evidence for two sites of superoxide production by mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Biol. Chem.* *286*, 27103–27110.

Tsujii, S., and Bray, G.A. (1990). Effects of glucose, 2-deoxyglucose, phlorizin, and insulin on food intake of lean and fatty rats. *Am. J. Physiol.* *258*, E476–E481.

Tsujino, N., and Sakurai, T. (2009). Orexin/hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system. *Pharmacol. Rev.* *61*, 162–176.

Twig, G., and Shirihai, O.S. (2011). The interplay between mitochondrial dynamics and mitophagy. *Antioxid. Redox Signal.* *14*, 1939–1951.

Twig, G., Graf, S.A., Wikstrom, J.D., Mohamed, H., Haigh, S.E., Elorza, A., Deutsch, M., Zurgil, N., Reynolds, N., and Shirihai, O.S. (2006). Tagging and tracking individual networks within a complex mitochondrial web with photoactivatable GFP. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *291*, C176–C184.

Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J.A., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., *et al.* (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* *27*, 433–446.



Varela, L., and Horvath, T.L. (2012). Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep.* 13, 1079–1086.

Venditti, P., Di Stefano, L., and Di Meo, S. (2013). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion*.

Wai, T., and Langer, T. (2016). Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol. Metab.* xx, 1–13.

Wallace, D.C. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* 39, 359–407.

Wan, H.Z., Hulsey, M.G., and Martin, R.J. (1998). Intracerebroventricular administration of antisense oligodeoxynucleotide against GLUT2 glucose transporter mRNA reduces food intake, body weight change and glucoprivic feeding response in rats. *J. Nutr.* 128, 287–291.

Wang, C., Godar, R.J., Billington, C.J., and Kotz, C.M. (2010a). Chronic administration of brain-derived neurotrophic factor in the hypothalamic paraventricular nucleus reverses obesity induced by high-fat diet. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 298, R1320–R1332.

Wang, C., Bomberg, E., Billington, C.J., Levine, A.S., and Kotz, C.M. (2010b). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the hypothalamic ventromedial nucleus increases energy expenditure. *Brain Res.* 1336, 66–77.

Wang, J., Obici, S., Morgan, K., Barzilai, N., Feng, Z., and Rossetti, L. (2001). Overfeeding rapidly induces leptin and insulin resistance. *Diabetes* 50, 2786–2791.

Wang, L., Saint-Pierre, D.H., and Taché, Y. (2002). Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y - synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci. Lett.* 325, 47–51.

Wang, R., Liu, X., Hentges, S.T., Dunn-Meynell, A.A., Levin, B.E., Wang, W., and Routh, V.H. (2004). The regulation of glucose-excited neurons in the hypothalamic arcuate nucleus by glucose and feeding-relevant peptides. *Diabetes* 53, 1959–1965.

Wang, R., Cruciani-Guglielmacci, C., Migrenne, S., Mangan, C., Cotero, V.E., and Routh, V.H. (2006). Effects of oleic acid on distinct populations of neurons in the hypothalamic arcuate nucleus are dependent on extracellular glucose levels. *J. Neurophysiol.* 95, 1491–1498.

Waterham, H.R., Koster, J., van Roermund, C.W.T., Mooyer, P.A.W., Wanders, R.J.A., and Leonard, J. V (2007). A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N. Engl. J. Med.* 356, 1736–1741.

White, M.F. (2003). Insulin signaling in health and disease. *Science* 302, 1710–1711.

Wikstrom, J.D., Israeli, T., Bachar-Wikstrom, E., Swisa, A., Ariav, Y., Waiss, M., Kaganovich, D., Dor, Y., Cerasi, E., and Leibowitz, G. (2013). AMPK regulates ER morphology and function in stressed pancreatic  $\beta$ -cells via phosphorylation of DRP1. *Mol. Endocrinol.* 27, 1706–1723.

Willesen, M.G., Kristensen, P., and Rømer, J. (1999). Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 70, 306–316.

Williams, G., Bing, C., Cai, X.J., Harrold, J. a, King, P.J., and Liu, X.H. (2001). The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol. Behav.* 74, 683–701.

Williams, K.W., Coppari, R., and Elmquist, J.K. (2007). “AMPing up” our understanding of the hypothalamic control of energy balance. *J. Clin. Invest.* 117, 2089–2092.



- Winder, W.W., and Hardie, D.G. (1999). AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am. J. Physiol.* *277*, E1–E10.
- Woods, S.C., and Porte, D. (1977). Relationship between plasma and cerebrospinal fluid insulin levels of dogs. *Am. J. Physiol.* *233*, E331–E334.
- Wortley, K.E., del Rincon, J.-P., Murray, J.D., Garcia, K., Iida, K., Thorner, M.O., and Sleeman, M.W. (2005). Absence of ghrelin protects against early-onset obesity. *J. Clin. Invest.* *115*, 3573–3578.
- Wren, A.M., Small, C.J., Abbott, C.R., Jethwa, P.H., Kennedy, A.R., Murphy, K.G., Stanley, S.A., Zollner, A.N., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2002). Hypothalamic actions of neuromedin U. *Endocrinology* *143*, 4227–4234.
- Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M.N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* *124*, 471–484.
- Xu, C., Bailly-Maitre, B., and Reed, J.C. (2005). Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J. Clin. Invest.* *115*, 2656–2664.
- Xu, X.J., Gauthier, M.-S., Hess, D.T., Apovian, C.M., Cacicedo, J.M., Gokce, N., Farb, M., Valentine, R.J., and Ruderman, N.B. (2012). Insulin sensitive and resistant obesity in humans: AMPK activity, oxidative stress, and depot-specific changes in gene expression in adipose tissue. *J. Lipid Res.* *53*, 792–801.
- Yaffe, M.P. (1999). The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science* *283*, 1493–1497.
- Yang, X., Mastaitis, J., Mizuno, T., and Mobbs, C. V (2007). Glucokinase regulates reproductive function, glucocorticoid secretion, food intake, and hypothalamic gene expression. *Endocrinology* *148*, 1928–1932.
- Yaswen, L., Diehl, N., Brennan, M.B., and Hochgeschwender, U. (1999). Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat. Med.* *5*, 1066–1070.
- Yettefti, K., Orsini, J.C., and Perrin, J. (1997). Characteristics of glycemia-sensitive neurons in the nucleus tractus solitarii: possible involvement in nutritional regulation. *Physiol. Behav.* *61*, 93–100.
- Yoneda, M., Miyatake, T., and Attardi, G. (1994). Complementation of mutant and wild-type human mitochondrial DNAs coexisting since the mutation event and lack of complementation of DNAs introduced separately into a cell within distinct organelles. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 2699–2712.
- Yoon, Y., Krueger, E.W., Oswald, B.J., and Mcniven, M.A. (2003). The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 5409–5420.
- Yoon, Y., Galloway, C.A., Jhun, B.S., and Yu, T. (2011). Mitochondrial dynamics in diabetes. *Antioxid. Redox Signal.* *14*, 439–457.
- Yu, T., Robotham, J.L., and Yoon, Y. (2006). Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 2653–2658.
- Yu, T., Sheu, S.-S., Robotham, J.L., and Yoon, Y. (2008). Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. *Cardiovasc. Res.* *79*, 341–351.



- Yu, T., Jhun, B.S., and Yoon, Y. (2011). High-glucose stimulation increases reactive oxygen species production through the calcium and mitogen-activated protein kinase-mediated activation of mitochondrial fission. *Antioxid. Redox Signal.* *14*, 425–437.
- Yuan, X.-W., Han, S.-F., Zhang, J.-W., Xu, J.-Y., and Qin, L.-Q. (2015). Leucine supplementation improves leptin sensitivity in high-fat diet fed rats. *Food Nutr. Res.* *59*, 27373.
- Yun, J.-S., and Ko, S.-H. (2015). Avoiding or coping with severe hypoglycemia in patients with type 2 diabetes. *Korean J. Intern. Med.* *30*, 6–16.
- Zhang, Q., Liu, B., Cheng, Y., Meng, Q., Xia, T., Jiang, L., Chen, S., Liu, Y., and Guo, F. (2014). Leptin signaling is required for leucine deprivation-enhanced energy expenditure. *J. Biol. Chem.* *289*, 1779–1787.
- Zheng, H., and Berthoud, H.-R. (2008). Neural systems controlling the drive to eat: mind versus metabolism. *Physiology (Bethesda)*. *23*, 75–83.
- Zhou, L., Yueh, C.-Y., Lam, D.D., Shaw, J., Osundiji, M., Garfield, A.S., Evans, M., and Heisler, L.K. (2011). Glucokinase inhibitor glucosamine stimulates feeding and activates hypothalamic neuropeptide Y and orexin neurons. *Behav. Brain Res.* *222*, 274–278.
- Zigman, J.M., Nakano, Y., Coppari, R., Balthasar, N., Marcus, J.N., Lee, C.E., Jones, J.E., Deysher, A.E., Waxman, A.R., White, R.D., *et al.* (2005). Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* *115*, 3564–3572.
- Zorzano, A., and Claret, M. (2015). Implications of mitochondrial dynamics on neurodegeneration and on hypothalamic dysfunction. *Front. Aging Neurosci.* *7*, 1–17.
- Zorzano, A., Liesa, M., and Palacín, M. (2009). Role of mitochondrial dynamics proteins in the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 1846–1854.
- Zorzano, A., Liesa, M., Sebastián, D., Segalés, J., and Palacín, M. (2010). Mitochondrial fusion proteins: dual regulators of morphology and metabolism. *Semin. Cell Dev. Biol.* *21*, 566–574.
- Züchner, S., Mersiyanova, I. V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., *et al.* (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat. Genet.* *36*, 449–451.