



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

Discipline ou spécialité : Innovation Pharmacologique

Présentée et soutenue par Thibaut DUPARC

Le 13 Avril 2012

Communication inter-organes dans le contrôle du métabolisme glucidique : Mise en évidence de l'implication du monoxyde d'azote et de l'apeline dans l'hypothalamus

JURY

*Professeur Bernard FRANCES – Président
Professeur Corinne LELOUP – Rapporteur
Professeur Jean LESAGE - Rapporteur
Professeur Patrice CANI - Examineur
Docteur Claude KNAUF – Directeur de thèse*

Ecole doctorale : Biologie Santé Biotechnologies Toulouse

Unité de recherche : *Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC)
INSERM U1048, CHU Rangueil*

Directeur de Thèse : Dr Claude KNAUF

*« A nos âmes dans la nuit
Le dernier jour est arrivé
A nos âmes dans l'oubli
Juste un dernier jour accordé
A nos larmes dans le gris
Le dernier jour est arrivé »*

RESUME

L'hypothalamus est une structure du système nerveux central fortement impliquée dans la régulation de l'homéostasie glucidique. En effet, il reçoit en permanence des signaux d'origines diverses (nerveuses, endocriniennes, ou même métaboliques) en provenance d'un grand nombre d'organes périphériques qui l'informent sur l'état métabolique global de l'organisme. L'intégration de ces informations aboutit à l'élaboration d'une réponse nerveuse adaptée qui sera envoyée en périphérie *via* le système nerveux autonome et modulera en retour l'activité des organes périphériques afin de maintenir la glycémie dans des limites strictes. Dès lors, un dysfonctionnement dans cette boucle de régulation peut participer à l'établissement de maladies métaboliques telles que l'obésité ou le diabète de type II.

Au cours de ce doctorat, nous nous sommes attachés à identifier de nouveaux mécanismes et acteurs moléculaires impliqués dans ces communications entre la périphérie et l'hypothalamus dans des conditions physiologiques et physiopathologiques.

Dans une première étude, nous avons pu montrer que l'inflammation et le stress du réticulum endoplasmique observés au niveau du jéjunum d'animaux obèses modifie la libération hypothalamique de monoxyde d'azote (NO) en réponse à la détection entérique de glucose. Dès lors, nous montrons que les senseurs entériques au glucose peuvent être considérés comme des cibles thérapeutiques potentielles pour les maladies métaboliques.

Dans une seconde étude, nous avons plus particulièrement étudié les effets centraux de l'apeline, peptide bioactif original du fait de sa double origine puisqu'il est produit par le tissu adipeux mais également au niveau hypothalamique. Nos résultats montrent que le NO hypothalamique est nécessaire à l'établissement de certains effets bénéfiques périphériques de l'apeline sur l'homéostasie glucidique (diminution de la glycémie nourrie, amélioration de la tolérance au glucose). Par ailleurs, nous avons également démontré que les effets centraux de l'apeline dépendaient de la dose injectée, de la situation énergétique (à jeun/nourri) et de la situation métabolique (maigre/obèse) de l'organisme. Ainsi, de forts taux d'apeline hypothalamique participent à la mise en place d'un diabète de type 2.

L'ensemble de ces travaux de doctorat renforce l'importance des communications inter-organes dans le contrôle de l'homéostasie glucidique, et propose de nouvelles cibles moléculaires (apeline) et tissulaires (intestin) pour le traitement du diabète de type 2.

ABSTRACT

The hypothalamus is a central nervous system area which is strongly involved in the control of glucose homeostasis. Indeed, the hypothalamus is able to detect peripheral signals from various organs which inform the body about the nutritional/metabolic state. These signals are from various origins (nervous, endocrine or metabolic) and modifications of the hypothalamic neuronal activity modulated by these factors generate an adaptive nervous signal which will be sent to periphery via the autonomous nervous system (ANS). In response to the activation of ANS, peripheral organs create an appropriate response in order to maintain blood glucose in physiological state. Once, dysfunction in this regulating loop can be implicated in the development of metabolic disease such as obesity or type 2 diabetes.

During this PhD, we aimed at identifying new mechanisms and molecular actors involved in these communications between peripheral tissue and hypothalamus under physiological and pathological state.

First, we demonstrate that inflammation and endoplasmic reticulum stress that occur in the jejunum of obese animals can modify the hypothalamic release of nitric oxide (NO) in response to stimulation of enteric glucose sensors. Our data strongly reinforce the hypothesis that the "gut-to-brain" axis can be now considered as new potential therapeutic targets for treatment of metabolic disease.

In a second study, we focused our intention of central effects of apelin, a bioactive peptide produced by adipose tissue and hypothalamic neurons. Our results show that hypothalamic NO is implicated in the establishment of beneficial peripheral effects of central apelin on glucose homeostasis (decrease fed glycemia, increase glucose tolerance). In another hand, we also demonstrate that central effects of apelin were strongly dependant of the injected dose, the nutritional state (fasted/fed) and the metabolic state (lean/obese). Thus, high dose of hypothalamic apelin participate to the development of type 2 diabetes.

This work reinforces the importance of inter-organs communications in the control of glucose homeostasis and offers new molecular (apelin) and tissular (gut) targets for the treatment of type 2 diabetes.

Keywords: Hypothalamus / Apelin / Glucose / Gut / Metabolic disease

LISTE DES ABREVIATIONS

- 4E-BP1:** *Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein*
- ACC:** *Acétyl-CoA carboxylase*
- AgRP:** *Agouti-Related Peptide*
- AMPc:** *Adénosine monophosphate cyclique*
- AMPK:** *AMP activated protein kinase*
- AMPKK:** *AMP activated protein kinase kinase*
- APM:** *Adipose Most Important Transcript*
- APPL1:** *Adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1*
- ARC:** *Noyau arqué*
- ARN:** *Acide ribonucléique*
- ATF:** *Activating transcription factor*
- CaMKK β :** *Ca²⁺ Calmodulin kinase kinase β*
- CART:** *Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript*
- CCK:** *Cholecystokinine*
- CFTR:** *Cystic fibrosis transmembrane regulator*
- CHOP:** *C / EBP homologous protein*
- ChREBP:** *carbohydrate-responsive element-binding protein*
- CPT1:** *Carnitine palmitoyltransférase*
- CREB:** *cAMP response element-binding*
- CRH:** *Corticotropin-releasing hormone*
- CRM:** *Chaîne respiratoire mitochondriale*
- DMH:** *Hypothalamus dorso-médian*
- DPP-IV:** *Dipeptidyl-peptidase IV*
- EAOs:** *Espèces actives de l'oxygène*
- ERK:** *Extracellular signal-regulated kinase*
- FGF:** *Fibroblast Growth Factor*
- FIAF:** *Fasting-Induced Adipose Factor*
- G6P:** *Glucose-6-phosphate*
- GABA:** *γ -Aminobutyric acid*
- GIP:** *Glucose-dependent insulintropic polypeptide*
- GLP:** *Glucagon-like-peptide*
- GLUT:** *Glucose transporter*

GOAT: Ghrelin-O-acétyl transférase

Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène

HL: Hypothalamus latéral

IAP: Intestinal alcalin phosphatase

ICV: Intracérébroventriculaire

IL: Interleukine

IMC: Indice de masse corporelle

Ire-1: Inositol requiring enzyme 1

IRS: Insulin receptor substrate

JAK: Janus kinase

JNK: Jun kinase

LAR: Leukocyte common antigen-related molecule

LHA: Hypothalamus latéral

LKB1: Liver kinase B1

LPL: Lipoprotéine lipase

LPS: Lipopolysaccharide

MCP: Monocyte chemoattractant protein

ME: Eminence médiane

MPGF: Major proglucagon fragment

mTOR: mammalian Target Of Rapamycin

Neurones GE: Neurones glucoexcités

Neurones GI : Neurones glucoinhibés

NF-κB: Nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells

NO: Monoxyde d'azote

NOS : Nitric oxide synthase

NPY: Neuropeptide Y

NTS: Noyau du tractus solitaire

p70-S6K: p70-S6 kinase

PC: Proconvertase

Pdx-1: Pancreatic and duodenal homeobox 1

PEPCK: Phosphoénol pyruvate carboxykinase

PERK: PKR-like εR protein kinase

PFK: Phosphofructokinase

PGC -1α: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-α

PH: Pleckstrine homogy

PI3K: *Phosphatidylinositol-3-kinase*

PKA: *Protéine kinase A*

PKC: *Protéine kinase C*

PLC: *Phospholipase C*

POMC: *Pro-opiomélanocortine*

PTB: *PhosphoTyrosin Binding*

PTP-1B: *Phosphotyrosine phosphatase 1B*

PVN: *Noyau paraventriculaire*

SGLT: *Sodium glucose co-transporter*

SH2: *Src homology 2*

SOCS: *Suppressor of cytokine signaling*

SOS: *Son of sevenless*

SREBP: *Sterol Regulatory Element-Binding Protein*

STAT: *Signal Transducers and Activators of Transcription*

TLR: *Toll-like récepteur*

TNF α : *Tumor necrosis factor α*

TRH: *Thyrotropin-releasing hormone*

UPR: *Unfolded protein response*

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*

VMH: *Hypothalamus ventromédian*

Xbp-1 : *X-box binding protein 1*

ZO-1: *Zona occludens 1*

α -MSH : *α - Melanocyte-Stimulating Hormone*

FIGURES

Figure 1 : Voie de la glycolyse et devenir du pyruvate.

Figure 2 : Voie de la glycogénogénèse

Figure 3 : Voie de la lipogénèse

Figure 4 : Voie de la glycogénolyse

Figure 5 : Voie de la néoglucogénèse

Figure 6 : Maturation de l'insuline

Figure 7 : Voie de signalisation de l'insuline

Figure 8 : Maturation du glucagon

Figure 9 : Voie de signalisation du glucagon

Figure 10 : Effets métaboliques des incrétines

Figure 11 : Sécrétion de l'insuline par les cellules β du pancréas

Figure 12 : Effets de l'AMPK

Figure 13 : Localisation de l'hypothalamus

Figure 14 : Positions respectives des différents noyaux hypothalamiques

Figure 15 : Illustration du système porte hypothalamo-hypophysaire

Figure 16 : Principales connexions entre les noyaux hypothalamiques

Figure 17 : Maturation de la POMC

Figure 18 : Voie de signalisation proposée du neuropeptide anorexigène CART

Figure 19 : Effets de l'AMPK hypothalamique

Figure 20 : Fonctionnement des neurones gluco-inhibés

Figure 21 : La réponse UPR

Figure 22 : Génération des espèces actives de l'oxygène mitochondriales

Figure 23 : Maturation de la ghréline

Figure 24 : Schéma des effets extrapancréatiques du GLP-1

Figure 25 : Voie de signalisation de la leptine

Figure 26 : Maturation de l'apeline

Figure 27 : Distribution tissulaire de l'ARNm et du peptide de l'apeline

SOMMAIRE

PARTIE 1 : INTRODUCTION	1
I. L'homéostasie glucidique, un paramètre important et finement régulé	3
1) Définition	3
2) Organes, tissus et mécanismes impliqués	2
a) Présentation des organes et tissus participant à la régulation de l'homéostasie glucidique.....	2
b) Mécanismes utilisateurs de glucose	4
c) Mécanismes de stockage du glucose.....	7
d) Mécanismes producteurs de glucose	9
3) Régulation(s) du contrôle de l'homéostasie glucidique	12
a) Régulation endocrine.....	12
b) Régulation métabolique.....	23
c) Régulation nerveuse.....	29
II. L'hypothalamus, structure clef du contrôle central de l'homéostasie glucidique	29
1) Origine, localisation et organisation	29
2) Présentation des principaux noyaux hypothalamiques.....	31
3) Acteurs centraux impliqués dans le contrôle de l'homéostasie glucidique	35
a) Neuropeptides orexigènes.....	35
b) Neuropeptides anorexigènes.....	37
c) Acteurs enzymatiques	41
d) Neurones glucosensibles,	45
III. Physiopathologie : Perturbations de l'homéostasie glucidique et maladies métaboliques	50
1) Définition et caractéristiques	50
a) Définition	51
b) Altérations moléculaires participant à l'insulino-résistance.....	52

2)	Altérations périphériques dans le cadre d'un diabète de type II	53
a)	Flore intestinale	53
b)	Inflammation	55
c)	Stress du réticulum endoplasmique.....	58
d)	Stress oxydant.....	60
3)	Altérations centrales dans le cadre d'un diabète de type II	62
a)	Inflammation	63
b)	Stress du réticulum endoplasmique.....	64
c)	Stress oxydant.....	64

IV. Communications périphérie / système nerveux central dans le métabolisme glucidique.....65

A)	Le tractus digestif.....	65
1)	Distension gastrique.....	66
2)	Peptides gastro-intestinaux	67
a)	Cholecystokinine	67
b)	Ghréline.....	69
c)	GLP-1	72
B)	Le foie.....	74
C)	Le pancréas	76
1)	Insuline.....	76
2)	Glucagon.....	77
D)	Le tissu adipeux	78
1)	Leptine	78
2)	Adiponectine	83
3)	Apeline	84
a)	Généralités	84
b)	Rôle physiologique de l'apeline périphérique sur le métabolisme glucidique.....	89
c)	Rôle physiologique de l'apeline au niveau central	90

PARTIE II : OBJECTIFS ET TRAVAUX DE THESE.....	93
I. Objectifs.....	95
II. Article 1 : L'apeline centrale contrôle l'homéostasie glucidique chez la souris par un mécanisme impliquant le NO.....	97
1) Introduction	97
2) Article	99
3) Discussion et perspectives.....	120
III. Article 2 : L'inflammation du jéjunum observée chez la souris obèse et diabétique altère la détection intestinale du glucose et modifie la production hypothalamique de NO.....	126
1) Introduction	126
2) Article	128
3) Discussion et perspectives.....	138
IV. Conclusion générale.....	142
V. Annexes	146
VI. Références bibliographiques	178

PARTIE 1 : INTRODUCTION

I. L'homéostasie glucidique, un paramètre important et finement régulé

1) Définition

Tout organisme requiert en permanence de l'énergie pour maintenir ses fonctions vitales. Face à cette nécessité et pour pallier l'apport discontinu de substrats énergétiques, de nombreux mécanismes de régulation sont mis en jeu pour assurer soit la métabolisation immédiate des substrats soit leur stockage en vue d'une utilisation future. L'ensemble de ces fins mécanismes de gestion des substrats est regroupé sous le terme d'homéostasie énergétique.

Parmi les principales sources d'énergie pour un organisme (glucides, lipides et protéines), le glucose est la molécule énergétique la plus utilisée dans des conditions physiologiques du fait de sa disponibilité immédiate. Toutefois, la glycémie doit être maintenue dans des limites strictes afin de ne pas mettre l'intégrité de l'organisme en péril. Pour cela, il existe tout un ensemble de mécanismes capables de contribuer à cet équilibre. Cet ensemble porte le nom d'homéostasie glucidique.

Ainsi, il existe des mécanismes permettant d'oxyder le glucose afin de produire de l'adénosine triphosphate (ATP), molécule fournissant l'énergie nécessaire aux réactions métaboliques. Dans les périodes postprandiales, c'est-à-dire au cours de l'élévation de la glycémie suivant une prise alimentaire, d'autres processus biochimiques permettent le stockage du glucose sous diverses formes en vue de son utilisation ultérieure. Enfin, dans le cas d'un jeûne, lorsque le glucose circulant tend à diminuer, l'ensemble des stocks auparavant créés vont être mobilisés et utilisés. Si ce jeûne se poursuit, l'organisme est alors capable de mettre en jeu des mécanismes permettant d'utiliser d'autres substrats afin de produire *de novo* du glucose (néoglucogénèse) et ainsi palier aux carences du moment.

2) Organes, tissus et mécanismes impliqués

a) Présentation des organes et tissus participant à la régulation de l'homéostasie glucidique

Le maintien de l'homéostasie glucidique est rendu possible par de nombreux systèmes de communication établis entre les organes impliqués. Parmi ceux-ci, l'**intestin** est extrêmement important puisque c'est à ce niveau que sont absorbés, après une prise alimentaire, les substrats énergétiques ou leurs précurseurs qui seront par la suite utilisés par l'organisme. A ce titre, cet organe possède donc un grand nombre de senseurs métaboliques et un fort pouvoir sécrétoire qui lui permettent de signaler aux autres organes l'arrivée de molécules énergétiques telles que le glucose dans l'organisme. L'intestin est notamment en communication avec le **foie**, qui reçoit le glucose absorbé par l'intestin *via* la veine porte hépatique. Son devenir dépendra ensuite des conditions énergétiques de l'organisme et de la voie métabolique qui domine sur le moment. En effet, le foie est un véritable chef d'orchestre de la régulation de la glycémie : il sera capable de stocker le glucose si la glycémie est élevée ou stable, et d'en produire si la glycémie tend à baisser¹. Ce rôle du foie dans la régulation de la glycémie a été mis en évidence par l'expérience dite « du foie lavé » par Claude Bernard en 1855². Il a constaté que dans le milieu d'incubation d'un foie entièrement rincé à l'eau on ne détectait pas de glucose dans un premier temps. En revanche, après un temps d'attente, du glucose apparaissait dans ce même milieu. Sa conclusion fût que le glucose devait donc être présent dans le foie, mais exister sous une autre forme, insoluble, et était transformé au cours du temps. Cette expérience démontre donc que le foie est un organe de stockage du glucose dans l'organisme.

L'arrivée de glucose dans la circulation sanguine va notamment être détectée par le **pancréas**. Son rôle dans la régulation de l'homéostasie glucidique est important du fait de sa sécrétion d'hormones telles que l'insuline ou le glucagon par les îlots de Langerhans. Ceux-ci comprennent 4 types cellulaires, plus ou moins nombreux. Ainsi, les plus représentées (65 à 80%) sont les cellules β , responsables de la production de l'insuline. Viennent ensuite les cellules α (15 à 20%), qui produisent le glucagon. Enfin, on trouve aussi en forte minorité les

cellules delta qui produisent la somatostatine (3 à 5%) et les cellules F qui sécrètent le peptide pancréatique (moins de 1%). La production de ces hormones va permettre de stocker le glucose ou, à l'inverse, d'utiliser les stocks existants en fonction de l'état métabolique de l'organisme. Outre le foie, le **tissu adipeux** est également capable de créer des réserves énergétiques, en partie par la transformation du glucose. On distingue en réalité 2 types de tissus adipeux : le tissu adipeux brun et le tissu adipeux blanc. Le tissu adipeux brun a pour principal rôle de participer à la régulation de la température corporelle par le phénomène de thermogénèse ³. Son implication dans la régulation de l'homéostasie énergétique a longtemps été considérée comme peu importante, mais de récentes études ont mis en évidence sa capacité à modifier la dépense énergétique de l'organisme en réponse à divers *stimuli* tels qu'une diminution de la température corporelle ou la présence d'insuline ^{4,5}. Le tissu adipeux blanc est, quant à lui, le plus abondant et constitue l'organe premier de stockage des lipides ⁶. Il est également de plus en plus considéré comme un organe endocrine à part entière, du fait de son importante activité sécrétoire ⁷. Ces sécrétions, portant le nom d'adipokines, sont capables d'agir par voie endocrine pour moduler l'activité d'autres organes et sont donc largement impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique ⁸.

Les **muscles** participent également à la régulation de l'homéostasie glucidique du fait de leur part quantitative en termes de poids de l'organisme ainsi que de leur sensibilité à l'insuline. Ces organes peuvent utiliser le glucose capté afin de permettre leur fonctionnement correct, mais également générer des réserves énergétiques (bien que la capacité de stockage par cellule soit largement inférieure à celle d'un hépatocyte).

Le dernier acteur de cette régulation l'homéostasie énergétique est le **cerveau**. Bien que cet organe soit relativement isolé du reste de l'organisme par la BHE (*barrière hémato-encéphalique*) formée par l'endothélium des vaisseaux intracérébraux et les pieds astrocytaires, il existe des zones où les métabolites et les hormones atteignent plus facilement le système nerveux central, en particulier l'hypothalamus. Ces zones, les structures neurohémales, présentent des capillaires fenestrés facilitant le passage de nombreux messagers. Les signaux sont alors intégrés au niveau de l'hypothalamus, principalement au

niveau du noyau arqué qui modifiera ensuite l'activité d'autres noyaux hypothalamiques. Grâce à ses projections nerveuses sur l'ensemble des organes et tissus périphériques, le cerveau est alors capable de moduler par la suite les réponses périphériques mises en place lors de variations de la glycémie.

b) Mécanismes utilisateurs de glucose

Avant d'être utilisé, le glucose sanguin doit être capté afin de pénétrer dans la cellule. Ceci est rendu possible par 2 familles de protéines qui sont les SGLTs (*Sodium glucose co-transporters*) dans l'intestin et le rein qui assurent un transport actif, et les GLUTs (*Glucose transporters*), présents dans l'ensemble des tissus et qui, eux, assurent une diffusion facilitée ⁹.

Dans l'intégralité des tissus et organes, l'entrée de glucose est plus ou moins aisée. Cela dépend en partie du type de transporteur de glucose qui est exprimé à la surface des cellules composant l'organe ou le tissu en question. Les SGLTs, de part leur localisation, jouent un rôle majeur mais limité à l'absorption intestinale et la réabsorption tubulaire rénale du glucose. En revanche, la famille des GLUTs comprend une douzaine d'isoformes dont les plus connues sont les GLUT 1 à 4, et qui ont des affinités plus ou moins importantes avec le glucose. Ainsi, GLUT2 présente une faible affinité, ce qui fait que l'entrée de glucose se fera proportionnellement à la glycémie dans les cellules qui l'expriment et qui sont principalement les hépatocytes et les cellules β pancréatiques. A l'inverse, d'autres membres de la famille des GLUTs présentent une très forte affinité qui permet donc une entrée importante de glucose au sein des tissus qui les expriment ¹⁰. C'est notamment le cas pour GLUT1 et GLUT4 qui sont exprimés dans les muscles et le tissu adipeux et également dans les neurones avec GLUT3 et GLUT8. Toutefois, la fonction exacte de ce dernier reste encore à éclaircir. En effet, celui-ci ne semble pas être présent à la membrane plasmique des cellules, mais plutôt associé aux membranes internes de la cellule comme le réticulum endoplasmique ou les endosomes, ce qui laissent penser que ce transporteur serait impliqué dans le transport intracellulaire du glucose ¹¹. D'autres transporteurs ne sont également pas exprimés à la membrane de façon constitutive. Par exemple, GLUT4 y sera

transloqué sous certaines conditions de stimulation, telles que la présence d'insuline ¹².

Une fois dans la cellule, la molécule de glucose va être transformée par une hexokinase en glucose-6-phosphate (G6P). Cette enzyme est présente dans presque tous les tissus, à l'exception des hépatocytes et des cellules β du pancréas qui possèdent une isoforme particulière nommée glucokinase ¹³. Cette dernière assure la même transformation biochimique du glucose mais présente une affinité pour le glucose plus faible que l'hexokinase, ce qui se traduit par une saturation beaucoup moins importante en adéquation avec les besoins du foie qui doit faire face à un afflux important de glucose en période post-prandiale. Le G6P nouvellement formé par ces enzymes est au carrefour des différentes voies métaboliques qui pourront être évoquées par la suite puisqu'il s'agit du substrat de départ ou d'arrivée de chacune de ces voies. Ainsi, dans le cadre de l'utilisation du glucose, la voie métabolique impliquée se nomme **glycolyse (Figure 1)**. L'ensemble du processus biochimique se déroule dans le cytoplasme de la cellule, à partir de glucose transformé en G6P pour aboutir notamment à la formation de 2 molécules de pyruvate et 2 molécules d'ATP. Le pyruvate sera ensuite amené à la mitochondrie où il rentrera dans le cycle de Krebs, qui permettra la synthèse de 3 équivalents réduits (NADH, H⁺) générant par la suite 11 autres molécules d'ATP après passage dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Le stock d'ATP produit sera alors disponible pour l'établissement de multiples réactions biochimiques nécessaires à la vie cellulaire.

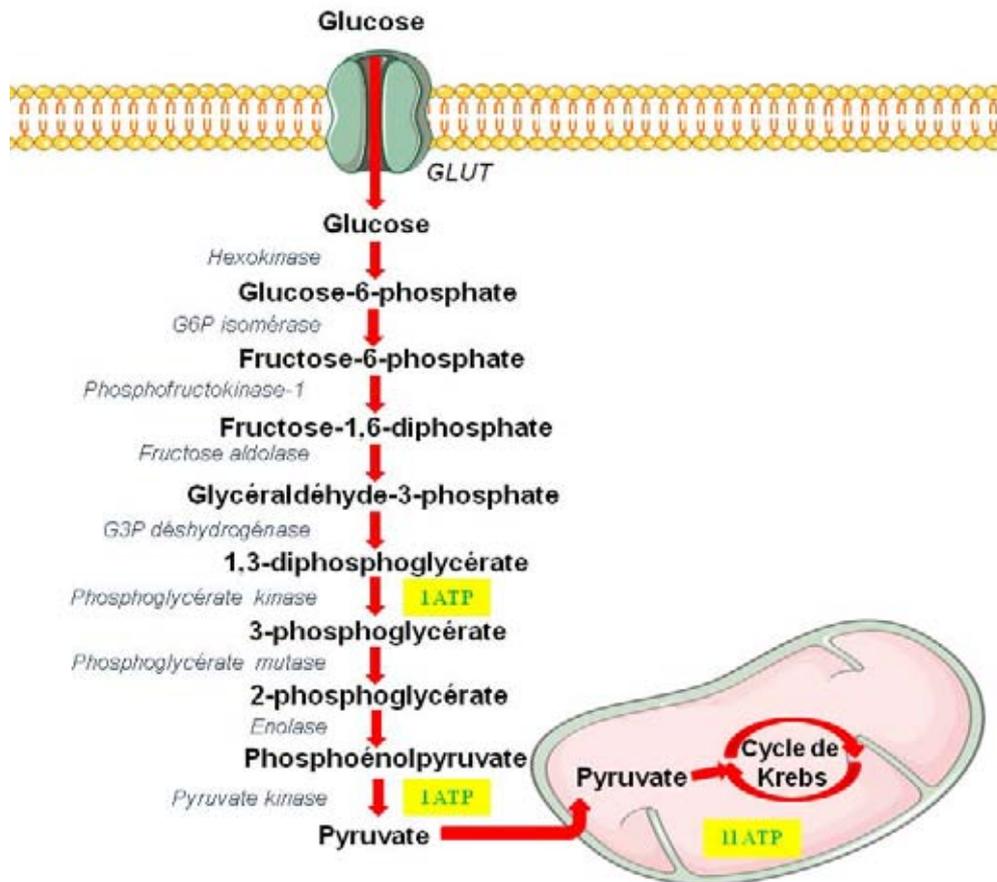


Figure 1 : Voie de la glycolyse et devenir du pyruvate. Le glucose entre dans la cellule par un transporteur de la famille des GLUTs et est directement transformé en glucose-6-phosphate. Cette molécule va ensuite subir plusieurs transformations menant à la production de pyruvate. Ce dernier servira alors de substrat énergétique via son oxydation dans le cycle de Krebs

La totalité des organes sont consommateurs de glucose afin d'assurer leur survie et leur(s) fonction(s). Toutefois, ceux-ci peuvent être de plus ou moins gros consommateurs et/ou être plus ou moins dépendants de ce substrat énergétique. Ainsi, les muscles sont de forts consommateurs de glucose, notamment lors de la pratique d'une activité physique. Ces derniers ont également la capacité d'utiliser d'autres substrats énergétiques comme les lipides afin de continuer à fonctionner. En revanche, le cerveau, autre important consommateur de glucose, est un organe dont la survie et le bon fonctionnement sont presque strictement dépendants d'un apport suffisant et continu en glucose puisque ses stocks de glycogène sont fortement limités. Les corps cétoniques, dérivés des acides gras, sont les seuls substrats alternatifs que peut utiliser le cerveau en cas de pénurie de glucose, mais ceux-ci n'apparaissent que lors d'un jeûne prolongé.

D'autres organes tels que le foie et le tissu adipeux sont également d'importants consommateurs de glucose dans des situations bien précises comme après une prise alimentaire. Toutefois, le but final n'est alors plus de permettre le bon fonctionnement physiologique de l'organe, mais de générer des réserves mobilisables lorsque la glycémie commencera à diminuer.

c) Mécanismes de stockage du glucose

Le glucose en excès dans la circulation sanguine n'est, en conditions physiologiques, pas éliminé par l'organisme. Il est mis en réserve sous 2 formes possibles : le glycogène ou les lipides.

Les seuls organes capables de réaliser un stockage du glucose sous forme de molécules de glycogène sont le foie et les muscles. Il s'agit un polymère de glucose où les molécules sont liées en α (1-4) et branchées en α (1-6) tous les 8 à 12 résidus. Cette voie métabolique est appelée **glycogénogénèse (Figure 2)**. Elle débute par la transformation d'un glucose-6-phosphate en glucose-1-phosphate pour aboutir à la génération d'une chaîne de molécules de glycogène *via* l'action de la glycogène synthase.

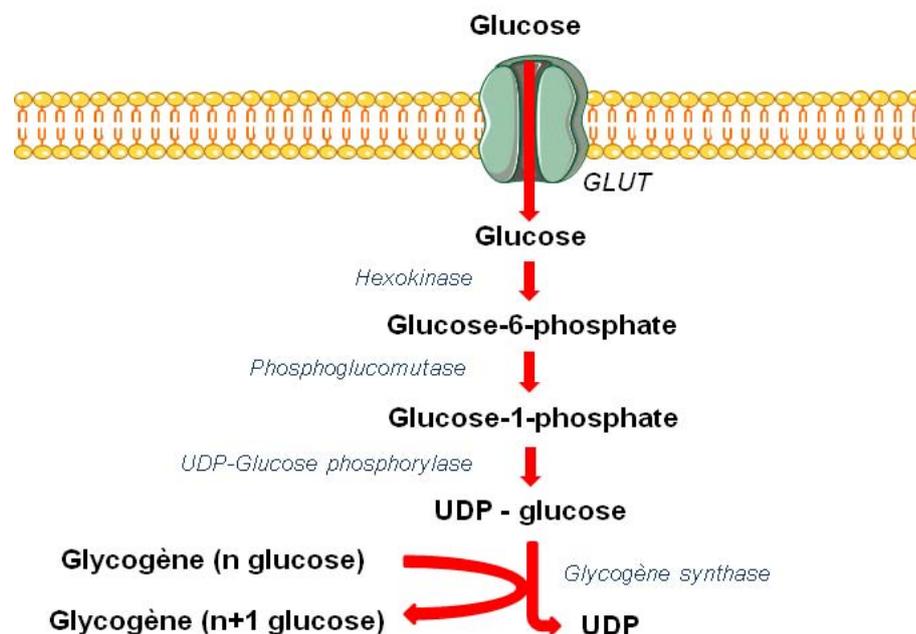


Figure 2 : Voie de la glycogénogénèse. Au sein du muscle ou du foie, le glucose entre dans la cellule par un transporteur de la famille des GLUTs et est directement transformé en glucose-6-phosphate. La phosphoglucomutase permet alors l'isomérisation de cette molécule en glucose-1-phosphate, qui sera alors greffé sur un squelette UDP qui permettra le transfert sur une molécule de glycogène en cours de formation par la glycogène synthase.

Un élément important marque pourtant une différence entre le foie et le muscle. En effet, dans les périodes inter-prandiales ou de jeûne, lorsque le taux de glucose circulant est trop faible, le foie est capable d'hydrolyser ces stocks de glycogène et de retransformer le G6P en glucose, pour le redistribuer à l'ensemble de l'organisme, *via* la circulation sanguine. En revanche, le muscle n'est pas capable d'effectuer cette redistribution générale, et le G6P résultant de l'hydrolyse du glycogène ne sera, dans ce cas, utilisé que par le muscle lui-même. Cette différence fondamentale est due à une enzyme, la glucose-6-phosphatase, catalysant la réaction inverse de la glucokinase, capable de déphosphoryler le G6P en glucose, qui pourra ensuite sortir de la cellule par gradient de concentration. En effet, cette enzyme est largement présente et active dans le foie, mais est en revanche retrouvée en très faible quantité et très peu active dans le muscle ¹⁴. Toutefois, le G6P provenant du glycogène hydrolysé peut, dans des situations très précises d'effort musculaire prolongé, réemprunter la voie de la glycolyse et produire du lactate. Ce dernier peut ensuite se retrouver dans la circulation et être utilisé par le foie comme produit glucoformateur ou comme substrat énergétique par d'autres tissus tels que les muscles ¹⁵.

La capacité de stockage énergétique sous forme de glycogène étant limitée, une autre forme de réserve existe : les lipides. Le stockage de glucose sous cette forme est également possible dans uniquement 2 organes : le tissu adipeux principalement et le foie, en second lieu ⁶. Le processus biochimique impliqué se nomme la **lipogenèse (Figure 3)**. Cette voie utilise le pyruvate résultant de la glycolyse en le transformant en citrate au sein de la mitochondrie puis en acétyl-Coenzyme A dans le cytosol. Ce produit sera ensuite transformé en palmitate, qui sera envoyé au niveau du réticulum endoplasmique, et à partir duquel des acides gras plus longs pourront être formés. Ces derniers seront, à terme, fixés à un squelette de glycérol pour former des triglycérides, forme finale de stockage.

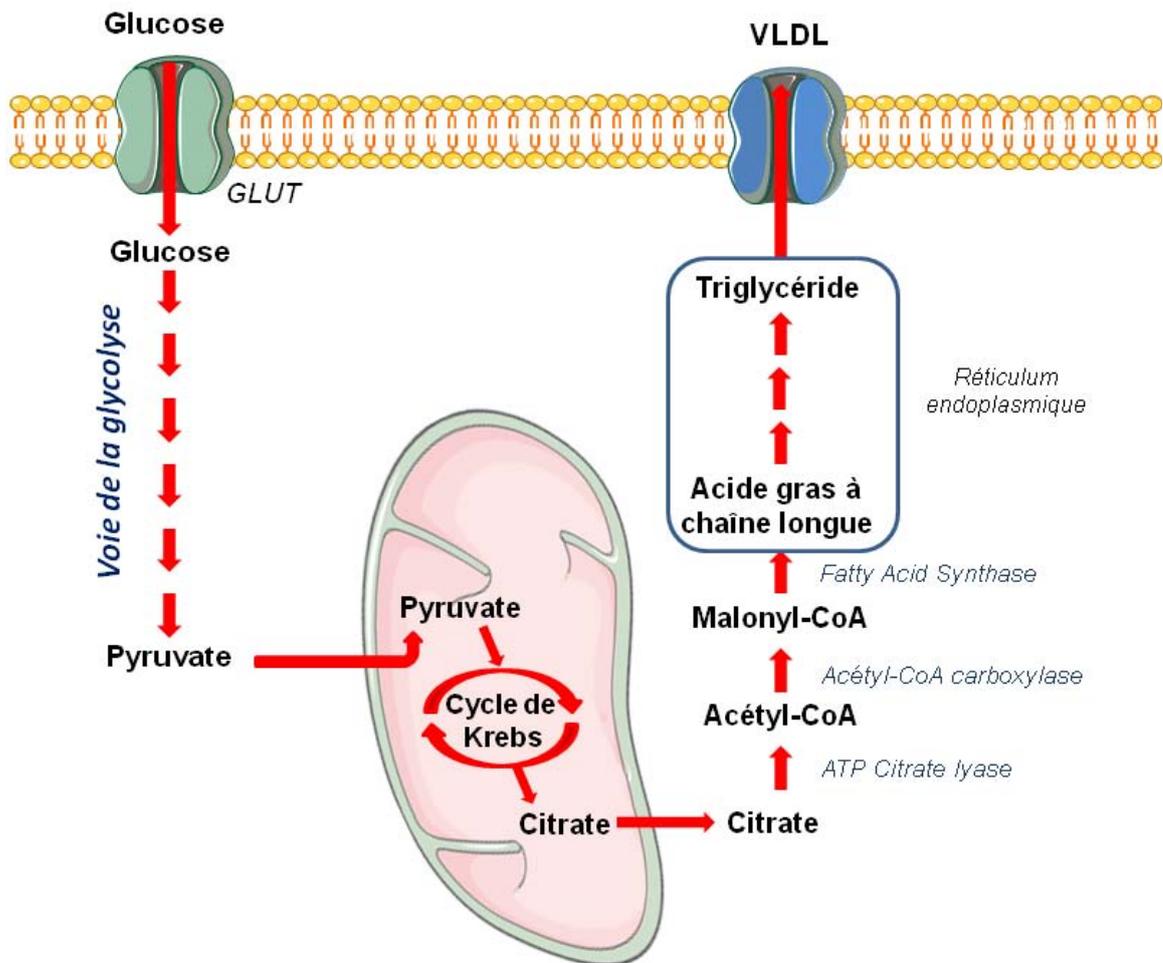


Figure 3 : Voie de la lipogénèse. Le pyruvate issu de la glycolyse est acheminé au sein de la mitochondrie. Son oxydation par le cycle de Krebs va générer du citrate, qui sera ramené dans le cytosol. Il subit ensuite diverses modifications qui vont aboutir à la synthèse de palmitate. Ce dernier sera alors envoyé au niveau du réticulum endoplasmique où il pourra être transformé en divers acides gras qui seront par la suite greffés sur un squelette de glycérol, permettant ainsi la synthèse de triglycérides.

d) Mécanismes producteurs de glucose

Lorsque la glycémie est trop faible, le foie va être capable de mobiliser ses stocks de glycogène et de reformer du glucose afin de le redistribuer dans la circulation sanguine. En effet, la structure ramifiée du glycogène permet la libération rapide de molécules de glucose-6-phosphate, transformées par la suite en glucose. Nommée **glycogénolyse (Figure 4)**, cette voie métabolique comprend 3 étapes et possède l'avantage de ne pas consommer d'ATP. En premier lieu, la glycogène phosphorylase va scinder les liaisons α (1-4) des molécules de glycogène, libérant ainsi du glucose-1-phosphate. Cette molécule va alors être convertie en glucose-6-phosphate par la phosphoglucomutase.

Après déphosphorylation par la glucose-6-phosphatase, le glucose-6-phosphate est transformé en glucose et peut ainsi sortir de la cellule.

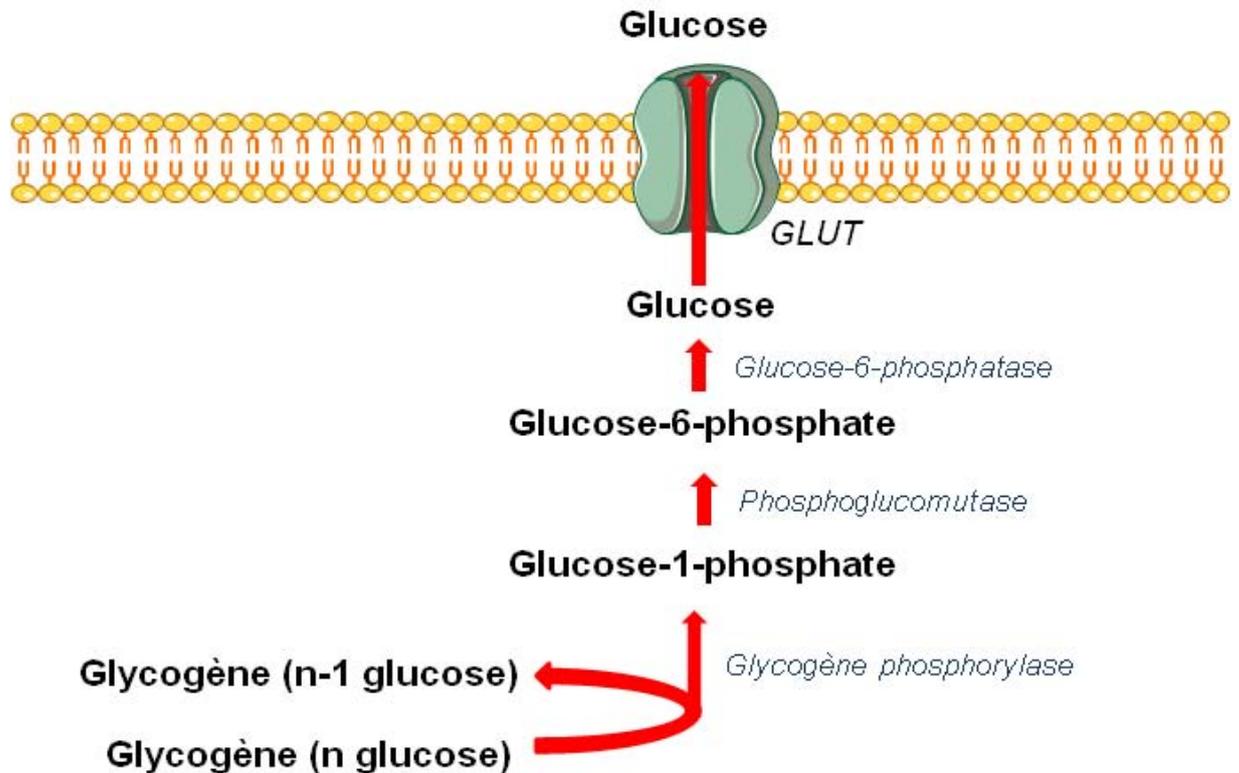


Figure 4 : Voie de la glycogénolyse. La glycogène phosphorylase détache une molécule de glucose-1-phosphate d'une molécule de glycogène. Ce dernier sera au final transformé en glucose-6-phosphate par l'action de la phosphoglucomutase. Au sein du foie uniquement, la glucose-6-phosphatase produira une molécule de glucose, qui pourra ensuite rejoindre la circulation sanguine.

Lorsque les stocks de glycogène ont été utilisés, l'organisme est capable de synthétiser du glucose à partir de substrats non glucidiques. Cette voie porte le nom de **néoglucogénèse (Figure 5)**. Seuls 3 organes, le foie, les reins ¹⁶ et l'intestin ¹⁷, sont capables de réaliser cette opération. Les substrats de départ sont principalement le pyruvate issu de la glycolyse (45%), le glycérol (30%) et les acides aminés (30 %). Le glycérol provient de l'hydrolyse complète des triglycérides et les acides aminés de la protéolyse musculaire. Ces 2 derniers substrats seront transformés préalablement en pyruvate. Ce dernier, au terme de multiples transformations enzymatiques, et notamment l'implication de la phosphoénol pyruvate carboxykinase (PEPCK), va générer du glucose-6-phosphate qui sera déphosphoryler en glucose par la glucose-6-phosphatase.

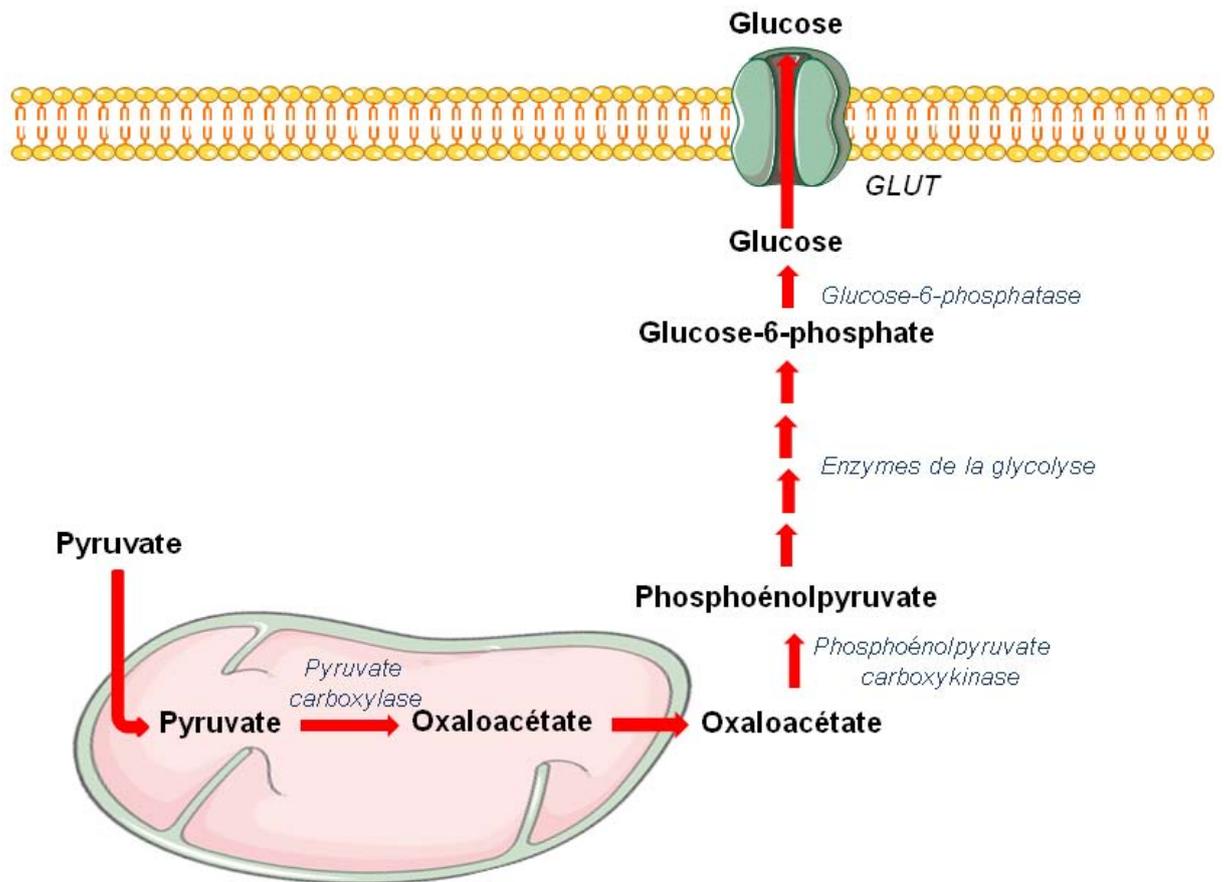


Figure 5 : Voie de la néoglucogénèse. Le pyruvate est transformé en oxaloacétate par l'intermédiaire de la mitochondrie. L'action de la PEPCCK permet de transformer ce dernier en phosphoénolpyruvate, qui va subir les réactions inverses de la voie de la glycolyse. Cela génère au final du glucose-6-phosphate, transformé ensuite en glucose.

Toutefois, le foie reste l'organe premier de cette synthèse dans le sens où il est le seul capable de produire du glucose *de novo* dans des proportions assez importantes pour pouvoir approvisionner l'ensemble de l'organisme. Les reins, eux, sont capables de produire du glucose (surtout à partir de l'acide aminé glutamine) mais les quantités produites sont nettement insuffisantes pour approvisionner l'ensemble de l'organisme et cette production n'est vraiment significative qu'après plusieurs jours de jeûne ¹⁸. Concernant la néoglucogénèse intestinale, son importance et son rôle physiologique restent encore très discutés, malgré l'expression des gènes des enzymes régulatrices de la néoglucogénèse dans l'intestin grêle de rat et d'homme ¹⁹ ainsi que l'observation de la forte activité de ces enzymes lors d'un jeûne ²⁰.

3) Régulation(s) du contrôle de l'homéostasie glucidique

Le maintien de l'homéostasie glucidique et l'équilibre entre les différentes voies métaboliques évoquées ci-avant sont rendus possibles par l'existence de fines régulations impliquant plusieurs variétés de signaux comme des métabolites circulants, des hormones et des signaux nerveux. Nous ne présenterons dans cette partie que les différents systèmes de régulation périphériques. Le rôle prépondérant de l'hypothalamus dans cette régulation sera détaillé dans la partie suivante.

a) Régulation endocrine

Les hormones impliquées dans la régulation de la glycémie les plus célèbres sont l'insuline et le glucagon. Ces 2 hormones peptidiques sont produites par le pancréas, plus précisément par les cellules α et β des îlots de Langerhans.

L'insuline et le glucagon ont des effets totalement opposés. La première va permettre le stockage sous forme de glycogène et de triglycérides et l'utilisation du glucose. Ces effets passent par l'activation des voies de la glycogénogénèse, de la lipogénèse et de la glycolyse et par l'inhibition des voies de production de glucose que sont la glycogénolyse et la néoglucogénèse. En revanche, le glucagon favorisera l'activation des voies de production d'énergie au détriment des voies d'utilisation et de stockage.

- *Voie de signalisation de l'insuline*

L'insuline est une protéine globulaire comportant 2 chaînes polypeptidiques reliées entre elles par 3 ponts disulfures. La première chaîne, α , comporte 21 acides aminés et la seconde, β , en comporte 30. Le gène de l'insuline code pour une seule chaîne peptidique, nommée préproinsuline, présentant un peptide signal de 24 acides aminés dans sa partie N-terminale et un peptide C au centre de la séquence. La séquence signal sera clivée lors de la translocation du peptide dans le réticulum endoplasmique, et les ponts disulfures seront mis en place, ce qui donnera alors la proinsuline. L'insuline mature résultera ensuite du clivage enzymatique du peptide C, ce qui formera les chaînes α et β ²¹ (**Figure 6**).

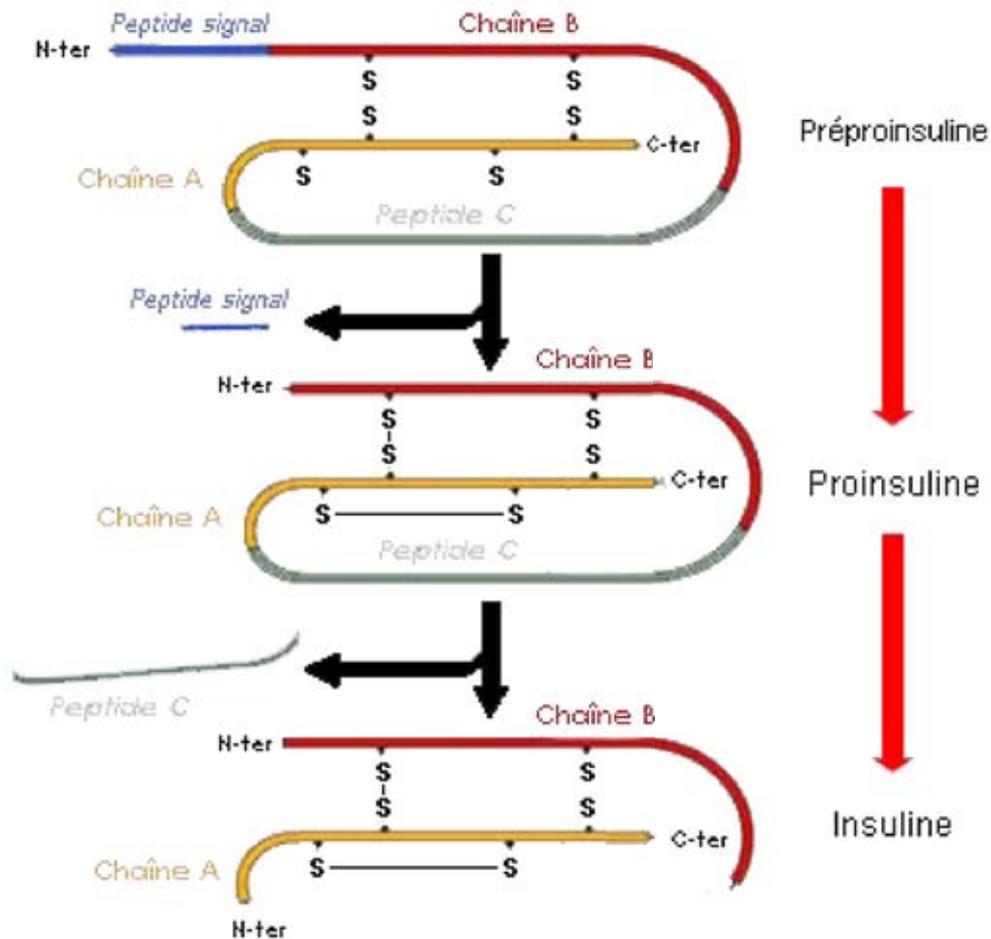


Figure 6 : Maturation de l'insuline. La préproinsuline comporte un peptide signal qui sera clivé pour donner la proinsuline. Ce précurseur se verra ensuite éliminer le peptide C présent au centre de sa séquence. Cela donnera alors l'insuline mature, composée de 2 chaînes α et β reliées entre elles par des ponts disulfures.

Le récepteur à l'insuline est composé de 2 sous unités α et de 2 sous unités β reliées entre elles par des ponts disulfures²². Il est présent à la membrane des tissus cibles de l'hormone (principalement le foie, le muscle et le tissu adipeux). Il s'agit d'un récepteur transmembranaire comportant un domaine de liaison à l'hormone dans sa partie extracellulaire, et une partie intracellulaire pourvue d'une activité tyrosine-kinase²³.

En l'absence de liaison à l'insuline, le récepteur est en configuration inactive. En revanche, lors de la fixation de l'insuline, les 2 sous unités porteuses de l'activité tyrosine kinase se rapprochent et effectuent une transphosphorylation (phosphorylation d'une sous unité par l'autre) sur des résidus tyrosines précis²⁴. Cette première étape de phosphorylation va ouvrir la voie à la

phosphorylation en chaîne d'autres tyrosines de ces sous unités. Ces tyrosines nouvellement phosphorylées vont être des points d'ancrage pour des protéines intracellulaires porteuses d'un domaine PTB (*PhosphoTyrosin Binding*)²⁵ comme la famille des IRS (*Insulin receptor substrate*). Il existe 4 isoformes (de 1 à 4) de ces protéines, dont les plus largement représentées sont IRS-1 au niveau du muscle et du tissu adipeux, et IRS-2 au niveau du cerveau et des cellules β des îlots de Langerhans (toutefois, en raison de l'absence du récepteur à l'insuline sur les cellules β pancréatiques, le recrutement d'IRS-2 se fera dans ce cas par l'intermédiaire du récepteur à l'IGF1). Ces dernières vont servir d'intermédiaires entre le récepteur à l'insuline et le reste de la voie de signalisation. Celles-ci vont donc s'ancrer sur une tyrosine phosphorylée du récepteur à l'insuline *via* leur domaine PTB, et également aux phospholipides membranaires *via* un domaine dit PH (pour *Pleckstrin Homology*, principal substrat de la protéine kinase C)²⁶. De cette façon, la moitié carboxyterminale des protéines IRS se trouve alors à proximité du domaine tyrosine kinase du récepteur, qui phosphoryle des résidus tyrosines spécifiques sur les IRS. Ces parties phosphorylées sont reconnues par des protéines relais, comme la sous unité p85 de la PI3K (*Phosphatidylinositol 3 kinase*)²⁷ ou la protéine adaptatrice Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*)²⁸ qui est un relais d'activation de la voie des MAP kinases. Ces protéines adaptatrices possèdent dans leur séquence un domaine SH2 (*Src homology 2*) permettant leur liaison²⁹.

Activées par leur liaison, ces protéines vont ensuite permettre la mise en place de l'ensemble des effets de l'insuline. Ainsi, la PI3K va permettre le recrutement et l'activation de la protéine Akt. Cette dernière va à son tour phosphoryler et activer d'autres relais intracellulaires impliqués en priorité dans les effets métaboliques de l'hormone (translocation des transporteurs GLUT4 à la membrane, synthèse de glycogène,...). La protéine Grb2, elle, va, *via* le facteur d'échange nucléotidique SOS (*Son of sevenless*), activer une petite protéine G : Ras. Cette dernière va ensuite activer la kinase Raf, qui va permettre l'activation par phosphorylation de 2 MAP kinases : ERK1 et 2 (*Extracellular signal-regulated kinase*). Ces dernières, par l'entremise de facteurs de transcription, vont permettre l'expression de gènes impliqués dans la synthèse protéique et la prolifération (**Figure 7**).

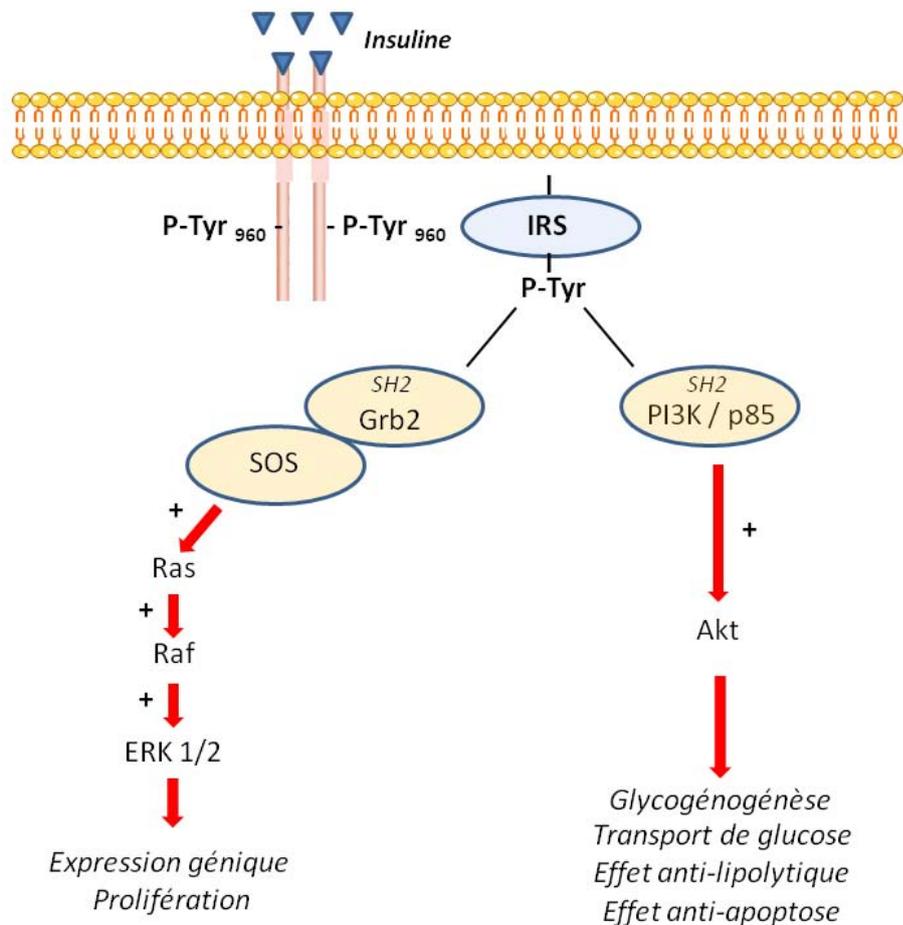


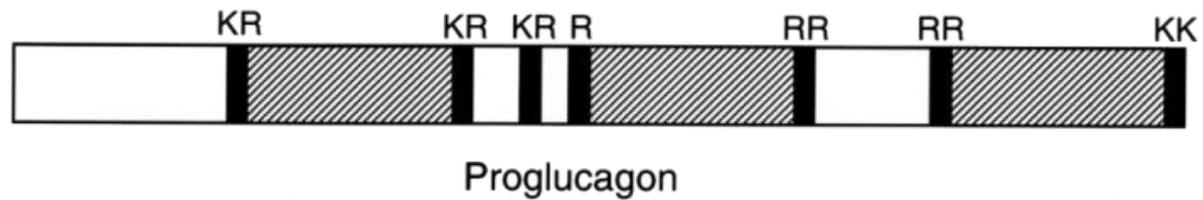
Figure 7 : Voie de signalisation de l'insuline. La fixation de l'insuline sur son récepteur va induire la phosphorylation de ce dernier sur des résidus tyrosine permettant alors à la protéine IRS1 de se fixer et d'être activée. IRS1 phosphorylée active à son tour la PI3K en se liant sur sa sous-unité p85. Celle-ci active alors Akt qui augmente la translocation de GLUT4 à la membrane et permet ainsi l'augmentation du transport de glucose et de son utilisation. En parallèle, IRS1 également va activer la voie des MAP kinases qui permettront l'induction de la synthèse protéique et de la prolifération cellulaire.

La fin de la signalisation a lieu avec l'endocytose des complexes insuline/récepteurs au sein des endosomes, dont le milieu acide est favorable à l'activité de peptidases capables de dégrader les complexes³⁰.

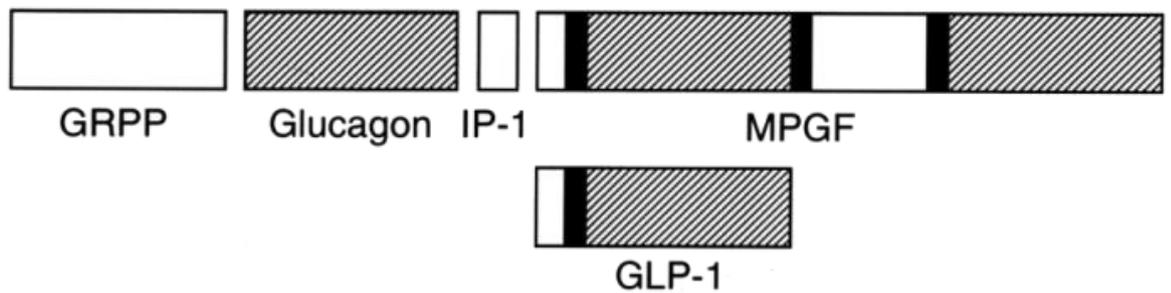
- *Voie de signalisation du glucagon*

Le glucagon est un peptide composé de 29 acides aminés, très conservé entre les espèces puisque l'on retrouve une homologie de séquence complète chez tous les mammifères. De la même façon que pour l'insuline, le gène du glucagon code pour une chaîne peptidique nommée préproglucagon. La séquence comporte un peptide signal qui sera clivé pour former le proglucagon. Ce peptide sera ensuite clivé dans les cellules α des îlots de Langerhans par

l'enzyme PC2 (*Prohormone convertase 2*) pour produire le glucagon. Cependant, au niveau de l'intestin, dans les cellules L, d'autres peptides (nommés GLP-1 et 2 pour *Glucagon Like Peptide 1 et 2*) peuvent aussi être formés par des clivages alternatifs de la PC1 sur le même précurseur (**Figure 8**). Ces peptides alternatifs font partie pour certains de la famille des incrétines, qui seront évoquées ci-après.



Pancréas



Intestin

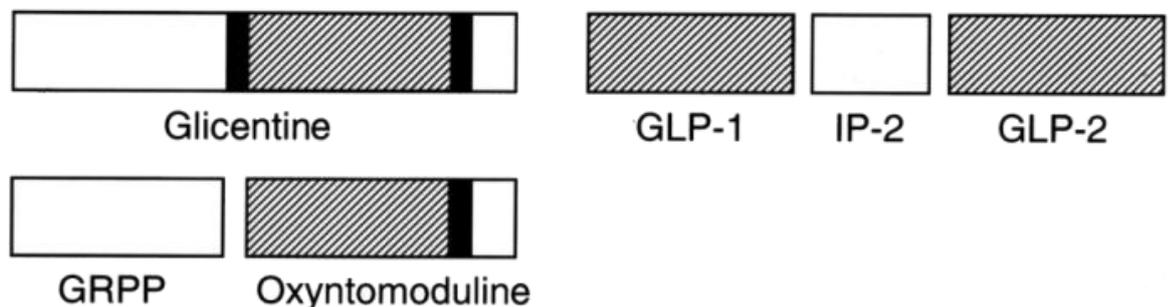


Figure 8 : Maturation du glucagon (d'après Furuta. 2001). Le clivage du proglucagon est différent selon l'organe dans lequel il se déroule. Au niveau du pancréas, ce précurseur sera clivé de façon à produire du glucagon et également du GLP-1. Il résulte également un peptide MPGF (*Major ProGlucagon Fragment*) dont la fonction reste encore à identifier. Au niveau de l'intestin, le proglucagon est clivé en GLP-1 et 2 et glicentine. Ce dernier peptide sera ensuite à nouveau clivé en GRPP et oxyntomoduline (impliquée dans la modulation de la digestion).

Le récepteur au glucagon est une glycoprotéine membranaire de 63 kDa³¹ qui appartient à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G. Il est présent dans un grand nombre de tissus comme le foie, le rein, l'intestin, le cerveau, le tissu adipeux, le cœur et le pancréas³². La fixation du glucagon à son récepteur va entraîner le recrutement et l'activation de la petite protéine G associée au récepteur. Au moins 2 types de protéines G sont connus pour être associés à ce récepteur : $G_{\alpha s}$ et G_q ³³.

Concernant la protéine $G_{\alpha s}$, sous l'effet de la fixation de l'hormone à son récepteur, la sous-unité α va libérer un nucléotide GDP et le remplacer par une molécule de GTP. Le changement de conformation qui en résulte va entraîner la désolidarisation des 3 chaînes qui la composent et la libération de la sous unité α . Celle-ci va aller se fixer à l'adénylate cyclase qui va ainsi être activée et convertir l'ATP en AMPc³⁴. L'augmentation du taux intracellulaire d'AMPc va induire l'activation de la PKA (*Protein kinase A*), qui va permettre d'activer les voies de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse tout en inhibant la voie de la glycolyse. Ainsi, la PKA va phosphoryler et activer la glycogène phosphorylase kinase, une enzyme elle-même capable de phosphoryler et d'activer la glycogène phosphorylase³⁵. Cette dernière enzyme est ensuite responsable d'initier la dégradation du glycogène. Dans le même temps, au niveau hépatique, la protéine CREB (*cAMP response element-binding*) va être activée et permettre d'augmenter la transcription du facteur PGC-1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α*). Ce dernier va alors favoriser l'expression du gène de la PEPCK, enzyme clef de la néoglucogénèse³⁶.

De la même façon, le recrutement de la protéine G_q va permettre l'activation de la phospholipase C ce qui aboutira à une libération intracellulaire de calcium³⁷. Toutefois, cette augmentation de la concentration de calcium intracellulaire est aussi en partie médiée par la PKA, puisque l'utilisation d'un inhibiteur de cette enzyme entraîne une libération moins importante de calcium en réponse à une stimulation au glucagon sur des cellules en culture³⁸. Cette libération va permettre de potentialiser les effets induits par l'activation de la PKA (**Figure 9**).

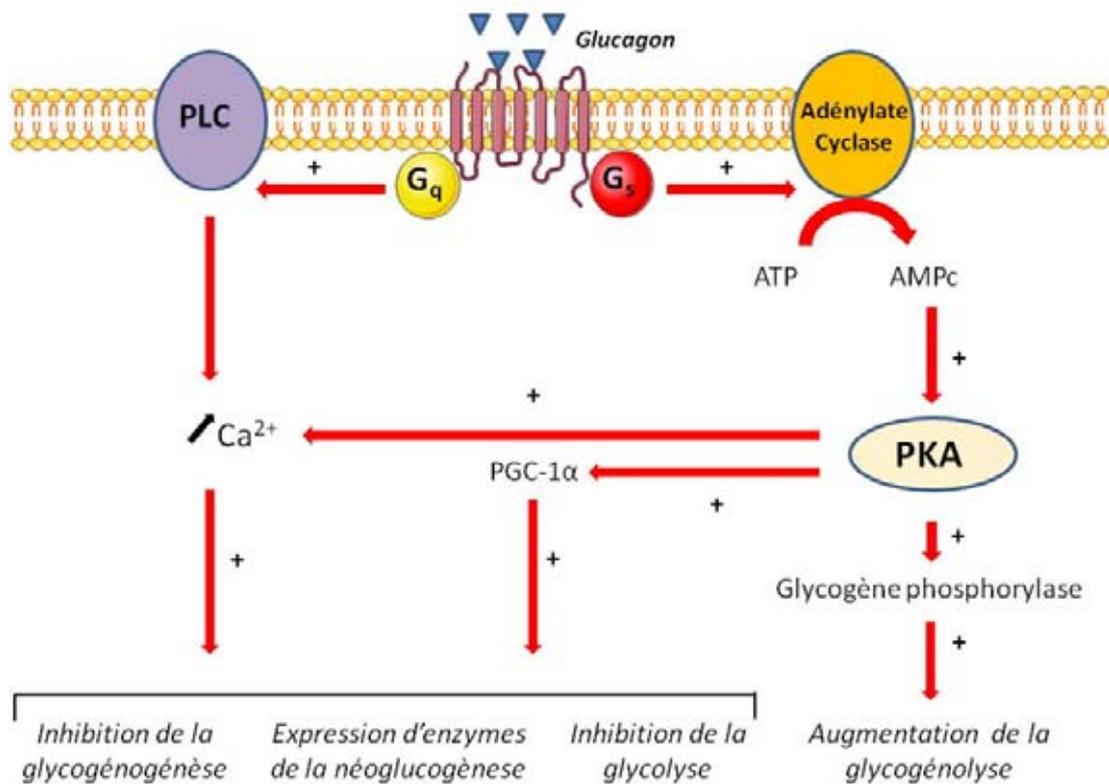


Figure 9 : Voie de signalisation du glucagon. Le récepteur au glucagon peut être couplé soit à une protéine G_s soit une protéine G_q. Dans le premier cas, la fixation du glucagon va entraîner l'activation de l'adénylate cyclase. La conséquence en sera l'activation de la PKA qui permettra, d'une part, d'initier la glycogénolyse et, d'autre part, d'activer le facteur de transcription PGC-1α. Dans le cas d'un couplage avec une protéine G_q, la fixation du glucagon entrainera une augmentation de libération intracellulaire de calcium via l'activation de la PLC. Cette augmentation des taux de calcium participera, au même titre que PGC-1α, à l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la régulation des différentes voies métaboliques.

- Les incrétines
- ✓ Origine, structure et production des incrétines

Les incrétines sont des hormones gastro-intestinales libérées principalement par les cellules endocrines de l'épithélium intestinal en réponse aux nutriments³⁹. Les représentants majeurs en sont le GLP-1 et le GIP (*Glucose-dependent insulinotropic polypeptide*). Ces hormones permettent l'établissement de « l'effet incrétine », c'est-à-dire l'augmentation de la sécrétion d'insuline (3 à 4 fois plus importante) en réponse à une charge orale de glucose, en comparaison à celle observée après l'injection intraveineuse d'une même dose de glucose⁴⁰. Cet effet incrétine est un paramètre important de la régulation de l'homéostasie glucidique puisque les souris invalidées pour chacun des

récepteurs de ces peptides présentent des niveaux sanguins d'insuline plus faibles par rapport à leurs contrôles en réponse au glucose, ce qui aboutit à une diminution de la tolérance au glucose^{41,42,43}.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le GLP-1 est un peptide de 29 acides aminés produit suite au clivage du proglucagon. Selon le tissu où il est exprimé, ce précurseur ne sera pas clivé de la même façon (voir Figure 8)⁴⁴. Cela explique donc l'absence de production de GLP-1 au niveau du pancréas où l'on retrouvera un grand peptide nommé MPGF (*Major proglucagon fragment*)⁴⁵ dont la fonction reste encore inconnue. En revanche, au niveau de l'intestin et du cerveau, ce MPGF apparaît clivé en plusieurs peptides : le GLP-1 et le GLP-2. Plus précisément, on retrouvera du GLP-1 produit dans les parties distales de l'intestin par les cellules L de l'épithélium intestinal, et par le NTS (*Noyau du tractus solitaire*) au niveau central. Le GIP, quant à lui, est un peptide de 42 acides aminés produit au niveau duodénal par les cellules K, et également au niveau central dans l'hippocampe, où il participerait à la survie cellulaire⁴⁶.

Les taux circulants d'incrétines sont faibles lors du jeûne. Le stimulus majeur pour la sécrétion du GIP et du GLP-1 semble être l'arrivée de nutriments dans la lumière intestinale⁴⁷. En effet, en présence de nutriments, les taux circulants de GIP et de GLP-1 augmentent rapidement en une dizaine de minutes⁴⁸. Du fait de la localisation majoritairement distale des cellules L, productrices du GLP-1, cette rapidité de sécrétion laisse penser à l'existence d'un contrôle mêlant mécanismes nerveux et mécanismes endocriniens initiés par les nutriments au niveau de la partie proximale de l'intestin plutôt qu'à une action directe sur les cellules L. A cet effet, une équipe a pu montrer que le GIP, dont les cellules productrices sont majoritairement duodénales, était sécrété rapidement suite à l'arrivée de nutriments dans l'intestin et était par la suite capable de stimuler la production de GLP-1 par les cellules L⁴⁹. D'autres études ont d'ailleurs confirmé que les incrétines étaient capables de contrôler leur propre sécrétion : des souris invalidées pour le récepteur au GIP présentent un contenu intestinal de GLP-1 réduit⁴³. Concernant la partie nerveuse de cette régulation, une autre étude a également montré que la stimulation électrique de la branche cœliaque du nerf vague entraînait une

augmentation de la sécrétion de GLP-1 ; et qu'à l'inverse, les animaux ayant subi une vagotomie ne sécrétait plus de GLP-1 en réponse à une prise alimentaire⁵⁰. Ces données confirment donc l'existence d'un système complexe et multifactoriel permettant de réguler rapidement la production de GLP-1.

✓ Effets biologiques

Une fois produits, ces 2 facteurs GIP et GLP-1 vont pouvoir passer dans la circulation sanguine. Toutefois, ces peptides seront rapidement dégradés par une enzyme, la DPP-IV (*Dipeptidyl-peptidase IV*) qui génère des peptides inactifs, voire ayant une action antagoniste⁵¹. Ainsi, la demi-vie de ces facteurs dans la circulation sanguine est très courte (de l'ordre de 3 minutes)⁵² mais est suffisante pour leur permettre d'atteindre les tissus présentant leurs récepteurs respectifs. Ces 2 récepteurs sont, au même titre que le récepteur au glucagon, des récepteurs à 7 domaines transmembranaires⁵³. Ils sont composés chacun d'environ 460 acides aminés (463 pour le GLP-1R et 466 pour le GIP-R) et sont structurellement très proches, puisque leur homologie de séquence est de près de 90%. Leur expression tissulaire est très large : on les retrouve au niveau du pancréas, du poumon, du cœur, du rein, de l'intestin, de l'estomac et également au niveau central, dans l'hypothalamus et le tronc cérébral^{54,55}.

Les incrétines ont pour effet majeur de favoriser la tolérance au glucose de l'organisme par leur action sur le pancréas et la stimulation de l'exocytose des vésicules contenant l'insuline. La fixation à leurs récepteurs respectifs va induire une augmentation du taux d'AMPC intracellulaire via l'activation originale de l'adénylate cyclase par la protéine Epac⁵⁶. La conséquence directe en sera la fermeture des canaux potassiques membranaires ATP sensibles⁵⁷. Ainsi, l'accumulation des ions K⁺ au sein de la cellule pancréatique va permettre sa dépolarisation et l'ouverture de canaux calciques membranaires. De ce fait, l'entrée massive d'ions calcium dans la cellule va entraîner l'exocytose de vésicules contenant l'insuline, qui va ainsi être libérée dans la circulation sanguine et agir sur ses tissus cibles. En parallèle, le GLP-1 est aussi capable d'augmenter la transcription et la biosynthèse de l'insuline en augmentant l'expression du facteur de transcription Pdx-1 (*Pancreatic and duodenal homeobox 1*)⁵⁸. Il a également été montré que ce facteur permettait

d'augmenter la prolifération et la survie des cellules β pancréatiques^{59,60} et était capable d'inhiber la sécrétion du glucagon. Toutefois, pour ce dernier point, les mécanismes impliqués restent relativement peu compris et encore débattus. L'hypothèse la plus développée actuellement est que, du fait du très faible nombre de récepteurs au GLP-1 sur les cellules α pancréatiques, l'inhibition de la sécrétion de glucagon ne passerait pas par un effet direct du GLP-1 sur la cellule, mais impliquerait plutôt une inhibition du système nerveux parasymphatique⁶¹.

Les incrétines ont également des effets extra-pancréatiques (**Figure 10**). Ces facteurs peuvent tout d'abord moduler négativement la vidange gastrique⁶². Toutefois, la capacité du GIP à induire cet effet reste encore discutée et semble dépendre de la dose. Certains auteurs ont même montré chez l'humain que ce peptide ne participait pas à l'inhibition de la vidange gastrique⁶³. Cette diminution de la vidange contribue d'une part à stopper la prise alimentaire et, d'autre part, de ralentir le transit des nutriments de l'estomac à l'intestin, ce qui permet de réduire l'importance de l'hyperglycémie post-prandiale et ainsi contribuer à la normalisation de la glycémie. Au-delà du système digestif, les incrétines agissent également au niveau foie, mais vraisemblablement de façon indirecte car la présence des récepteurs au GIP et au GLP-1 sur ce tissu est encore controversée⁶⁴. Le GIP et le GLP-1 sont tous les deux capables d'y inhiber la production hépatique de glucose. Le GLP-1 a également des fonctions supplémentaires, en augmentant la synthèse de glycogène⁶⁵ et la sensibilité à l'insuline⁶⁶. Cet effet sur la sensibilité à l'insuline est également un effet des incrétines retrouvé dans d'autres tissus, et notamment le tissu adipeux. En effet, il a été très récemment rapporté que le GIP permettait également d'augmenter la sensibilité à l'insuline du tissu adipeux grâce à la translocation des transporteurs GLUT 4 à la membrane plasmique et ce, *via* l'activation du facteur de transcription CREB et d'une isoforme particulière de la PI3K⁶⁷. En revanche, concernant le GLP-1, aucune étude n'a encore montrée un effet sur la sensibilité à l'insuline du tissu adipeux, mais certaines ont mis en évidence que ce facteur était capable de stimuler la captation de glucose stimulée par l'insuline dans ce tissu⁶⁸ et également d'y favoriser l'oxydation de ce dernier⁶⁹. Enfin, le GLP-1 produit au niveau central peut également jouer sur

la régulation de l'homéostasie glucidique, notamment au niveau musculaire et hépatique ⁷⁰ *via* un relais nerveux. Cette composante nerveuse des effets du GLP-1 sur l'homéostasie glucidique sera présentée dans la partie suivante de ce manuscrit.

En dehors du métabolisme glucidique, les incrétines sont également capables de moduler le métabolisme lipidique. A ce titre, toujours dans le tissu adipeux, le GIP va principalement stimuler la lipolyse ⁷¹ : il permet de favoriser la synthèse des acides gras et leur re-estérification ⁷² et d'augmenter la synthèse ⁷³ et l'activité ⁷⁴ de la LPL (*Lipoprotein lipase*). Le GLP-1 présente aussi une action sur le métabolisme lipidique mais cet effet et les mécanismes précis restent encore peu clairs. En effet, une étude menée sur des adipocytes isolés de rats a montré que le GLP-1 exerçait un effet lipolytique ⁷⁵ tandis qu'une dizaine d'années plus tard, une autre équipe ayant étudié les effets du GLP-1 sur des adipocytes isolés humains rapportait des effets à la fois lipolytiques et lipogéniques, dépendants de la concentration en GLP-1 ⁷⁶.

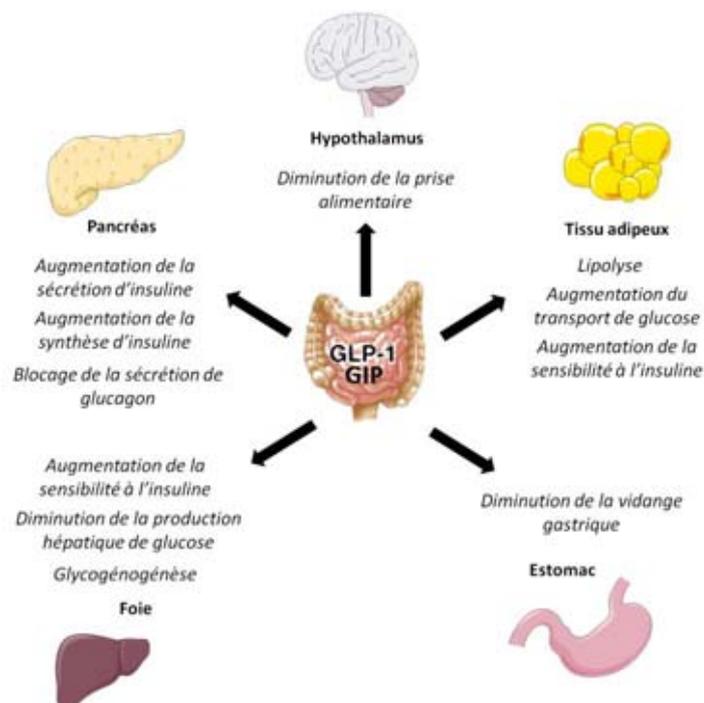


Figure 10 : Effets métaboliques des incrétines. Le GIP et le GLP-1 exercent de nombreux effets participant à la régulation de l'homéostasie énergétique. Produits en réponse à l'arrivée de nutriments dans l'intestin, ces peptides vont notamment augmenter la biosynthèse et la sécrétion d'insuline par le pancréas tout en augmentant la sensibilité à cette hormone du tissu adipeux et du foie. Par ailleurs, la production de glucose par le foie sera inhibée, au même titre que la vidange gastrique.

- *Autres régulateurs endocriniens : les adipokines*

Le tissu adipeux a longtemps été considéré comme un simple organe de stockage des lipides. Depuis une quinzaine d'années, ce tissu est réellement considéré comme capable de sécréter de nombreux facteurs endocriniens aptes à jouer un réel rôle dans la régulation de l'homéostasie énergétique⁷. Le nom d'adipokines a été donné à ces sécrétions. A l'heure actuelle, plus d'une cinquantaine d'entre elles ont été identifiées et leur implication précise dans la régulation de l'homéostasie énergétique reste encore largement à étudier. Les effets des adipokines les plus connues et les mécanismes sous-jacents seront plus largement détaillés dans la partie IV.D de ce manuscrit.

b) Régulation métabolique

Dans le cadre de l'homéostasie énergétique, les différents substrats sont également des acteurs participant à la régulation de ce phénomène. Concernant l'homéostasie glucidique, le glucose occupe une place importante dans sa propre régulation.

- *Glucose sensing pancréatique*

Le glucose circulant est à l'origine de la sécrétion d'insuline, hormone clef du métabolisme énergétique qui permettra sa captation et son utilisation par les tissus, et supprimera la production hépatique de glucose. Cette sécrétion d'insuline en réponse à l'entrée de glucose est le plus souvent nommée « glucose sensing pancréatique ».

Au niveau du pancréas, et plus précisément des cellules β des îlots de Langerhans productrices d'insuline, le glucose circulant va pouvoir pénétrer *via* le transporteur non saturable GLUT2 chez le rongeur et le transporteur non saturable GLUT1 chez l'humain. Comme cela a déjà été évoqué auparavant, les molécules de glucose sont transformées en G6P puis oxydées par la voie de la glycolyse. Cela permet la production d'énergie sous forme d'ATP, et entraîne la fermeture de canaux potassiques membranaires ATP sensibles. Ainsi, de la même façon que pour la sécrétion d'insuline stimulée par le GLP-1, l'accumulation des ions K^+ au sein de la cellule va permettre d'ouvrir les canaux

calciques membranaires et l'entrée de calcium va entraîner l'exocytose des vésicules d'insuline (**Figure 11**).

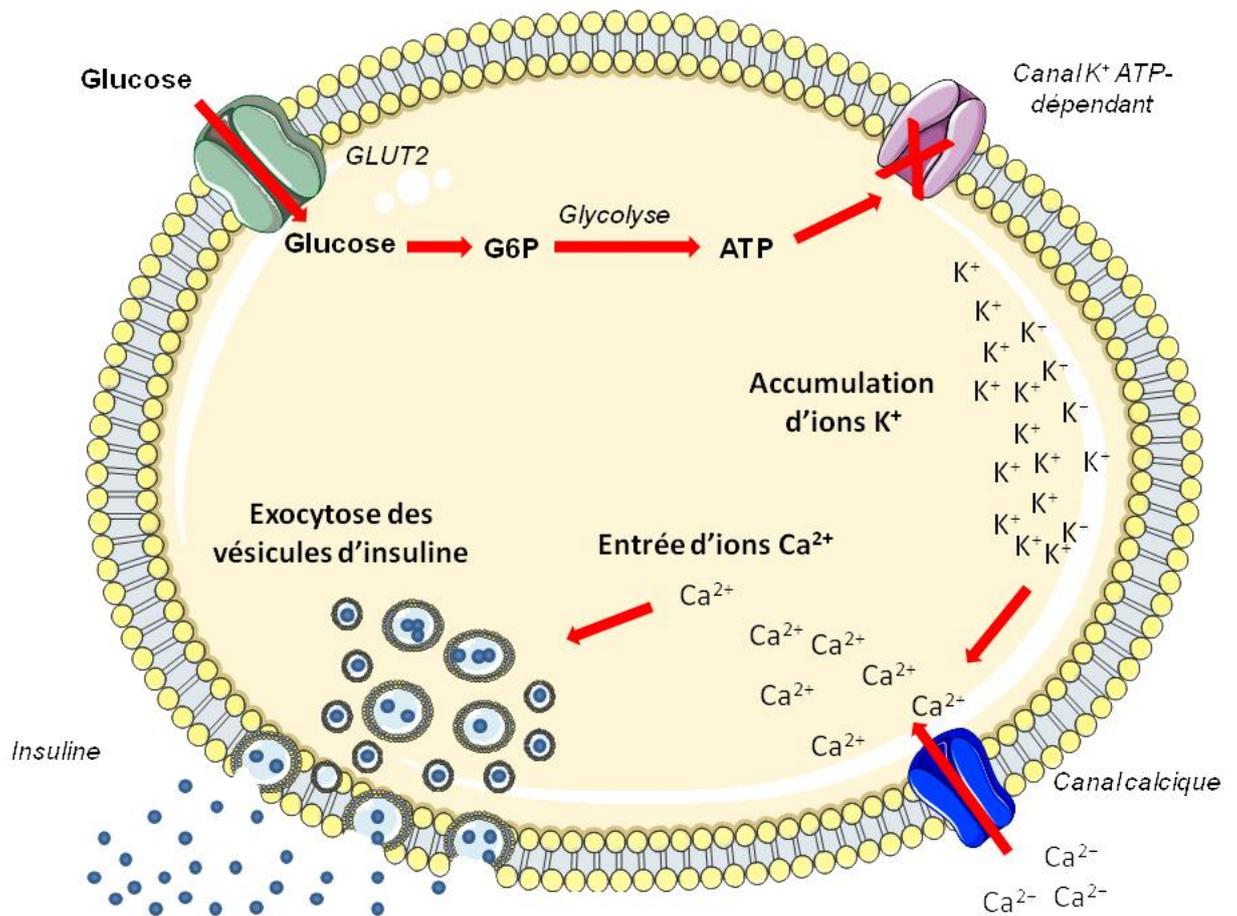


Figure 11 : Sécrétion de l'insuline par les cellules β du pancréas. L'entrée de glucose dans la cellule β pancréatique entraîne une augmentation du taux d'ATP intracellulaire. Ceci provoque la fermeture des canaux K^+ ATP-dépendants. La conséquence est donc l'accumulation d'ions K^+ dans la cellule, ce qui entraîne l'ouverture de canaux calciques et l'entrée massive d'ions Ca^{2+} dans la cellule. Cette entrée de calcium est à l'origine de l'exocytose des vésicules contenant l'insuline.

Certaines pistes évoquent également un rôle clef de la mitochondrie⁷⁷ dans ce mécanisme. Plus précisément, en présence de glucose, cet organelle produit des dérivés oxygénés que l'on nomme EAOs (*Espèces actives de l'oxygène*) et qui sont capables de réagir avec les molécules environnantes. Ces dérivés semblent jouer un rôle déterminant dans la sécrétion d'insuline⁷⁸. En effet, le traitement d'îlots pancréatiques isolés par des antioxydants supprime la production d'EAOs en réponse à une stimulation au glucose, et inhibe

également l'exocytose de vésicules d'insuline ⁷⁹. Ainsi, l'entrée de calcium au sein de la cellule pourrait, au moins en partie, être contrôlée par ces EAOs.

La sécrétion d'insuline en réponse au glucose est biphasique : un premier pic de sécrétion est observé rapidement après l'arrivée du glucose, et un second pic, moins intense mais plus étalé, peut-être observé dans des temps plus longs ⁸⁰. Le système K_{ATP} -dépendant ne semble pas être l'unique mécanisme permettant l'établissement de ces 2 phases. En effet, dans des cellules β pancréatiques exposées à du glucose et dont les canaux K^+ restent pharmacologiquement constamment ouverts, l'insuline est toujours sécrétée, suggérant donc l'existence d'un mécanisme indépendant ⁸¹. Ainsi, il est maintenant considéré que le mécanisme K_{ATP} -dépendant permettrait la mise en place de la première phase rapide de sécrétion, et que le second mécanisme, indépendant de la fermeture des canaux K^+ , permettrait d'assurer la seconde phase de sécrétion. Les mécanismes et acteurs moléculaires impliqués dans cette seconde phase restent encore inconnus. Toutefois, un grand nombre de potentiels acteurs moléculaires tels que le NO (*monoxyde d'azote*) et le GMPc ont déjà été testés sans succès, à l'exception d'un analogue de l'adénosine qui a permis d'augmenter la production d'insuline par les îlots pancréatiques en présence et en absence de glucose ⁸². Ces résultats suggèrent donc une éventuelle implication des nucléotides d'adénine dans cette seconde phase de sécrétion d'insuline.

- *Voie de l'AMPK*

L'AMPK (*AMP activated protein kinase*) est une protéine considérée comme un senseur métabolique incontournable exprimée dans un grand nombre de tissus et fortement impliqué dans la régulation de l'homéostasie glucidique ⁸³. En effet, des souris génétiquement modifiées chez lesquelles cette enzyme est rendue inactive montre une tolérance au glucose diminuée ainsi qu'une diminution de la sensibilité à l'insuline ⁸⁴. Structuellement, cette enzyme comporte 3 sous-unités : α , β et γ . La sous-unité α porte une activité catalytique sérine/thréonine kinase, tandis que les 2 autres ont des fonctions régulatrices.

L'AMPK est activée par différents stress induisant une déplétion de la cellule en énergie et est donc sensible aux variations de la glycémie. En effet, lorsque le

glucose circulant est en trop faibles quantités, la consommation des organes et tissus en ATP sera supérieure à la production, menant ainsi à une augmentation du ratio AMP/ATP. Or, l'AMPK est une enzyme particulièrement sensible aux variations de ce rapport⁸⁵. En effet, la présence d'AMP au niveau du site de fixation va favoriser une phosphorylation activatrice au niveau d'un résidu sérine de la sous-unité catalytique α . Cette phosphorylation essentielle pour l'activation de l'AMPK est réalisée par des AMPKKs (*AMPK kinases*) dont les 2 principales représentantes, récemment identifiées, sont LKB1 (*Liver kinase B1*)⁸⁶ et CaMKK β (*Ca²⁺ Calmodulin kinase kinase β*)⁸⁷. Ainsi activée lors d'une diminution de la glycémie, l'AMPK va agir afin de réajuster la balance énergétique cellulaire et faire produire de l'ATP (**Figure 12**).

Dans le cadre du métabolisme glucidique, au niveau du muscle squelettique et du cœur, l'AMPK va favoriser le transport de glucose *via* la translocation du transporteur GLUT4 à la membrane⁸⁸ par un mécanisme qui pourrait impliquer le NO⁸⁹. Toutefois, une autre étude a également rapporté une activation du transporteur GLUT1 par l'AMPK lors d'un stress métabolique⁹⁰. L'enzyme, en plus de son transport, favorise aussi l'oxydation du glucose dans ces tissus. En effet, la voie de la glycogénogénèse est bloquée *via* l'inhibition de la glycogène synthase⁹¹, et la glycolyse est stimulée par l'activation de la PFK-2 (*Phosphofructokinase 2*) dont le produit est un puissant stimulateur allostérique de la PFK-1, enzyme clef de cette voie⁹².

D'autre part, au niveau du foie, l'AMPK réprime l'expression des gènes de la lipogénèse tout en activant les voies permettant l'oxydation du glucose et des acides gras⁹³. L'effet de l'AMPK sur l'expression des gènes de la néoglucogénèse au niveau hépatique, et particulièrement celui codant pour la PEPCK, est encore discutée. En effet, certaines études ont montré une augmentation de son expression⁹⁴, tandis que d'autres la retrouvent inchangée⁹⁵ ou même réduite⁹⁶.

Au niveau des autres tissus impliqués dans la régulation de l'homéostasie glucidique, tels que le tissu adipeux et le pancréas, les effets de l'AMPK sont moins développés. Ainsi, dans le tissu adipeux, l'enzyme permet d'augmenter faiblement le transport de glucose en absence d'insuline. En revanche, en

présence d'insuline, ce transport est totalement inhibé ⁹⁷. Enfin, concernant le pancréas, l'AMPK permet d'inhiber la sécrétion d'insuline par la cellule β pancréatique et semble également jouer négativement sur l'expression de son précurseur ⁹⁸.

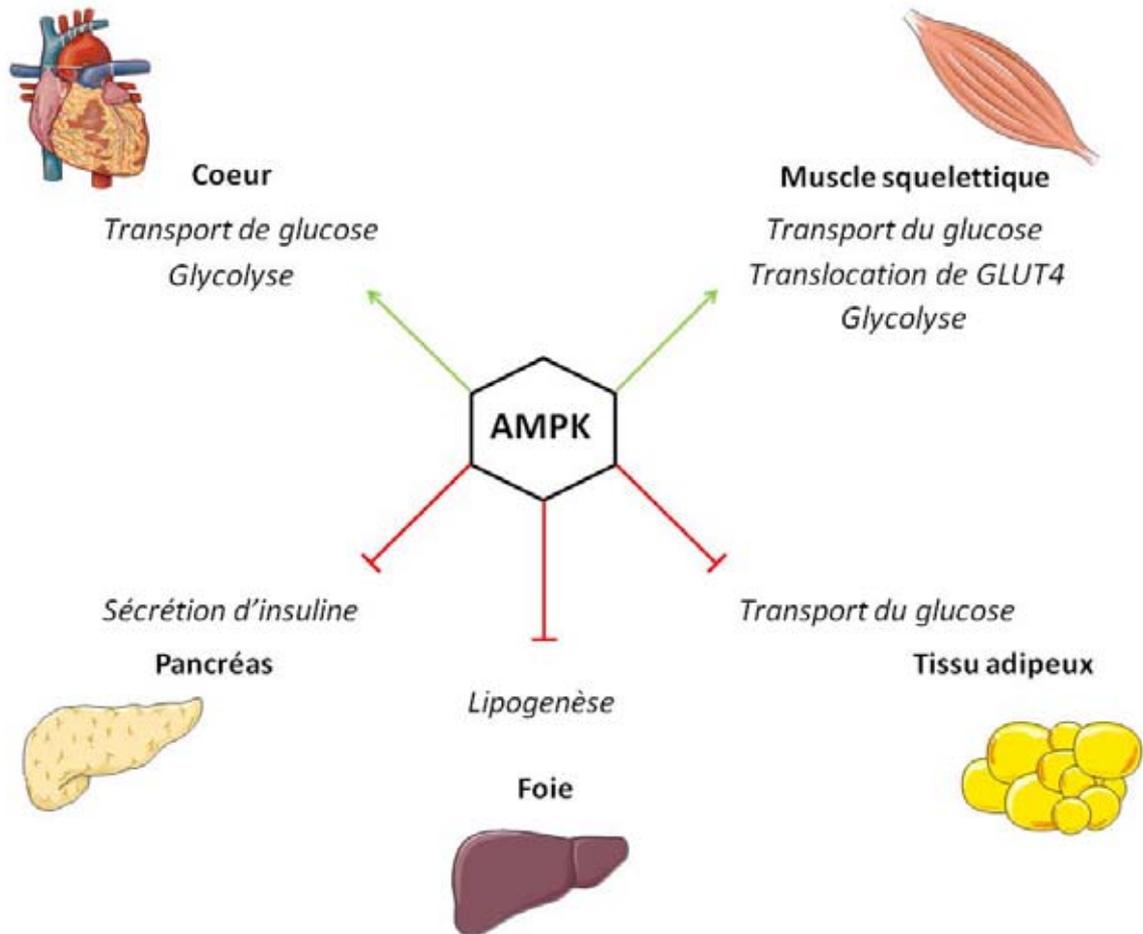


Figure 12 : Effets de l'AMPK (D'après Hardie, 2004). Une activation aigue de l'AMPK favorise l'entrée de glucose dans le muscle squelettique et le cœur tout en favorisant le déclenchement d'une prise alimentaire au niveau central. En parallèle, l'AMPK inhibe la lipogénèse hépatique et prévient la sécrétion d'insuline par le pancréas.

- Voie mTOR

La protéine TOR (*Target Of Rapamycin*) est une sérine/thréonine kinase qui a été découverte en 1991 chez *Saccharomyces cerevisiae* en tant qu'acteur sensibilisant à l'antifongique rapamycine ⁹⁹. Suivant cette découverte, l'homologue de la protéine TOR a été identifié chez les mammifères et fût nommé mTOR (*Mammalian Target Of Rapamycin*) ¹⁰⁰. Sa distribution tissulaire

est ubiquitaire, avec toutefois des niveaux d'expression plus importants au niveau du muscle squelettique et du cerveau ¹⁰¹.

L'implication de cette protéine dans l'homéostasie énergétique a tout d'abord été suspectée du fait de la forte affinité de mTOR pour l'ATP ¹⁰². De plus, les animaux obèses et diabétiques présentent une augmentation de l'activité de la voie de signalisation de mTOR ¹⁰³ et cette protéine a également été montrée comme capable de phosphoryler certains résidus sérines du récepteur à l'insuline ¹⁰⁴. Enfin, la protéine mTOR peut être activée par les acides aminés, l'ATP, l'insuline et certains facteurs de croissance ¹⁰⁵. Ainsi, cette protéine est maintenant, au même titre que l'AMPK, considérée comme un véritable senseur métabolique. Toutefois, alors que la voie de l'AMPK est activée en réponse à une déplétion énergétique, la voie mTOR est activée suite à la détection d'un excès énergétique, permettant donc à ces 2 senseurs métaboliques d'être complémentaires. A cet effet, l'AMPK est d'ailleurs capable de réguler négativement l'activité de mTOR ¹⁰⁶.

Une fois activée, la protéine mTOR agit sur 2 cibles particulières qui sont la p70-S6K1 (*p70-S6 kinase 1*) et la 4E-BP1 (*Eukaryotic initiation factor 4E-binding protein*). Ces 2 protéines sont notamment impliquées dans la synthèse protéique. En effet, chez l'humain, environ 5% de l'apport énergétique est utilisé pour la fabrication de protéines et il n'est donc pas étonnant que cette synthèse soit modulée par l'état énergétique de l'organisme ¹⁰¹. Par ailleurs, en 2004, Yonezawa *et al* ¹⁰⁷ ont évoqué la possibilité que mTOR puisse agir sur d'autres acteurs comme la PKC (*Protein Kinase C*) et STAT3 (*Signal Transducers and Activators of Transcription 3*). Concernant les effets de mTOR sur l'homéostasie glucidique, cette protéine va permettre la prolifération des cellules β pancréatiques ainsi que l'augmentation de la sécrétion d'insuline par le pancréas, permettant donc une augmentation de la tolérance au glucose ¹⁰⁸. D'autres études ont rapporté que l'adipogénèse était augmentée au sein du tissu adipeux, dans lequel mTOR exerce également un effet inhibiteur sur la lipolyse et entraîne une insulino-résistance ¹⁰⁹. L'établissement d'une résistance à l'action de l'insuline est aussi retrouvé au niveau hépatique ¹¹⁰. Cette protéine est également présente au niveau hypothalamique, ce qui sera présenté dans la partie suivante de ce manuscrit.

c) Régulation nerveuse

Le système nerveux central, et plus particulièrement l'hypothalamus, est également une structure très impliquée dans le contrôle de l'homéostasie glucidique. En effet, l'hypothalamus reçoit en permanence des signaux métaboliques, endocriniens et nerveux en provenance de la périphérie qui l'informent sur l'état métabolique général de l'organisme. Après intégration de ces signaux, cette structure va alors pouvoir envoyer une réponse nerveuse adaptée par l'intermédiaire du système nerveux autonome et modulera ainsi l'activité des tissus cibles.

L'élaboration de cette réponse est le fruit de la modification de l'activité de neurones de l'hypothalamus, regroupés en noyaux et exprimant des peptides particuliers capables de modifier l'homéostasie énergétique.

II. L'hypothalamus, structure clef du contrôle central de l'homéostasie glucidique

1) Origine, localisation et organisation

L'hypothalamus est une structure particulièrement importante de l'encéphale, impliqué dans la régulation de nombreux paramètres physiologiques. Au cours du développement, le tube neural se divise en plusieurs parties qui vont aboutir à former les différentes structures cérébrales. L'hypothalamus provient ainsi du développement d'une de ces parties se nommant prosencéphale.

Une fois entièrement formé, il se situe sur la face ventrale de l'encéphale, plus précisément au dessus du tronc cérébral et à la base du diencephale, formant ainsi le plancher et les parois latérales du 3^e ventricule (**Figure 13**). Il est séparé du thalamus, situé juste au dessus, par le sillon de Monro, et est délimité à l'arrière par le mésencéphale et à l'avant par le chiasma optique.

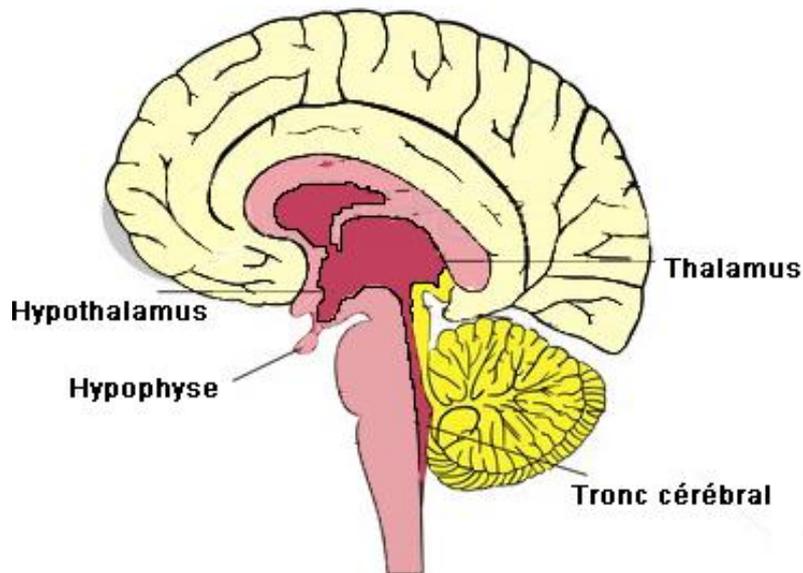


Figure 13 : Localisation de l'hypothalamus. *L'hypothalamus est situé au dessus du tronc cérébral. Il est séparé du thalamus, situé juste au dessus, par le sillon de Monro.*

En dessous se trouve l'hypophyse, glande endocrine connectée à l'hypothalamus via la tige pituitaire et ayant la particularité d'être composée d'une structure nerveuse, la neurohypophyse et d'une structure endocrine, l'adénohypophyse. Les communications entre l'hypothalamus et ces deux structures s'effectuent de deux façons ; les neurones de l'hypothalamus vont se projeter soit directement sur la neurohypophyse, soit au niveau de l'éminence médiane où les hormones hypothalamiques sécrétées seront transportées par le système porte hypophysaire jusqu'à l'adénohypophyse. Ces systèmes de connexions forment l'axe hypothalamo-hypophysaire et contrôlent un grand nombre de fonctions primaires telles que le comportement sexuel, la croissance et le stress.

Au niveau organisationnel, on distingue principalement 3 parties que sont l'hypothalamus antérieur (situé au dessus du chiasma optique), l'hypothalamus médian (au dessus de la tige pituitaire) et l'hypothalamus postérieur comportant l'aire hypothalamique latérale et les corps mamillaires. Chacune de ces parties comprend plusieurs groupements de neurones qui sont intrinsèquement interconnectés de façon bien précise et spécifique, et établissant également des projections neuronales vers d'autres groupements. Ces structures spécifiques sont appelées noyaux hypothalamiques (**Figure 14**).

2) Présentation des principaux noyaux hypothalamiques

D'une manière générale, l'hypothalamus va avoir des connexions avec différentes structures cérébrales, mais il présente également une forte communication intrinsèque entre les différents noyaux qui le composent. Certains de ces noyaux sont largement impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique et nous nous limiterons dans cette partie à la présentation de ceux-ci.

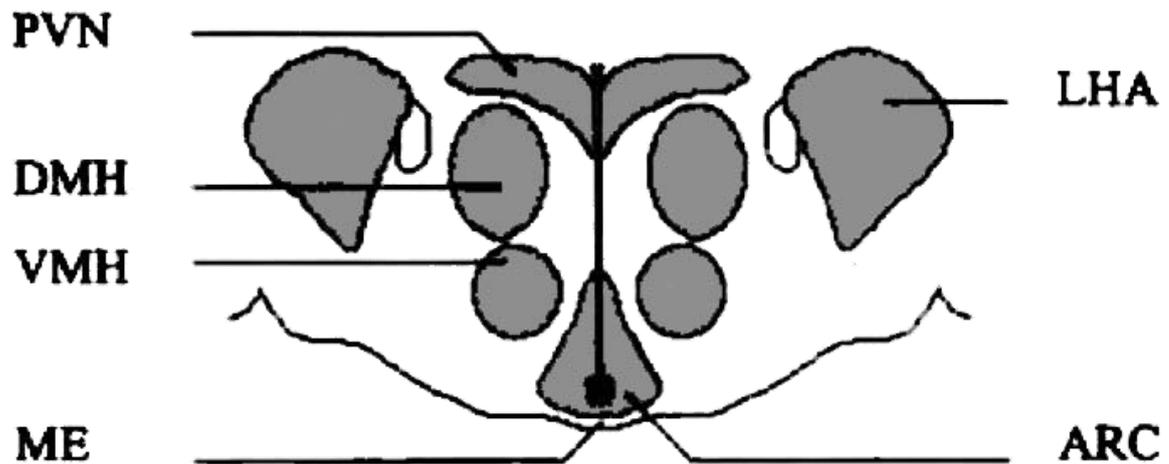


Figure 14 : Positions respectives des différents noyaux hypothalamiques (D'après Williams. 2001). Le noyau arcué (ARC) est situé à proximité de l'éminence médiane (ME). Il projette sur d'autres noyaux hypothalamiques comme les noyaux ventromédian (VMH) et dorsomédian (DMH), l'hypothalamus latéral (LHA) et le noyau paraventriculaire (PVN)

Le noyau arcué (ARC) est largement impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire et joue un rôle fondamental dans la signalisation des messages périphériques aux autres structures. Ce rôle prépondérant du noyau arcué dans la régulation de l'homéostasie énergétique est le fruit de sa localisation dans la partie ventrale de l'hypothalamus médian à proximité du 3^{ème} ventricule et de l'éminence médiane (EM), ce qui le place à l'interface entre le liquide céphalo-rachidien et la circulation sanguine. De plus, à ce niveau, l'endothélium vasculaire est fenestré, « altérant » donc physiologiquement la barrière hémato-encéphalique ¹¹¹. L'entrée des facteurs circulants métaboliques et hormonaux est ainsi facilitée au niveau de cette zone (**Figure 15**). Ainsi, le noyau arcué est capable de détecter et d'intégrer en premier les informations circulantes puis de les relayer vers les noyaux situés plus en aval ¹¹². Les neurones du noyau arcué sont donc dits de « premier ordre », étant les premiers exposés aux

signaux périphériques. Bien qu'il existe quelques projections locales se terminant sur les neurones voisins, le noyau arqué émet des projections dans d'autres noyaux hypothalamiques, contenant donc des neurones dits de « second ordre » afin de transmettre les informations. Au fur et à mesure des expériences de colocalisations et de traçages, ces projections et les circuits intra-hypothalamiques impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique deviennent de mieux en mieux connus. Ainsi, les terminaisons nerveuses du noyau arqué s'étendent majoritairement vers des régions hypothalamiques comme le noyau ventromédian (VMH), le noyau dorsomédian (DMH), le noyau paraventriculaire (PVN) et l'hypothalamus latéral (HLA) ¹¹³.

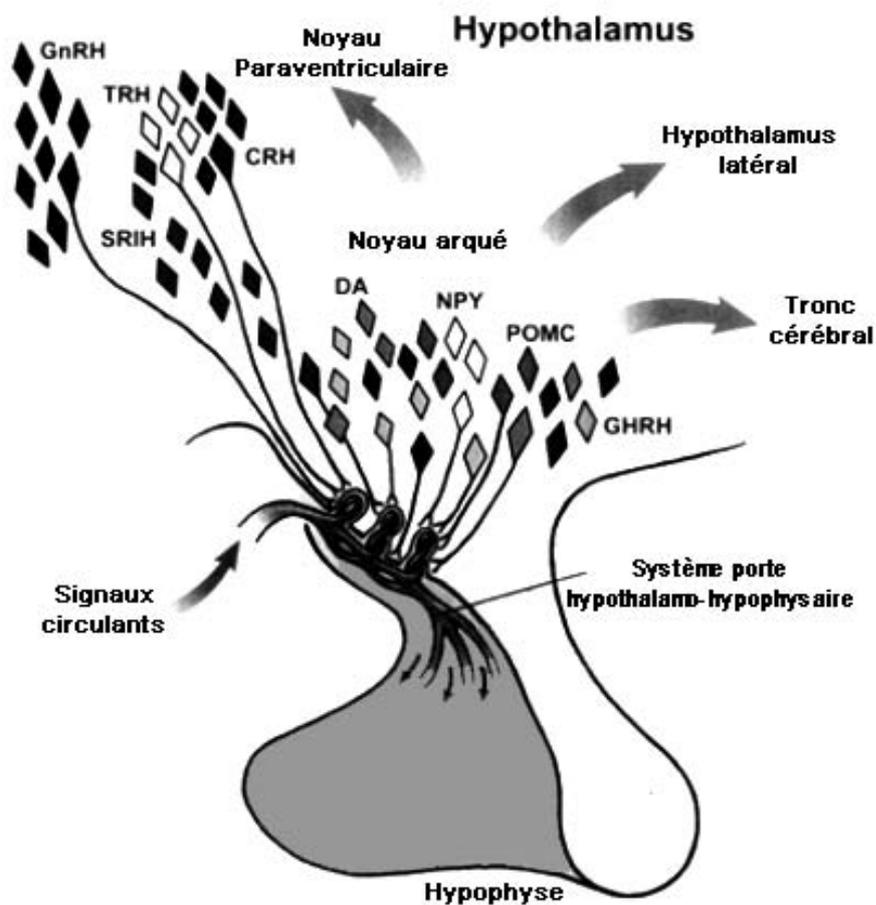


Figure 15 : Illustration du système porte hypothalamo-hypophysaire (D'après Cone. 2001). Au niveau du noyau arqué, l'épithélium fenestré rend la barrière hémato-encéphalique plus perméable aux signaux circulants. Ainsi, le noyau arqué est le premier à intégrer les informations de la périphérie et communique ensuite avec les autres noyaux hypothalamiques via des projections neuronales.

Grâce à des travaux d'immunohistochimie et d'électrophysiologie, Cowley *et al*¹¹⁴ ont pu établir un modèle d'intégration des signaux en provenance du noyau arqué dans **le noyau paraventriculaire**. Ce noyau paraventriculaire appartient également à l'hypothalamus médian et borde le 3^{ème} ventricule. Il contient, d'une part, des neurones dits parvocellulaires et, d'autre part, des neurones dits magnocellulaires. Les neurones parvocellulaires sont de petits neurones relativement dispersés responsables notamment de la synthèse de CRH (*Corticotropin-releasing hormone*), d'ocytocine et de vasopressine. Ils sont en relation avec la neuro-hypophyse, déterminant ainsi un axe hypothalamo-neurohypophysaire. Les neurones du noyau arqué se projettent sur des neurones GABA-ergiques du PVN qui contrôleraient ensuite l'activité de neurones ocytocine, CRH ou TRH (*Thyrotropin-releasing hormone*).

Les neurones du noyau arqué projettent également vers deux autres noyaux hypothalamiques qui ont été un temps considéré respectivement comme le centre de la faim et le centre de la satiété puisque leur lésion entraînait chez les animaux des modifications du comportement alimentaire^{115,116}. Il s'agit de **l'hypothalamus latéral** et du **noyau ventromédian**. Ces 2 noyaux établissent également des connexions réciproques avec le noyau arqué et peuvent également modifier l'activité des neurones du noyau arqué^{117,118}. Des projections nerveuses du noyau ventromédian aboutissent aussi dans le **noyau dorsomédian**. De plus, ce dernier reçoit des terminaisons nerveuses trouvant leur origine dans le noyau arqué et envoie des efférences en direction du noyau paraventriculaire. Par ailleurs, ces noyaux sont aussi reliés au **noyau du tractus solitaire**¹¹⁹ (**Figure 16**).

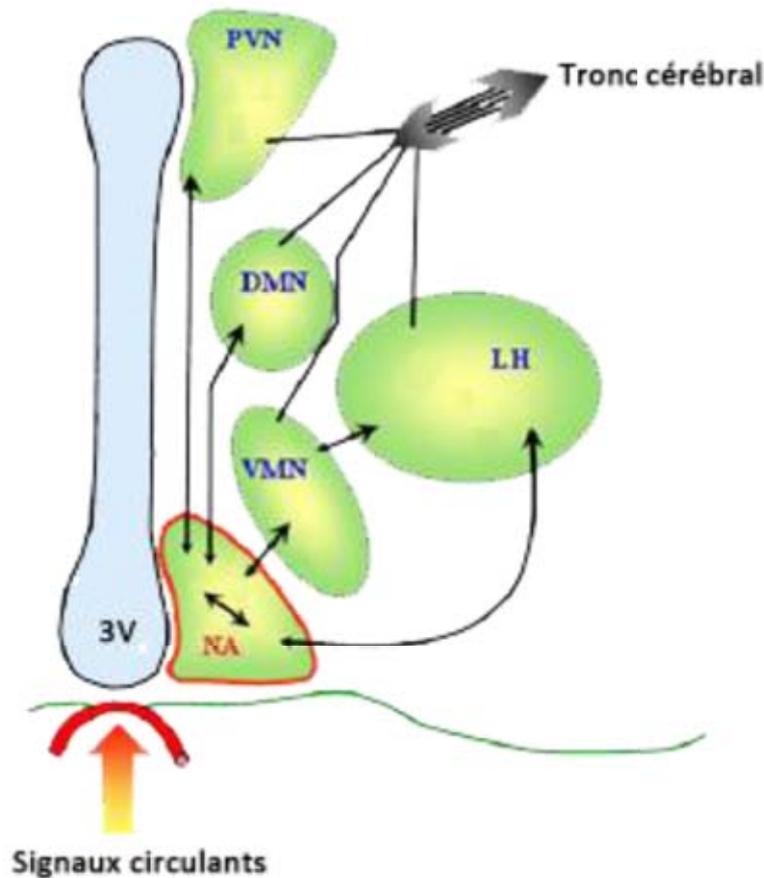


Figure 16 : Principales connexions entre les noyaux hypothalamiques. *Le noyau arqué (NA) émet des projections sur l'ensemble des autres noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique. D'autres connexions sont également établies par ces noyaux, notamment le noyau ventromédian (VMN) qui projette sur l'hypothalamus latéral (LH). Enfin, l'ensemble des noyaux est également relié au tronc cérébral.*

Le noyau du tractus solitaire est une structure appartenant au tronc cérébral qui se situe juste au dessus du noyau dorsal moteur du vague (DMV) et reçoit les afférences nerveuses en provenance de la périphérie. De plus, de la même façon que le noyau arqué, le noyau du tractus solitaire est proche de l'*area postrema*, une zone dont la barrière hémato-encéphalique est physiologiquement « altérée ». Ainsi, ce noyau est capable d'intégrer des informations d'origine nerveuse et hormonale et de transmettre celles-ci à l'hypothalamus *via* ses connexions avec les différents noyaux. L'hypothalamus est donc capable d'intégrer les différents signaux hormonaux et de relayer par différentes voies de transduction les informations nerveuses qui aboutiront à un rétrocontrôle en direction de la périphérie.

3) Acteurs centraux impliqués dans le contrôle de l'homéostasie glucidique

La régulation de l'homéostasie énergétique au niveau hypothalamique implique un grand nombre d'acteurs biologiques à savoir 1) A l'échelle cellulaire, des neurones exprimant des neuropeptides dits orexigènes et anorexigènes, et 2) A l'échelle moléculaire, des enzymes (senseurs métaboliques AMPK et mTOR), métabolites (glucose) et neurotransmetteurs (monoxyde d'azote).

a) Neuropeptides orexigènes

- *Neuropeptide Y (NPY)*

Le NPY est un neurotransmetteur de 36 acides aminés appartenant à la famille des polypeptides pancréatiques ¹²⁰. Les neurones exprimant le NPY sont distribués dans différentes régions du système nerveux central. En dehors du noyau arqué, où ils sont le plus représentés, ces neurones sont également retrouvés dans le cortex, l'hippocampe et le tronc cérébral mais également en faible quantité dans le noyau dorsomédian et le noyau ventromédian ¹²¹. Les neurones à NPY du noyau arqué projettent principalement vers le noyau paraventriculaire mais aussi vers les noyaux ventromédian et dorsomédian ¹²². Signe de l'importance physiologique de ce peptide, sa séquence, ainsi que celle de ses récepteurs, est remarquablement conservée entre les différentes espèces ^{123,124}. Il existe 8 récepteurs au NPY qui sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires nommés Y1 à Y8. Ceux-ci sont tous présents au niveau de l'hypothalamus, particulièrement au niveau du noyau arqué, du noyau paraventriculaire et du noyau dorsomédian. Toutefois, les récepteurs Y1, Y2 et Y5 présentent une affinité plus forte pour le NPY et semblent être les récepteurs impliqués dans l'établissement des effets orexigènes de ce neuropeptide ¹²².

Le NPY est très certainement le peptide orexigène le mieux décrit à l'heure actuelle. Plusieurs études ont montré que l'injection aigüe de NPY dans l'hypothalamus entraînait une augmentation de la prise alimentaire ¹²⁵ et une diminution de la dépense énergétique ¹²⁶. De plus, lorsqu'il est injecté spécifiquement dans le noyau paraventriculaire, le NPY bloque l'activité du

système nerveux sympathique et empêche la libération d'insuline et de glucagon ¹²⁷. De la même façon, l'injection chronique de NPY au niveau hypothalamique induit une hyperphagie et favorise la lipogenèse au sein du foie et du tissu adipeux, ce qui a pour conséquence une augmentation de l'insulinémie à jeun et le développement d'une obésité. Enfin, dans ces mêmes conditions, le NPY stimule le transport de glucose au sein du tissu adipeux blanc ¹²⁸. L'ensemble de ces travaux a donc permis de conclure que le NPY servait de signal anabolique, certainement non exclusif, au niveau central et permettait de mettre en place plusieurs régulations en réponse à une diminution des réserves énergétiques.

En effet les concentrations hypothalamiques en NPY reflètent le statut énergétique de l'organisme. L'expression et la libération de NPY augmentent dans des conditions de jeûne, et diminuent avec la prise alimentaire ¹²⁹. De plus, les taux de NPY sont diminués par la leptine et l'insuline, et augmentés par les glucocorticoïdes ¹³⁰. Les souris obèses *ob/ob*, dépourvues de leptine montrent d'ailleurs une augmentation de l'activité des neurones à NPY ¹³¹ et la délétion du gène codant pour le NPY chez ces souris induit une diminution de l'hyperphagie et de l'obésité des animaux ¹³². Toutefois, dans des modèles animaux d'obésité induite par un régime hyperlipidique, on note une résistance centrale à l'action de la leptine et de l'insuline. De fait, les taux hypothalamiques de NPY sont donc plus élevés et peuvent donc contribuer à un apport accru d'énergie et ainsi participer à la mise en place de pathologies métaboliques.

- *Agouti related protein (AgRP)*

Lorsque l'on parle de neuropeptides orexigènes, on évoque généralement le couple NPY/AgRP. En effet, 90% des neurones à NPY du noyau arqué synthétisent et libèrent également de l'AgRP ¹³³. L'AgRP a été découvert par Shutter *et al* ¹³⁴ qui avaient identifié une séquence de protéine dont l'expression hypothalamique était normale chez les souris saines, mais augmentée chez les souris obèses. Il s'agit d'une protéine de 132 acides aminés, structurellement très proche d'une protéine s'exprimant dans la peau : la protéine Agouti. L'AgRP est donc majoritairement exprimée dans l'hypothalamus bien qu'une petite production ait été mise en évidence dans le noyau subthalamique. Cette

expression de l'AgRP est modulée par de multiples signaux hormonaux, et notamment par la leptine et l'insuline qui exercent un effet négatif¹³⁵.

Au même titre que le NPY, l'administration icv d'AgRP stimule la prise alimentaire¹³⁶, à tel point qu'une seule injection icv est capable d'induire une hyperphagie encore visible après 7 jours¹³⁷. De plus, les souris surexprimant ce neuropeptide deviennent également hyperphagiques et développent une obésité massive associée à une hyperinsulinémie et une hyperplasie des îlots pancréatiques¹³⁸. Par ailleurs, l'AgRP est également capable d'induire une diminution de la dépense énergétique, ceci via une diminution de la thermogénèse¹³⁹ et en freinant l'influx nerveux sympathique¹⁴⁰. Enfin, l'utilisation d'ARNs interférents permet logiquement d'augmenter la dépense énergétique et de diminuer le poids corporel¹⁴¹.

Ainsi, les effets de l'AgRP sont extrêmement proches de ceux du NPY. Toutefois, l'AgRP n'exerce pas son action orexigène en stimulant un récepteur qui lui est propre comme le fait le NPY. En effet, l'AgRP va plutôt exercer un effet antagoniste sur le système anorexigène qui sera détaillé dans la partie suivante. L'AgRP est en effet un antagoniste des récepteurs de l' α -MSH (*alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone*)¹⁴² qui est un neuropeptide anorexigène. Les mécanismes d'action impliqués dans cet effet antagoniste de l'AgRP ne sont pas encore totalement élucidés.

b) Neuropeptides anorexigènes

- *Pro-opiomélanocortine (POMC)*

La POMC est un précurseur polypeptidique de 241 acides aminés exprimé notamment au niveau des cellules corticotropes de l'hypophyse et également par certains neurones du noyau arqué et, de façon moins importante, au niveau de l'hippocampe et du noyau du tractus solitaire¹⁴³. Le clivage de ce précurseur se fait de façon tissu-dépendante par des proconvertases¹⁴⁴ et donne naissance à plusieurs types de peptides qui sont les mélanocortines (α -MSH, γ -MSH, β -MSH, ACTH) et les β -endorphines¹⁴⁵ (**Figure 17**).

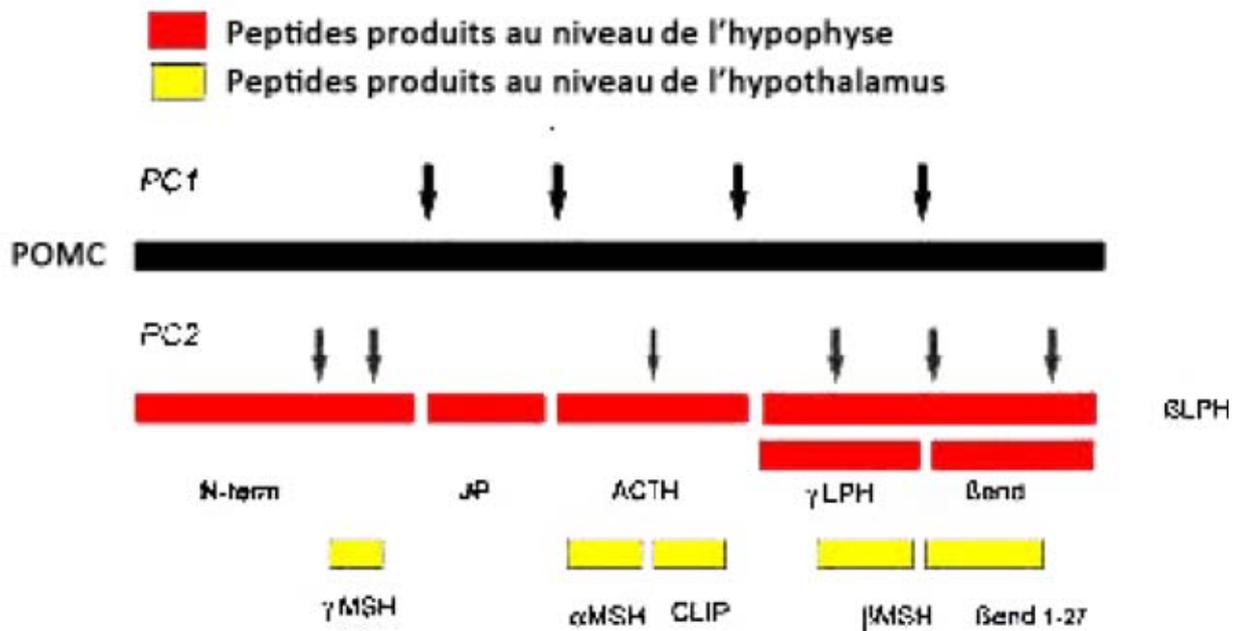


Figure 17 : Maturation de la POMC (D'après Raffin Sanson, 2003). La proopiomélanocortine peut subir différents clivages selon la région où ce précurseur est mûri. Ces clivages vont générer plusieurs peptides appartenant à la famille des mélanocortines et des endorphines.

Au sein des neurones du noyau arqué, le principal peptide produit après clivage de la POMC est l' α -MSH, appartenant à la famille des mélanocortines. L'injection centrale d' α -MSH a pour effet de diminuer la prise alimentaire et le poids corporel. Par ailleurs, elle stimule l'activité du système nerveux sympathique et augmente la dépense énergétique ¹¹⁹. De plus, chez la souris délétée pour le gène codant pour la POMC, on observe le développement d'une obésité sévère accompagnée d'insuffisance surrénalienne et d'anomalie de pigmentation ¹⁴⁶. Ces données indiquent donc un rôle de la POMC et des neurones hypothalamiques qui l'expriment dans la régulation de l'homéostasie énergétique.

Le mode d'action de l' α -MSH dans cette régulation du métabolisme énergétique est devenu plus clair avec l'identification des récepteurs des mélanocortines. Ceux-ci sont au nombre de 5, allant du récepteur MC1-R au récepteur MC5-R. Ces récepteurs à 7 domaines transmembranaires sont exprimés dans des régions distinctes. Chaque récepteur est impliqué dans divers processus physiologiques. En effet, le récepteur MC1-R est exprimé dans la peau et relaye l'action pigmentogène de l' α -MSH sur la peau et les poils ¹⁴⁷. Le récepteur MC2-R fixe uniquement l'ACTH et régule la synthèse et la sécrétion des glucocorticoïdes surrénaliens ¹⁴⁸. Le récepteur MC5-R est quant à lui exprimé

au niveau de plusieurs glandes exocrines et régule la production de plusieurs substances comme les phéromones ¹⁴⁹. Les récepteurs MC3-R et MC4-R sont exprimés au niveau du système nerveux central et sont impliqués dans la mise en place des effets métaboliques de l' α -MSH ¹¹⁴. En effet, des souris invalidées pour le récepteur MC3-R développent une obésité mais ne présentent pas d'hyperphagie ¹⁵⁰ et des souris invalidées pour le récepteur MC4-R sont hyperphagiques et développent une obésité sévère ¹⁵¹. Les effets anorexigènes de l' α -MSH sont donc le fruit de sa fixation sur les récepteurs MC3-R et MC4-R. Les neurones du noyau arqué exprimant la POMC, précurseur de l' α -MSH, se projettent d'ailleurs vers le noyau paraventriculaire et l'hypothalamus latéral dans lesquels on retrouve ces récepteurs fortement exprimés ¹⁵².

De façon originale, la mise en place des effets anorexigènes implique d'une part l' α -MSH et, d'autre part, l'AgRP, peptide orexigène que nous avons précédemment décrit. La fixation de l' α -MSH sur son récepteur entraîne l'activation de la voie des MAP Kinases ¹⁵³ ce qui permettra l'établissement des effets anorexigènes et d'augmentation de la dépense énergétique. En revanche, l'AgRP est un antagoniste du récepteur MC4-R ¹⁴², qui va donc empêcher l'activation de la voie MAP kinases et, comme nous l'avons évoqué précédemment, exercer son effet orexigène via ce blocage de la mise en place des effets anorexigènes de l' α -MSH. Les neurones à POMC et à AgRP expriment des récepteurs de la leptine, qui régule de façon inverse l'expression de ces 2 neuropeptides. En effet, la leptine augmente l'expression de la POMC et diminue celle de l'AgRP. Ainsi, lorsque la balance énergétique est positive, les taux d'AgRP seront faibles et l'action antagoniste sur le récepteur MC4-R ne sera pas suffisante pour empêcher la mise en place des effets anorexigènes de la POMC.

Concernant les effets métaboliques périphériques indépendants de la prise alimentaire, Obici *et al* ¹⁵⁴ ont montré en 2001 qu'une injection chronique d' α -MSH au niveau du 3^{ème} ventricule de rat entraînait chez ces animaux une diminution du poids des dépôts adipeux. La sensibilité à l'insuline était également augmentée, favorisant ainsi la suppression de la production hépatique de glucose. L'injection icv aiguë de ce peptide augmente la tolérance au glucose tout en diminuant les taux d'insuline plasmatique, confirmant ainsi

l'amélioration de la sensibilité à l'insuline ¹⁵⁵. Par ailleurs, ce même traitement augmente également la dépense énergétique ¹⁵⁶.

- *Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript (CART)*

De la même façon que la majorité des neurones à NPY co-expriment également l'AgRP, le CART est retrouvé dans la majorité des neurones à POMC ¹⁵⁷. Ce peptide, très conservé au travers des espèces ¹⁵⁸, a été identifié pour la première fois en 1995 par Douglass *et al* ¹⁵⁹ mais ce n'est qu'en 1998, avec les travaux de Kristensen *et al* ¹⁵⁷, que ses propriétés anorexigènes ont été découvertes. Le gène codant pour le CART génère en réalité un précurseur de 89 acides aminés qui pourra subir différents clivages qui vont générer des formes de CART matures de différentes tailles. Ainsi, on retrouve au sein de l'hypothalamus une forme de 47 acides aminés et une autre de 40 acides aminés ¹⁶⁰. En terme de régulation, l'expression de CART est modulée positivement par la leptine ¹⁵⁷ et le NPY ¹⁶¹.

Comme nous l'avons vu, ce peptide est exprimé dans le noyau arqué, au niveau des neurones à POMC. On le retrouve également dans le noyau dorsomédian et l'hypothalamus latéral où il colocalise avec la MCH, un autre neuropeptide orexigène. Le CART est également retrouvé au niveau du noyau ventromédian, du noyau paraventriculaire et du noyau du tractus solitaire ¹⁶². Toutefois, malgré cette distribution maintenant largement connue, aucune étude n'a encore pu établir quel était le récepteur du CART. De nombreux effets de ce peptide ont pourtant été rapportés. Ainsi, l'injection icv aiguë de CART entraîne une diminution de la prise alimentaire ¹⁶³ et l'injection chronique induit une diminution de la prise alimentaire, une diminution du poids corporel, une diminution des taux circulants d'insuline et de leptine et tend également à une augmentation de l'oxydation des substrats énergétiques ¹⁶⁴. A l'inverse, des souris invalidées pour le gène du CART deviennent hyperphagiques et développent une augmentation du poids corporel et de la masse adipeuse par rapport aux souris sauvages ¹⁶⁵.

L'étude de la mise en place de l'ensemble de ces effets a tout de même permis, malgré l'absence d'identification d'un récepteur particulier, de proposer une voie de signalisation. Ainsi, il a été montré que les effets du CART étaient sensibles

à la toxine pertussique, suggérant donc l'implication d'une protéine $G_{i/o}$ ¹⁶⁶. De plus, l'injection centrale de CART entraîne la phosphorylation du facteur de transcription CREB ¹⁶⁷ ainsi que l'activation de la kinase ERK ¹⁶⁸. L'ensemble de ces informations, citées ici de manière non exhaustive, ont amené Rogge *et al* ¹⁶⁹ à proposer la voie de signalisation suivante pour le CART (**Figure 18**).

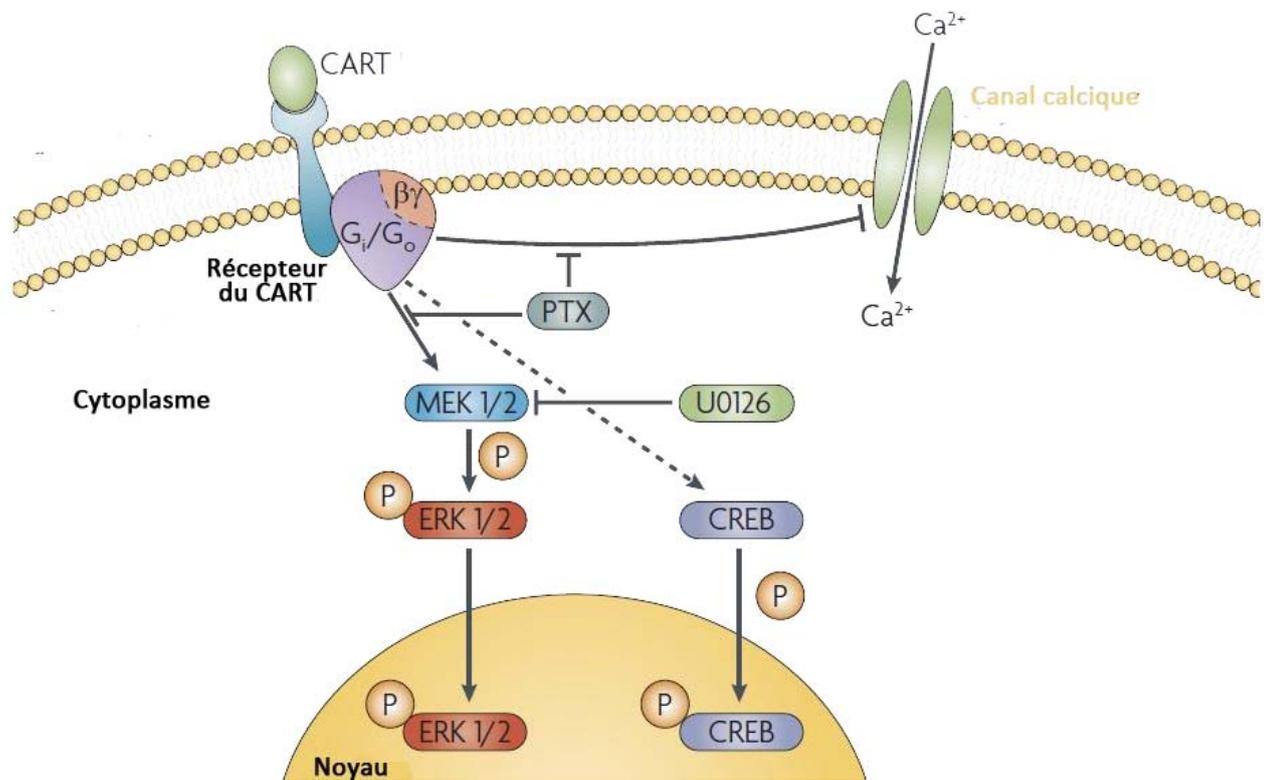


Figure 18 : Voie de signalisation proposée du neuropeptide anorexigène CART (D'après Rogge, 2008). La fixation du CART à son récepteur, encore inconnu, entraîne l'activation d'une protéine $G_{i/o}$ qui va pouvoir activer la voie MAP kinases et également le facteur de transcription CREB.

c) Acteurs enzymatiques

- **L'AMPK**

L'AMPK, senseur métabolique incontournable, est également exprimé dans l'hypothalamus ¹⁷⁰ et il est maintenant largement admis que l'AMPK centrale participe à la régulation de l'homéostasie énergétique ¹⁷¹. Dans ce sens, la leptine est d'ailleurs capable de diminuer l'activité de cette enzyme ¹⁷².

L'AMPK hypothalamique est capable de participer à la régulation de la prise alimentaire. En effet, son activité est augmentée en condition de déficit

énergétique (jeûne, hypoglycémie) et diminue après une prise alimentaire. Par ailleurs, l'activation directe de l'enzyme au niveau hypothalamique suffit à augmenter la prise alimentaire, le poids corporel tandis que son inhibition entraîne une hypophagie associée à une diminution du poids corporel ¹⁷³. En accord avec ses effets sur la prise alimentaire, la modulation de l'activité de l'AMPK hypothalamique s'accompagne de modulations de l'expression des neuropeptides orexigènes. Ainsi, l'inactivation de l'AMPK hypothalamique entraîne une diminution de l'expression du couple NPY/AgRP au sein du noyau arqué tandis que son activation entraîne une stimulation de l'expression de ces neuropeptides ¹⁷³.

Concernant les autres paramètres importants du métabolisme glucidique, il a été suggéré que l'AMPK hypothalamique soit capable de réguler ces paramètres *via* un mécanisme impliquant le système nerveux autonome ^{84,174}. En effet, l'activation de l'AMPK hypothalamique est capable d'augmenter la sensibilité à l'insuline de l'ensemble de l'organisme, et plus particulièrement de stimuler la synthèse de glycogène musculaire ¹⁷⁵. D'autres études ont également montré une augmentation de la production hépatique de glucose ¹⁷⁶ et de la sécrétion de glucagon par le pancréas ¹⁷⁷. A l'inverse, son inhibition augmente la dépense énergétique de l'organisme, notamment par la stimulation de la thermogénèse ¹⁷⁸. Ainsi, l'activation de l'AMPK hypothalamique permet d'activer les voies productrices d'énergie au détriment des voies consommatrices.

Au niveau intracellulaire, le mécanisme impliqué dans ces effets de l'AMPK hypothalamique est plutôt original. En effet, dans des conditions d'excès énergétique, la diminution de l'activité de l'AMPK hypothalamique (induite par la leptine) va entraîner (par levée d'inhibition) une augmentation de la phosphorylation de l'ACC (*Acetyl-CoA carboxylase*), une enzyme de la lipogénèse, ce qui va donc permettre d'augmenter les taux de malonyl-CoA. Cette augmentation va contribuer à inhiber le transporteur CPT1 (*Carnitine palmitoyltransferase-1*) ¹⁷⁹. Or, Obici *et al* ¹⁸⁰ ont montré en 2003 que l'inhibition de ce transporteur CPT1 au niveau hypothalamique entraînait notamment une diminution de la prise alimentaire. Confirmant cette idée de l'implication du malonyl-CoA dans la signalisation hypothalamique de l'AMPK, He *et al* ¹⁸¹ ont

montré en 2006 que le fait de surexprimer au niveau hypothalamique l'enzyme malonyl-CoA decarboxylase (permettant la dégradation du malonyl-CoA) entraînait une augmentation de la prise alimentaire et du poids corporel menant à l'obésité (**Figure 19**).

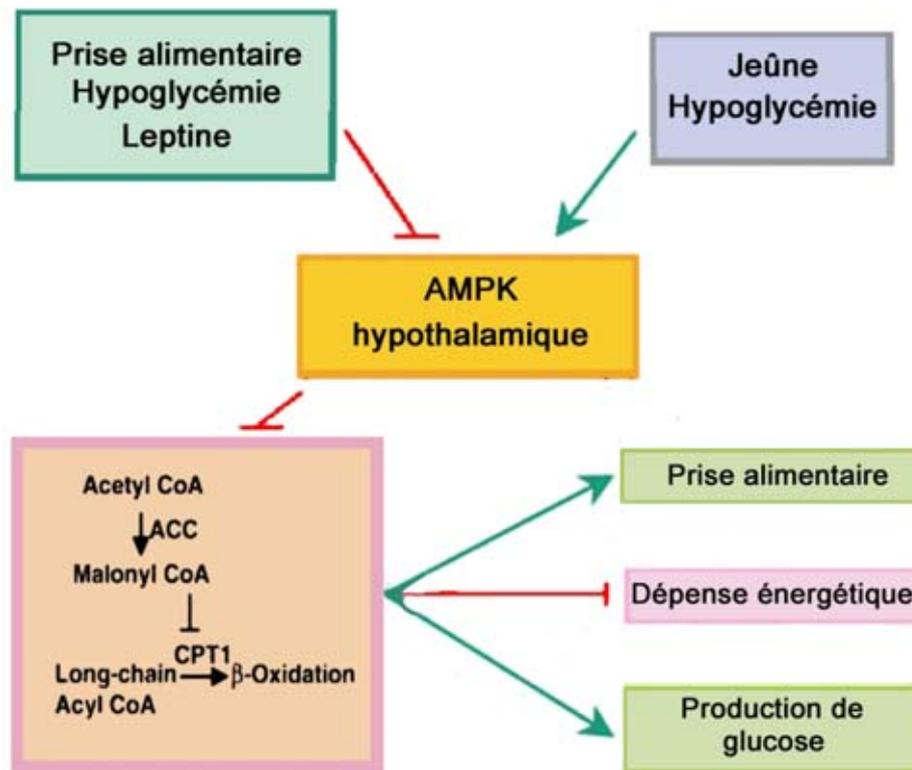


Figure 19 : Effets de l'AMPK hypothalamique (D'après Xue, 2006). L'AMPK hypothalamique est capable de moduler la prise alimentaire, la production hépatique de glucose ainsi que la dépense énergétique.

Par ailleurs, en condition d'obésité, l'activité de l'AMPK hypothalamique est considérablement altérée. En effet, l'activité basale de cette enzyme est réduite chez des animaux soumis à un régime obésitogène et diabétogène ¹⁸².

- *mTOR*

La protéine mTOR, autre senseur métabolique incontournable, est également présente au niveau de l'hypothalamus où elle colocalise fortement avec les neurones à NPY/AgRP et de façon moins importante avec les neurones à POMC/CART du noyau arqué. Comme en périphérie, l'activation de mTOR se produit, à l'inverse de l'AMPK, dans des conditions d'excès énergétique, et cette protéine est inhibée lors d'un déficit énergétique. Dans ce sens,

l'activation de mTOR au niveau de l'hypothalamus a pour effet de diminuer la prise alimentaire et le poids corporel, tandis que l'inhibition de cette protéine supprime ces effets ¹⁸³. Les travaux de Blouet *et al* ¹⁸⁴ en 2008 renforcent également l'implication de la voie mTOR dans la régulation de la prise alimentaire puisque le fait de rendre constitutivement active la protéine S6K (activée en temps normal par mTOR) dans l'hypothalamus de rats permet de supprimer la prise alimentaire des animaux. A l'inverse, le fait de surexprimer dans le même modèle un dominant négatif de cette kinase entraîne une augmentation de la prise alimentaire. Toutefois, en raison du croisement de plusieurs acteurs moléculaires impliqués dans d'autres signalisation, le mécanisme précis par lequel mTOR est capable de moduler la prise alimentaire n'est pas encore connu ¹⁸⁵. Concernant les effets métaboliques autres que la prise alimentaire, l'activation de la voie de signalisation de mTOR au niveau hypothalamique entraîne une diminution de la dépense énergétique et contribue à l'établissement d'une résistance centrale et hépatique à l'action de l'insuline ^{184,186}.

Dans des conditions d'obésité, les effets centraux de la protéine mTOR sont altérés, ce qui peut donc contribuer à l'hyperphagie observée dans ces conditions. En effet, la phosphorylation de la protéine p70-S6K est significativement diminuée dans l'hypothalamus de rats obèses en comparaison à des rats sains, montrant donc une diminution de l'activation de mTOR ¹⁸⁷. Etant donné que mTOR est activée dans des conditions d'excès énergétique, et notamment par la leptine ¹⁸³, cela suggère donc que l'établissement de la résistance à la leptine que l'on observe en condition d'obésité soit responsable de l'altération de la régulation de la prise alimentaire par la protéine mTOR.

- *Les NOS*

Le NO (monoxyde d'azote) est un gaz radicalaire synthétisé par des enzymes appelées NOS (*Nitric oxide Synthase*) qui catalysent la transformation de L-Arginine en L-Citruline et NO ¹⁸⁸.

Il existe 3 types de NOS qui sont la nNOS (*neuronal Nitric Oxide Synthase*), la iNOS (*inductible Nitric Oxide Synthase*) et la eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*). La nNOS fut la première découverte et a été purifiée à partir de

cerveaux de rats et de porc ¹⁸⁹. Cette enzyme est également présente en périphérie, notamment au niveau du muscle squelettique ¹⁹⁰. De la même façon, la eNOS est présente à la fois en périphérie et au niveau central. Ces 2 enzymes sont toutes deux constitutivement exprimées ¹⁹¹. Toutefois, leur activation nécessite leur phosphorylation ^{192,193}. A l'inverse, la iNOS, que l'on ne retrouve qu'au sein de cellules immunitaires, n'est pas constitutivement exprimée et son expression est induite par différents facteurs comme les cytokines pro-inflammatoires ¹⁹¹.

Le NO produit par ces enzymes, malgré une demi-vie très courte de l'ordre de 7 secondes, est capable de traverser les membranes biologiques et de diffuser dans un rayon de 300µm autour de son site de production ¹⁹⁴. Cette propriété diffusible lui permet notamment de rentrer en contact avec la guanylate cyclase soluble qui constitue l'un de ses récepteurs majeurs ¹⁹⁵. Cette enzyme, activée par la fixation du NO, catalyse la transformation du GTP en GMPc. De part cette activité catalytique, la guanylate cyclase, et donc le NO, sont impliqués dans de nombreuses voies de transduction notamment dans la relaxation des cellules musculaires lisses ¹⁹⁶.

De part la présence de NOS au niveau central, le NO peut donc être produit au niveau de l'hypothalamus. Sa production hypothalamique provoque d'ailleurs une élévation du flux sanguin périphérique et une augmentation de l'utilisation du glucose chez la souris ¹⁹⁷. A l'inverse, l'inhibition de la production hypothalamique de NO *via* l'utilisation d'inhibiteurs des NO synthases génère une hyperglycémie périphérique associée à un défaut de sécrétion d'insuline et une insulino-résistance ¹⁹⁸. Ces altérations sont caractéristiques du diabète de type II et on retrouve d'ailleurs une production hypothalamique de NO altérée chez les animaux obèses et diabétiques du fait de la moindre activation de la eNOS et de la nNOS ^{197,199}. Ainsi, le NO hypothalamique est impliqué dans le contrôle central de l'homéostasie glucidique.

d) Neurones glucosensibles.

La théorie gluco-statique de Mayer développée en 1950, postulait l'existence de récepteurs sensibles au glucose, notamment au sein de l'hypothalamus, ce qui permettait au cerveau de détecter les changements de la glycémie ²⁰⁰.

Confirmant cette théorie, Oomura *et al*²⁰¹ ont d'ailleurs mis en évidence en 1964 que certains neurones du noyau ventromédian et de l'hypothalamus latéral modulaient leur activité en réponse au glucose. Par ailleurs, en 1986, Campfield et Smith ont observé qu'une diminution de la glycémie au niveau central entraînait l'initiation d'une prise alimentaire chez le rat²⁰². Ces résultats suggèrent donc que le cerveau est bien capable de détecter des variations de la glycémie et de mettre en place des réponses adaptées. Ainsi, une augmentation de la concentration en glucose, reflet d'une balance énergétique positive, entraînera la mise en place de processus visant à freiner les apports et à favoriser les dépenses. A l'opposé, une diminution de cette concentration déclenchera des mécanismes inverses, c'est-à-dire favoriser les apports et freiner les dépenses.

Une étude menée par Song *et al*²⁰³ a mis en évidence l'existence de 2 catégories de neurones sensibles au glucose. Ceux-ci sont donc définis par leur capacité à modifier leur activité en réponse à un changement physiologique de la concentration en glucose. On distingue ainsi les neurones qui vont être excités par une augmentation des taux de glucose (dits neurones GE, pour neurones gluco-excités), et ceux qui seront inhibés dans les mêmes conditions (dits neurones GI, pour neurones gluco-inhibés). Quelques années plus tard, Fioramonti *et al*²⁰⁴ ont également montré au sein du noyau arqué l'existence de neurones sensibles à de très fortes variations de glucose (passage de 5 à 20mM). Ces neurones sont qualifiés de hautement gluco-excités (neurones hGE) ou de hautement gluco-inhibés (neurones hGI). Toutefois, le rôle physiologique précis ainsi que les mécanismes de fonctionnement de ces neurones sensibles à de très fortes variations de la concentration en glucose sont encore très mal connus. C'est pourquoi nous ne présenterons dans la suite de ce chapitre que les neurones GE et GI.

- *Neurones gluco-excités*

Les neurones gluco-excités ont été identifiés au niveau latéral du noyau arqué ainsi qu'au niveau du noyau ventromédian^{201,205}. Ces neurones possèdent le même équipement moléculaire que la cellule β pancréatique et la mise en place de la dépolarisation membranaire en réponse au glucose s'y déroule donc de la

même façon. Ainsi, on retrouve dans ces neurones des canaux potassiques ATP-dépendants, l'expression de la glucokinase et également le transporteur de glucose GLUT2 ce qui les rend sensibles au glucose^{206,207}. Une étude menée par Kang *et al*²⁰⁸ dans laquelle l'utilisation d'ARNs interférents permet de diminuer de 90% l'expression de la glucokinase dans des neurones fraîchement isolés montre une disparition de la quasi-totalité des neurones sensibles au glucose. Ce résultat montre donc un rôle essentiel de la glucokinase dans la capacité de ces neurones à adapter leur activité en fonction des taux de glucose.

La nature des neuropeptides exprimés par les neurones gluco-excités est encore relativement inconnue et controversée. En effet, peu d'études se sont intéressées à ce sujet mais il a toutefois été suggéré que les neurones à POMC voient leur activité modulée par les taux de glucose²⁰⁹. Toutefois, à l'encontre de cette théorie, les neurones gluco-excités ne sont pas situés dans la même région du noyau arqué que celle considérée comme la région de localisation des neurones à POMC. Une étude de patch-clamp menée par Fioramonti *et al*²¹⁰ a également montré que moins de 5% des neurones à POMC du noyau arqué répondaient à des changements extracellulaires de la concentration en glucose. De plus, dans la même étude, l'injection intra-carotidienne de glucose n'entraîne pas l'expression du marqueur d'activation neuronale *c-Fos* dans les neurones à POMC. Cette controverse réside certainement dans le fait que ces neurones gluco-excités soient également régulés par plusieurs autres facteurs. En effet, l'insuline est capable de diminuer l'activité des neurones gluco-excités²¹¹ *via* son action sur les canaux K_{ATP} -dépendants²¹². En agissant de la même façon, la leptine est également capable de moduler l'activité de ces neurones. Toutefois, cette réponse est très hétérogène puisque certains de ces neurones ne modifient pas leur activité, et d'autres peuvent être inhibés²¹³ tandis que d'autres seront excités²⁰⁵. Cela suggère donc que les récepteurs à la leptine ne soient pas toujours présents sur les neurones gluco-excités, ce qui est en accord avec la distribution de ces récepteurs au travers de l'hypothalamus. En effet, ces récepteurs sont fortement présents au niveau du noyau arqué mais sont beaucoup plus rares au niveau du noyau ventromédian²¹⁴.

Les effets de l'activation de ces neurones glucoexcités sur l'homéostasie glucidique ne sont pas encore tous clairement établis. Toutefois, Kong *et al*²¹⁵ ont impliqué ces derniers dans l'amélioration de la tolérance au glucose. En effet, cette équipe a rapporté que la perte de tels neurones chez la souris entraîne une diminution de la tolérance au glucose. De plus, dans des conditions d'obésité, la détection des variations de glucose par ces neurones est altérée, ce qui pourrait donc contribuer à la diminution de la tolérance au glucose observée chez les obèses²¹⁶.

- *Neurones gluco-inhibés*

Les neurones gluco-inhibés sont des cellules dont l'activité est corrélée négativement avec la concentration en glucose. Ceux-ci sont retrouvés dans les mêmes noyaux hypothalamiques que les neurones gluco-excités, à savoir le noyau arqué et le noyau ventromédian. Ils présentent également d'autres similarités avec leurs homologues gluco-excités puisqu'ils expriment aussi la glucokinase²¹⁷ ainsi que certains transporteurs de glucose comme GLUT2 et GLUT4²⁰⁷. En revanche, la voie de signalisation mise en place au sein de ces neurones dans le cadre d'une variation de la concentration extracellulaire en glucose est totalement différente. Celle-ci a récemment été décrite et implique notamment l'AMPK et le NO²¹⁸.

Ces neurones étant inhibés en présence de glucose, c'est donc une baisse des taux de glucose circulants qui va permettre leur activation. Dans ces conditions, la diminution de l'entrée du glucose au sein de la cellule, et donc la diminution de la formation d'ATP va mener au recrutement d'un senseur métabolique que nous avons précédemment décrit : l'AMPK. Ce dernier va alors activer la nNOS et le NO produit va augmenter les taux intracellulaires de GMPc *via* sa fixation sur la guanylate cyclase soluble. Cette modification des taux de GMPc va contribuer à suractiver l'AMPK²¹⁹. Dans ces conditions, cette enzyme est alors capable de fermer un canal ionique nommé CFTR chlorure (*Cystic fibrosis transmembrane regulator chlorure*)²²⁰. L'implication de ce canal dans le fonctionnement des neurones gluco-inhibés avait déjà été suspectée par Fioramonti *et al*²¹⁰ puisque le fait de maintenir pharmacologiquement ouvert ce canal rendait alors les neurones totalement insensibles aux variations de

glucose. La fermeture de ce canal empêche donc l'arrivée d'ions Cl^- au niveau intracellulaire et déclenche donc une dépolarisation membranaire qui va permettre la libération de neurotransmetteurs (**Figure 20**). Il semble d'ailleurs, de façon plus certaine que pour les neurones gluco-excités, qu'un des neurotransmetteurs libérés lors de la dépolarisation de ces neurones gluco-inhibés soit le NPY puisque lors d'une diminution de la concentration en glucose au sein du noyau arqué, plus de 50% des neurones à NPY se dépolarisent²¹⁰.

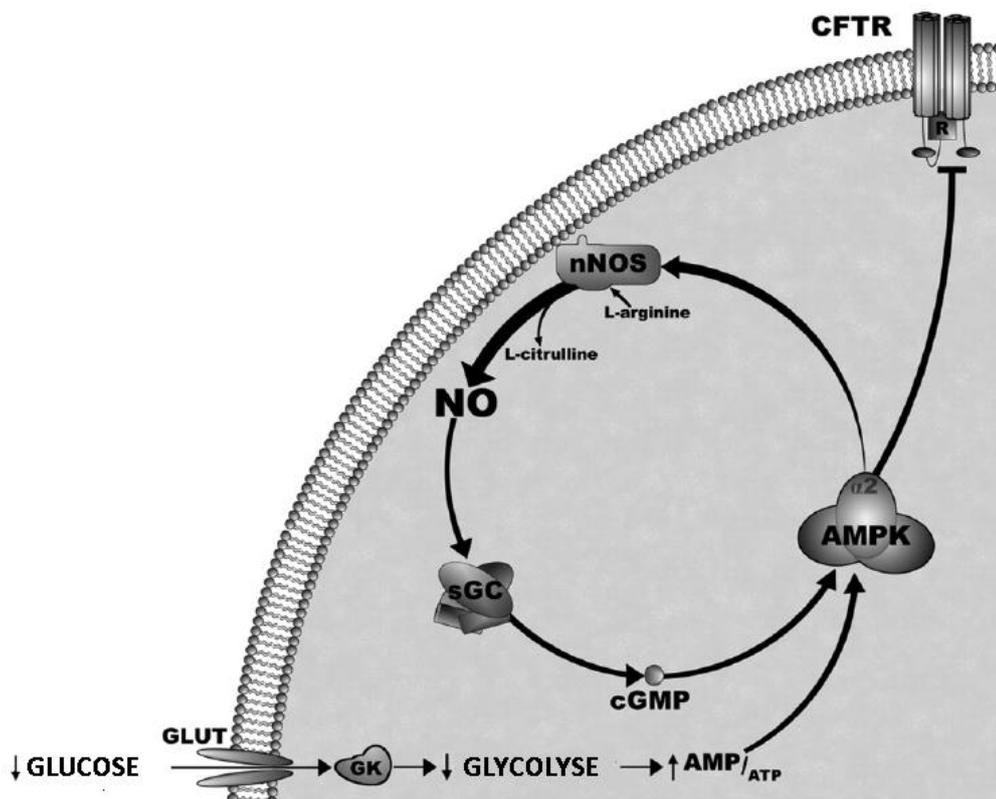


Figure 20 : Fonctionnement des neurones gluco-inhibés (D'après Murphy. 2009). La diminution du glucose extracellulaire va entraîner l'activation de l'AMPK. Cette dernière va alors phosphoryler et activer la nNOS. Le NO produit renforcera alors l'activation de l'AMPK qui deviendra alors capable de fermer le canal ionique CFTR Cl^- . La fermeture de ce canal entraîne alors une dépolarisation membranaire et la libération de neurotransmetteurs.

De la même façon que pour leurs homologues gluco-excités, l'activité des neurones gluco-inhibés est également sous le contrôle d'autres facteurs tels que l'insuline et la leptine. En effet, cette dernière est notamment capable d'inhiber l'AMPK²²¹, empêchant donc la production de NO par la nNOS. En revanche, l'effet de l'insuline reste encore peu clair puisque celle-ci stimule la

production de NO dans ces neurones mais, à l’opposé, est également capable de les hyperpolariser et donc d’empêcher la libération de neurotransmetteurs.

Dans des conditions d’obésité et de diabète de type II, on observe souvent une résistance centrale à l’action de plusieurs hormones clefs tels que l’insuline et la leptine ^{222,223}. Or, nous avons vu précédemment que ces hormones sont d’importants régulateurs de l’activité des neurones gluco-sensibles. En effet, l’insuline est capable d’inhiber l’activité des neurones GE tandis que la leptine est capable d’inhiber les neurones GI. Ainsi, du fait de la résistance à l’action de ces hormones, ces neurones deviennent donc hypersensibles aux variations de la concentration en glucose.

III. Physiopathologie : Perturbations de l’homéostasie glucidique et maladies métaboliques

1) Définition et caractéristiques

La physiopathologie est une altération du fonctionnement normal d’un organe, tissu, ou encore d’un système intégré. Une ou plusieurs altérations dans les voies de régulation de l’homéostasie glucidique qui viennent d’être décrites, ou plus largement dans une ou plusieurs voies de régulation de l’homéostasie énergétique, vont perturber le fonctionnement physiologique de l’organisme et aboutir ainsi à un « défaut » de gestion de l’énergie et, souvent, à l’apparition d’une pathologie en lien avec ce défaut. Ces pathologies peuvent être extrêmement diverses et de plus ou moins grande gravité et sont regroupées sous le terme de maladies métaboliques. Ces dernières connaissent depuis plusieurs années une expansion telle qu’il s’agit maintenant d’un véritable problème de santé publique, tant au niveau national qu’au niveau international.

Ce type de pathologies s’inscrit généralement dans le cadre plus large du syndrome métabolique. Aussi parfois nommé syndrome X et premièrement décrit par G. Reaven dans les années 1980 ²²⁴, il s’agit d’un ensemble de signes physiologiques pouvant laisser présager l’apparition d’une maladie métabolique. En clinique, ce syndrome est habituellement défini par l’association d’une obésité abdominale associée à 2 facteurs de risque parmi une hypertriglycéridémie, une diminution du HDL cholestérol, une hypertension

artérielle ou encore une glycémie à jeun élevée ²²⁵. L'obésité et le surpoids constituent en effet d'importants facteurs de risques dans le développement des pathologies métaboliques et sont de plus en plus répandus dans le monde. On estime de nos jours que près de 21% de la population mondiale et 40% de la population française présente un surpoids ou une obésité, laissant craindre une forte augmentation des maladies métaboliques dans les prochaines années. En ce qui concerne l'homéostasie glucidique, le syndrome métabolique peut laisser présager de l'apparition d'un phénomène d'insulinorésistance et/ou d'un diabète de type II. Il s'agit de la pathologie métabolique la plus répandue au monde et on dénombre à l'heure actuelle environ 30 millions de patients en Europe dont 2.5 millions en France et, selon les prévisions de l'OMS, le nombre de personnes diabétiques pourrait passer de 100 millions actuellement à plus de 300 millions en 2030 dans le monde.

a) Définition

Le terme insulinorésistance désigne une situation physiopathologique dans laquelle les tissus cibles de l'insuline, principalement le foie, le muscle et le tissu adipeux, ne répondent pas suffisamment à la présence de taux circulants normaux d'insuline. Ce défaut de réponse est lié à une altération du récepteur, ou de la voie de signalisation sous-jacente. Dans ce cas, certaines voies métaboliques ne seront plus régulées par l'insuline ce qui entraîne une augmentation de la glycémie. Le pancréas va alors s'adapter en augmentant la sécrétion d'insuline permettant de normaliser la glycémie. Il s'agit de l'état pré-diabétique, caractérisé par une glycémie normale et une hyperinsulinémie. Sur le long terme, cela va amener le pancréas à s'épuiser et mènera au final à l'établissement d'un diabète de type II, situation dans laquelle le pancréas n'est plus en mesure de compenser l'insulinorésistance.

Cette pathologie métabolique se caractérise alors à la fois par une insulinorésistance mais aussi par un défaut de sécrétion de l'insuline par les cellules β pancréatiques. Les patients sont ainsi hyperglycémiques et hyperinsulinémiques. Dans les stades les plus avancés de la pathologie, la production accrue d'insuline par le pancréas va alors conduire à l'apoptose des

cellules β pancréatiques, ce qui entraîne une diminution de l'insulinémie : on parle alors de phase d'insulinopénie.

b) Altérations moléculaires participant à l'insulino-résistance

Les différents acteurs de la voie de signalisation de l'insuline sont maintenant parfaitement connus et l'insulinorésistance peut être le fruit d'un dysfonctionnement à un ou plusieurs niveaux de la voie de transduction.

La principale cause de ce dysfonctionnement est une augmentation des phosphorylations des résidus sérine ou thréonine sur le récepteur à l'insuline ou sur les IRS²²⁶. Ces phosphorylations, à l'inverse des phosphorylations sur les tyrosines, ont un effet inhibiteur sur la transduction du signal insulinique en favorisant la dissociation des IRS et du récepteur à l'insuline²²⁷. Ce type de phosphorylation, présent en conditions physiologiques pour participer à l'arrêt du signal, est augmenté par différents facteurs tels que les acides gras, le glucose, le TNF α (*Tumour necrosis factor α*)²²⁸ ou encore les interleukines inflammatoires, tous présents en quantité importante en conditions d'obésité et/ou de diabète de type II. Plusieurs enzymes sont capables de réaliser cette opération, mais les plus impliquées sont la JNK (*Jun Kinase*)²²⁹, ERK (muscles et tissu adipeux) et mTOR (muscles)²³⁰. L'activité de ERK a d'ailleurs été montrée comme augmentée dans une lignée cellulaire issue de muscle de patients diabétiques²³¹.

Une des causes secondaires de l'insulinorésistance peut être la multiplication des cycles d'internalisation/recyclage du complexe insuline/récepteur. De façon physiologique, après internalisation dans les endosomes, une partie des récepteurs est recyclée à la membrane tandis qu'une autre est dégradée. Les mécanismes de synthèse *de novo* du récepteur à l'insuline sont, en temps normal, assez efficaces pour compenser la dégradation et ainsi maintenir stable le pool de récepteurs exprimés à la surface. En revanche, lorsque le taux d'insuline est trop important, cet équilibre est rompu et le nombre de récepteurs dégradés est plus important que le nombre de récepteurs créés, ce qui finit par aboutir à une diminution du nombre de récepteurs exprimés à la surface des cellules²³².

Outre la diminution du nombre de récepteurs et la multiplication des phosphorylations inhibitrices, une altération biochimique participant à la mise en place de l'insulinorésistance est l'augmentation de la déphosphorylation des tyrosines du récepteur et/ou des IRS ²³³. Les enzymes impliquées sont LAR (*Leukocyte common antigen-related molecule*) au niveau membranaire, et PTP-1B (*Phosphotyrosine phosphatase 1B*) dans le cytoplasme ²³⁴. Cette dernière semble être plus largement impliquée. En effet, des souris invalidées pour PTP-1B voient la phosphorylation du récepteur en réponse à l'insuline prolongée dans le muscle et le foie, entraînant une augmentation globale de la sensibilité à l'insuline de ces animaux ²³⁵. L'activité augmentée de ces enzymes a par ailleurs été montrée chez des patients atteints d'un diabète de type II ²³⁶. Ces déphosphorylations ont donc pour effet d'empêcher la fixation des acteurs de la signalisation (IRS, PI3K, protéines adaptatrices,...).

2) Altérations périphériques dans le cadre d'un diabète de type II

a) Flore intestinale

L'intestin est habité par un grand nombre de bactéries qui vivent en symbiose avec l'organisme hôte ²³⁷. Totalement physiologique et non pathogène, on désigne l'ensemble de ces micro-organismes par le terme de flore intestinale ou encore de microbiote intestinal. Certaines de ces bactéries ont des capacités synthétiques et métaboliques que ne possède pas un organisme animal. Ainsi, l'hôte peut bénéficier de l'action de ces bactéries à plusieurs niveaux : renforcement de l'immunité, synthèse de vitamines, développement des villosités intestinales,... ²³⁸. Au niveau énergétique, les micro-organismes composant la flore intestinale peuvent utiliser des nutriments ayant échappés à la digestion « physiologique » dans les parties hautes de l'intestin. Ces substrats, principalement des glucides non digestibles, sont fermentés et transformés en acides carboxyliques à chaîne courtes capables d'être absorbés par les cellules de la muqueuse intestinale, dans lesquelles ils pourront servir de substrats glucogéniques ou lipogéniques ²³⁹.

C'est en 2004 qu'il a été montré, pour la première fois, un lien entre la flore intestinale et la régulation du stockage énergétique de l'hôte, suggérant ainsi que le microbiote ou une modification de ce dernier puissent participer à la mise

en place de maladies métaboliques²⁴⁰. Ces travaux ont montré que des souris normales présentaient une masse adipeuse de 40% supérieure à celle de souris totalement dépourvues de flore intestinale (dites axéniques). De la même façon, l'établissement d'un microbiote intestinal classique chez des souris axéniques favorisait de 60% le développement de la masse adipeuse par rapport aux souris restées dépourvues de flore intestinale. Les mêmes auteurs ont alors proposé que le microbiote puisse diminuer l'expression du facteur FIAF (*Fasting-Induced Adipose Factor*), inhibiteur de la LPL, enzyme participant au stockage des acides gras d'origine alimentaire dans le tissu adipeux ; et également augmenter l'absorption intestinale du glucose tout en favorisant l'expression hépatique de facteurs favorisant le développement de la masse adipeuse comme ChREBP (*carbohydrate-responsive element-binding protein*) et SREBP-1 (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1*). En 2006, une expérience a permis de renforcer ce lien entre flore intestinale, régulation de l'homéostasie énergétique et maladies métaboliques. En effet, des chercheurs ayant colonisé la flore de souris saines avec une flore de souris obèses ont observé une augmentation rapide du poids corporel des animaux dont la flore avait été modifiée²⁴¹.

Ainsi, il semble que la présence du microbiote en lui-même ne soit pas un vecteur de maladie métabolique, mais plutôt que sa composition puisse être modifiée par des facteurs extérieurs et que dans certains cas la modification puisse générer des perturbations de l'homéostasie énergétique. Cette hypothèse a été confirmée par l'étude et la comparaison des phylums bactériens composant le microbiote de souris saines et de souris obèses et diabétiques de type II. En effet, il a été mis en évidence que les animaux obèses possédaient moitié moins de *Bacteroidetes* et deux fois plus de *Firmicutes* (ces deux phylums représentant près de 90% du microbiote) que les animaux sains²⁴². La même observation a pu être faite sur des sujets humains ; chez qui une diminution du poids corporel induite par un régime hypocalorique permet de restaurer un profil bactérien similaire à celui des sujets minces²⁴³. Cela suggérerait donc que des changements qualitatifs qui ciblent certaines souches de bactéries peuvent être reliés à l'obésité et au diabète et que toutes

les bactéries ne joueraient pas un rôle identique dans le dialogue métabolique avec l'hôte.

En plus d'une modification du profil bactérien intestinal, il a aussi été mesuré des taux circulants plus importants de LPS (*Lipopolysaccharide*) chez les souris obèses et diabétiques²⁴⁴ et chez le rat, associé dans ce modèle animal à une diminution de l'activité de l'IAP (*Intestinal Alkaline Phosphatase*), enzyme de dégradation du LPS. Par ailleurs, il a également été décrit une activation des TLR4 (*Toll Like Receptors 4*) dans l'iléon de rats obèses²⁴⁵. Or, ce type de récepteur est un des premiers impliqués dans la mise en place des effets pro-inflammatoires du LPS.

Composant essentiel de la paroi bactérienne des bactéries Gram -, le LPS est une endotoxine qui ne peut être libérée que lors de la lyse bactérienne. Ainsi, on peut donc penser que l'augmentation de l'endotoxémie chez les obèses soit la conséquence directe d'une augmentation de la destruction des *Bacteroidetes*, expliquant ainsi les observations précédentes. Une fois libéré, le LPS est absorbé par l'intestin puis transporté par des lipoprotéines vers les tissus cibles de l'hôte²⁴⁶. Par ailleurs, plusieurs études ont montré qu'un régime riche en lipides augmentait la perméabilité intestinale au LPS^{247,248}, notamment *via* la diminution de l'expression et de la distribution de protéines participant à l'établissement des jonctions serrées telles que ZO-1 (*zona occludens 1*) et l'occludine²⁴⁹. Une fois dans la circulation sanguine, le LPS se lie alors aux complexes CD14/TLR4 présents à la surface des cellules immunitaires, favorisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires²⁵⁰ qui participent au développement de l'insulino-résistance.

b) Inflammation

L'obésité et le diabète de type II sont des pathologies métaboliques liées à un état inflammatoire de faible intensité qui touche plusieurs organes et notamment certains très impliqués dans la régulation de l'homéostasie glucidique tels que le tissu adipeux, le foie et le cerveau (ce dernier cas sera détaillé dans la partie suivante du manuscrit)²⁵¹.

Les recherches sur le lien entre inflammation et maladies métaboliques ont débuté en 1993, après la publication de travaux rapportant une expression élevée du TNF α dans le tissu adipeux de quatre différents modèles murins d'obésité et de diabète, et l'observation que la neutralisation de ce facteur inflammatoire permettait d'améliorer l'utilisation du glucose en réponse à l'insuline²⁵². De la même façon, des souris inactivées pour les gènes du TNF- α et de ses récepteurs et soumises à un régime hyperlipidique restent plus sensibles à l'insuline que les souris non-invalidées²⁵³. Les années suivantes, d'autres facteurs inflammatoires tels que l'IL-6²⁵⁴ et la protéine C réactive²⁵⁵ ont également été décrits comme augmentés aux niveaux adipocytaire et sanguin dans des conditions d'obésité et de diabète.

La mise en place de cet état inflammatoire passe par l'augmentation de la production de facteurs pouvant stimuler de manière importante les macrophages au niveau de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires²⁴⁴. Relâchées dans la circulation sanguine, ces cytokines vont atteindre différents tissus, parmi lesquels le foie et le muscle ainsi que le tissu adipeux. Au sein de ce dernier, l'infiltration macrophagique sera augmentée²⁵⁶, à tel point que chez l'humain l'obèse, les macrophages peuvent parfois représenter plus de la moitié des cellules composant le tissu adipeux, contre moins de 10% chez l'humain sain²⁵⁷. Il a par ailleurs été montré que les adipocytes hypertrophiés de tissu adipeux d'obèses sécrétaient une chimiokine, MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein 1*) qui augmente le recrutement des macrophages²⁵⁸.

Les raisons mêmes de cette sécrétion de chimiokines participant à l'infiltration macrophagique du tissu adipeux sont mal connues mais il a été proposé que cette sécrétion résulterait d'un stress dû à l'hypertrophie adipocytaire²⁵⁹. Cette étape de recrutement macrophagique semble contribuer à la mise en place de l'insulino-résistance puisque son blocage permet d'améliorer l'insulino-résistance chez la souris obèse²⁶⁰. A l'inverse, la surexpression de MCP-1 dans le tissu adipeux augmente logiquement l'infiltration macrophagique et diminue la sensibilité à l'insuline²⁶¹. Toutefois, l'importance de ce facteur est encore discutée puisque des auteurs ont rapporté que des souris MCP-1 -/- ne présentaient pas de diminution de l'infiltration macrophagique et ne montraient

pas d'amélioration de l'insulino-sensibilité au cours de la mise en régime gras des animaux²⁶².

Néanmoins, le tissu adipeux comporte de façon totalement physiologique des macrophages résidents jouant un rôle dans le maintien de l'intégrité du tissu et également de sa plasticité²⁶³. Ce sont donc les macrophages nouvellement infiltrés qui seraient responsables de la mise en place de l'insulino-résistance au sein de ce tissu. Appuyant cette hypothèse, il s'avère que le profil des macrophages infiltrés est largement différent de celui des macrophages résidents, avec notamment une expression fortement augmentée de CD14 et TNF- α ²⁶⁴, mais aussi d'IL-6²⁶⁵.

En plus du tissu adipeux, le foie est un organe également affecté. Une étude a d'ailleurs montré que l'expression des facteurs inflammatoires au niveau hépatique était corrélée à l'importance de la stéatose hépatique²⁶⁶. Ainsi, de la même façon qu'une hypertrophie adipocytaire, l'accumulation de lipides dans les hépatocytes pourrait participer à l'augmentation de l'expression de cytokines inflammatoires. De plus, les cytokines produites par le tissu adipeux peuvent également passer dans la circulation sanguine et atteindre le foie, potentialisant les effets de la stéatose hépatique. A la différence du tissu adipeux, le foie ne recrute pas de macrophages. En effet, près de 5% des cellules de foie sont des cellules de Kupffer, inactives en conditions normales, mais activées en réponse à des stimuli inflammatoires. Concernant l'implication de ces cellules dans l'établissement de maladies métaboliques, il a été montré que l'inactivation de ces dernières chez des animaux obèses et diabétiques permettait d'améliorer la tolérance au glucose et la sensibilité hépatique à l'insuline²⁶⁷.

Dans l'ensemble, cette augmentation des médiateurs inflammatoires en conditions d'obésité va contribuer à l'inhibition des effets de l'insuline. En effet, comme évoqué précédemment, les acteurs de l'inflammation favorisent les phosphorylations inhibitrices sur résidus sérines des IRS, les empêchant alors d'effectuer la liaison nécessaire au récepteur à l'insuline pour assurer la continuité du signal. L'inhibition de ces médiateurs permet d'ailleurs de diminuer les phosphorylations inhibitrices et de restaurer une partie de l'insulino-sensibilité²⁶⁸.

c) Stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique rugueux a pour fonction d'assembler et de transporter les protéines. Siège de la traduction, les protéines en cours de formation y sont également repliées puis acheminées ensuite vers l'appareil de Golgi où se déroulera l'essentiel des modifications post-traductionnelles avant sécrétion dans le cytoplasme. Avant l'envoi vers le Golgi, il existe au sein du réticulum endoplasmique une étape de vérification de la bonne conformation de la protéine. Si, comme cela peut être le cas lors de certaines pathologies (cancer, infection virale) ou d'une synthèse accrue de protéines, une accumulation de protéines mal conformées est détectée, on parle alors de stress du réticulum endoplasmique et une réponse adaptée, nommée réponse UPR (*Unfolded Protein Response*) est mise en place afin de réorienter ces protéines défectueuses vers le protéasome (**Figure 21**).

La réponse UPR est le fruit de l'activation de 3 protéines transmembranaires du réticulum endoplasmique : Ire-1 (*Inositol requiring enzyme 1*), PERK (*PKR-like εR protein kinase*) et ATF6 (*Activating transcription factor 6*). Ire-1 va permettre l'activation et l'accumulation du facteur de transcription Xbp-1 (*X-box binding protein 1*)²⁶⁹ qui aboutira à l'augmentation de l'expression de protéines chaperonnes permettant l'acheminement des protéines mal conformées vers le protéasome, lieu de leur dégradation²⁷⁰. De la même façon, la kinase PERK va phosphoryler la protéine eIF2α sur sa sérine 51, ce qui va entraîner une diminution générale de la synthèse de protéine au sein de la cellule concernée²⁷¹. Cette diminution générale de la synthèse est le fruit d'une inhibition de la cycline D1, qui va donc entraîner l'arrêt du cycle cellulaire²⁷² et également de l'augmentation du facteur de transcription ATF4²⁷³ qui va entraîner l'expression accrue du facteur de transcription pro-apoptotique CHOP (*C / EBP homologous protein*) et ainsi favoriser la mort cellulaire programmée²⁷⁴. Le dernier acteur principal de cette réponse UPR, ATF6, est d'ordinaire attaché à la membrane du réticulum endoplasmique. Lors de la détection d'un stress, ce dernier va être clivé et amené au niveau de l'appareil de Golgi²⁷⁵, où il sera clivé par des protéases, permettant la libération d'un dernier facteur de transcription régulant l'expression d'un sous-ensemble de gènes sensibles à Xbp1.

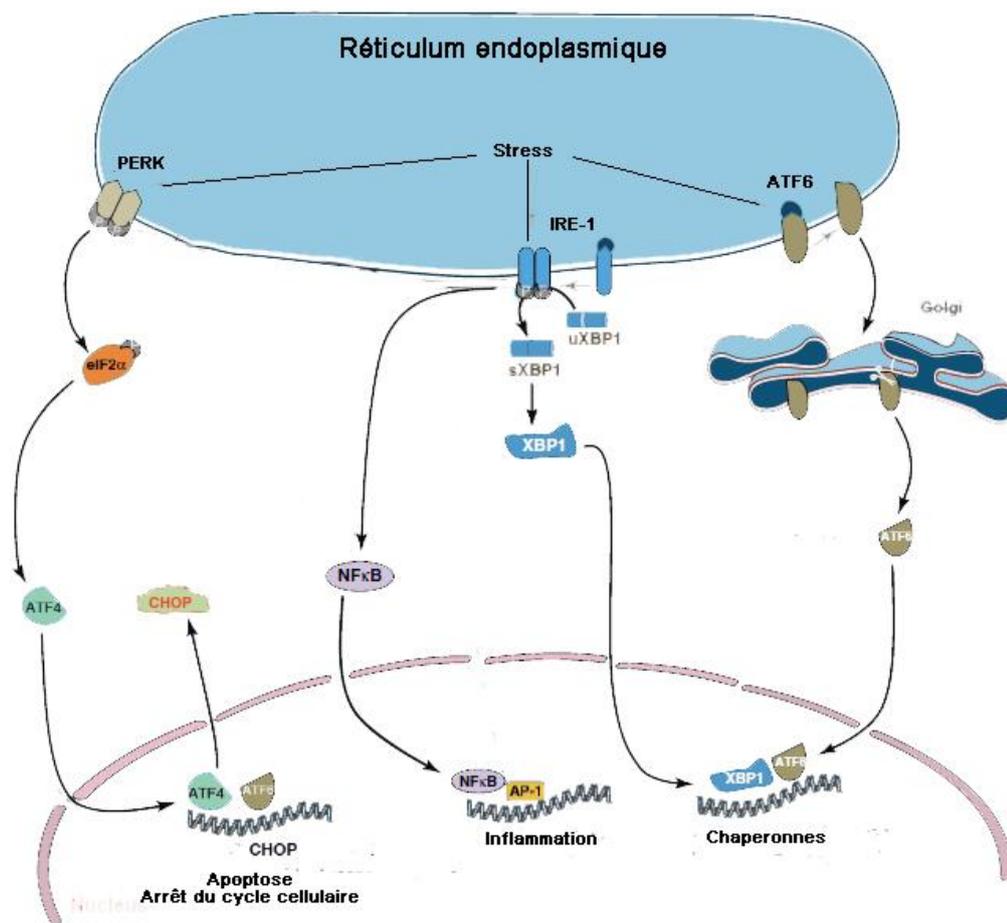


Figure 21 : La réponse UPR (D'après Cnop. 2011). Lors de la détection de protéines mal conformées, un stress du réticulum se met en place avec la réponse UPR. Celle-ci se déroule à travers 3 acteurs majeurs qui vont favoriser la destruction des protéines mal conformées et permettre l'arrêt du cycle cellulaire.

Il a plusieurs fois pût être établi un lien entre le stress du réticulum endoplasmique et des pathologies métaboliques telles que l'obésité et/ou le diabète de type II ^{276,277}. Chez l'humain obèse, un by-pass gastrique et la perte de poids qui s'ensuit induisent une réduction de ce stress au sein du tissu adipeux ²⁷⁸. Ainsi, l'obésité est un facteur d'induction du stress du réticulum endoplasmique, notamment dans le foie et le tissu adipeux de souris, ce qui participe à l'insulino-résistance. La mise en place de la réponse UPR dans les cellules hépatiques entraîne notamment une diminution de la phosphorylation sur tyrosine de IRS-1 ²⁷⁹. Parallèlement à ce phénomène, l'induction de la JNK par Ire-1 ²⁸⁰ va augmenter les phosphorylations inhibitrices sur IRS-1. Au niveau du tissu adipeux, il a été montré que l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique dans l'adipocyte de souris inhibait le transport de glucose stimulé par l'insuline ²⁸¹. Par ailleurs, l'amélioration du stress du réticulum

endoplasmique (c'est-à-dire la diminution de la phosphorylation ou de l'expression de tous les acteurs impliqués) permet l'amélioration de la sensibilité à l'insuline au niveau du foie et du muscle de l'humain ²⁸² et également au niveau du tissu adipeux de souris génétiquement obèses ²⁸³.

Prises ensemble, ces données montrent clairement une participation du stress du réticulum endoplasmique à l'établissement de l'insulino-résistance. Toutefois, ce lien entre une malformation de protéines, la réponse UPR qui en découle et les maladies métaboliques reste encore à éclaircir. En effet, il a été montré qu'en condition d'obésité, l'expression hépatique du facteur ATF6 était diminuée et que le rétablissement de son expression permettait d'améliorer l'homéostasie glucidique des individus ²⁸⁴.

d) Stress oxydant

La mitochondrie, chez les cellules eucaryotes, est un organite considéré comme la source principale d'énergie du fait des réactions métaboliques qui s'y déroulent (notamment la phosphorylation oxydative, ou cycle de Krebs). Cela permet la formation d'équivalents réduits (NADH_2 et FADH_2), substrats de la CRM (Chaîne respiratoire mitochondriale). Leur oxydation à ce niveau libère notamment des électrons qui transitent alors de complexe en complexe parallèlement à la création d'un gradient de protons entre la matrice et l'espace intermembranaire. En l'absence de découplage (dissipation des protons par des UCPs), les protons transitent par l'ATP synthase (complexe V) qui utilisent l'énergie du gradient électro-chimique pour former l'ATP. Ainsi, lorsque le flux de nutriments est important, l'énergie redox disponible (NADH_2 et FADH_2) est importante et il y a une forte production d'ATP. Il existe toutefois une contrainte liée au ratio ATP/ADP et aux activités respectives des complexes. La chaîne respiratoire est alors « encombrée » d'électrons qui peuvent fuir de la CRM par les complexes I et III et réagir avec l' O_2 moléculaire pour former l'anion superoxyde (O_2^-) qui, très rapidement, est transformé en H_2O_2 (*Peroxyde d'hydrogène*) par la superoxyde dismutase puis neutralisé en H_2O par la catalase ²⁸⁵ (**Figure 22**). L'ensemble de ces dérivés oxygénés est capable de réagir avec les molécules environnantes, et sont de fait nommées EAOs (*Espèces actives de l'oxygène*).

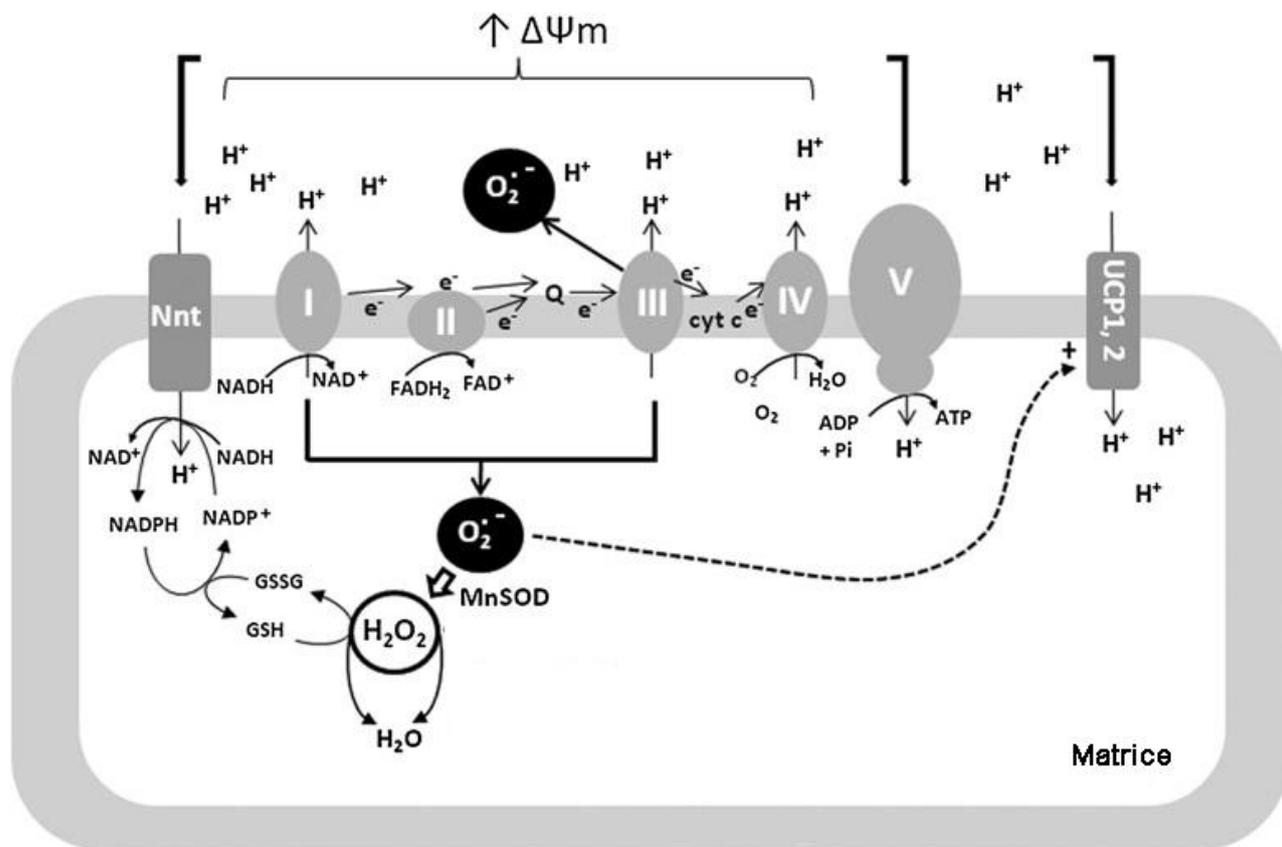


Figure 22 : Génération des espèces actives de l'oxygène mitochondriales (D'après Leloup. 2011). La fuite d'électrons au niveau des complexes I et III de la CRM entraîne une réaction avec l'oxygène moléculaire, ce qui conduit à la formation de l'anion superoxyde. Ce dernier sera ensuite rapidement transformé en radicaux moins réactifs tels que l' H_2O_2 par des systèmes antioxydants.

Surtout connues auparavant pour leurs effets délétères (détérioration des tissus, altération de l'ADN, ...), il est aujourd'hui démontré que ces EAOs agissent comme molécules de signalisation (dite « rédox-sensible »)²⁸⁶, et notamment dans la régulation du métabolisme lors de modifications rapides et transitoires de la glycémie. Ainsi, il a été montré chez le rat qu'au niveau des îlots de Langerhans une augmentation de la concentration en glucose entraînait une production accrue et transitoire d'EAOs, et que la suppression de celle-ci perturbait le fonctionnement normal de la cellule⁷⁸. Cette observation est appuyée par le travail de l'équipe de Collins *et al*⁷⁹, qui a observé sur des îlots pancréatiques isolés de souris ainsi que sur des lignées cellulaires de cellules β que la sécrétion d'insuline était stimulée par une augmentation du taux d' H_2O_2 et que le blocage de cette augmentation perturbait la sécrétion insulinaire.

Du fait de leurs implications physiologiques importantes à faible dose, et de leur potentielle dangerosité pour l'intégrité de l'organisme à forte dose, les EAOs et leur production sont très contrôlées. A cet effet, il existe donc au sein des cellules des systèmes de défenses antioxydantes qui peuvent être spécifique d'une EAO (par exemple la catalase neutralise spécifiquement l'H₂O₂) ou aspécifique (vitamine E, glutathion réduit) ²⁸⁷. En condition d'obésité et de diabète de type II, il a souvent été observé une diminution de ces défenses antioxydantes. Par exemple, les expressions de la catalase, de la superoxyde dismutase ou en encore de la glutathion peroxydase sont fortement diminuées dans les cellules β pancréatiques de rats Zucker obèses ²⁸⁸. De plus, la régénération de systèmes antioxydants aspécifiques tels que le glutathion est diminuée ²⁸⁹, entraînant donc une moins bonne efficacité du système. Ces dysfonctionnements, associés à un flux de nutriments augmenté chez l'obèse aboutit à une augmentation du taux des EAOs qui vont alors avoir des effets délétères. On parle alors de stress oxydant.

De nombreuses études ont montré l'implication du stress oxydant dans la mise en place de l'insulino-résistance, sans toutefois que l'ensemble des mécanismes impliqués soient totalement compris ²⁹⁰. Plusieurs pistes sont pourtant largement étudiées. Ainsi, lors d'un stress oxydant, il semblerait que le fort taux d'EAOs favorise les phosphorylations inhibitrices sur IRS, un des premiers acteurs moléculaires de la voie de signalisation de l'insuline. De plus, un environnement cellulaire trop oxydé favorise l'expression de certains membres de la famille des MAP kinases (tels que JNK) qui vont également avoir la capacité d'interagir soit avec le récepteur à l'insuline, soit avec IRS et perturber la transduction normale du signal ²⁹¹.

3) Altérations centrales dans le cadre d'un diabète de type II

La plupart des altérations physiologiques observées en périphérie dans le cadre d'une obésité et/ou d'un diabète de type II sont également retrouvées au niveau du système nerveux central, et particulièrement dans l'hypothalamus.

a) Inflammation

Au même titre que le tissu adipeux et le foie en périphérie, l'hypothalamus est également un organe touché par une inflammation de bas niveau dans des situations d'obésité et de diabète de type II. Dans l'ensemble, les différents mécanismes inflammatoires qui y sont mis en place vont aboutir à une résistance hypothalamique à l'action de la leptine et de l'insuline, favorisant ainsi la prise de poids et l'excès de nutriments circulants, qui vont à leur tour renforcer l'inflammation hypothalamique.

En 2005, une étude menée sur des rats soumis à un régime hyperlipidique a montré que plus de 15% des gènes dont l'expression était augmentée au sein de l'hypothalamus codaient pour des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6 et TNF- α . Cette expression augmentée est liée à une augmentation de l'activité de la JNK et du facteur de transcription NF-kB (*Nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells*)²⁹². Les raisons mêmes de cette augmentation d'activité restent encore peu claires. Toutefois, plusieurs études permettent d'envisager un rôle prépondérant des substrats énergétiques circulants, en particulier les acides gras. En effet, ceux-ci sont augmentés chez les obèses et largement présents dans un régime hyperlipidique. Différents travaux ont porté sur l'étude de leurs effets centraux et ont notamment permis de mettre en évidence que ces substrats étaient capables d'activer une réponse inflammatoire au niveau des cellules gliales *via* l'activation de récepteurs de la famille des Toll-like récepteurs²⁹³.

Plus précisément, le récepteur TLR-4 et la protéine adaptatrice MyD88 semblent jouer un rôle prépondérant dans l'établissement de cette réponse inflammatoire. En effet, des souris délétées pour cette protéine dans l'hypothalamus sont protégées de la prise de poids et de la résistance hypothalamique à la leptine induite par un régime hyperlipidique et présentent également une inflammation hypothalamique moins sévère²⁹⁴. De la même façon, l'activation du récepteur TLR-4 permet d'induire la voie de signalisation NF-kB. Des stratégies de suractivation ou d'inhibition localisées de cette voie par l'utilisation de vecteurs viraux ont montré que cette signalisation était essentielle pour l'établissement de l'inflammation hypothalamique, la prise de

poids corporel et l'établissement de la résistance hypothalamique à la leptine et l'insuline²⁹⁵.

b) Stress du réticulum endoplasmique

Le stress du réticulum endoplasmique au niveau de l'hypothalamus contribue à la mise en place et au maintien des caractéristiques de l'obésité et du diabète de type II, et particulièrement au développement de la résistance hypothalamique à la leptine²⁹⁶. En effet, l'induction pharmacologique d'un stress du réticulum au niveau hypothalamique chez des souris saines déclenche une inflammation, une diminution de la sensibilité à la leptine et une prise calorique augmentée. A l'inverse, le fait de réduire pharmacologiquement le stress du réticulum endoplasmique au niveau de l'hypothalamus de souris obèses permet d'améliorer la résistance à la leptine²⁹⁷. Au niveau moléculaire, Hosoi *et al*²⁹⁸ ont pu montrer que cette altération de la signalisation de la leptine lors d'un stress du réticulum était dûe à une forte diminution de la phosphorylation de STAT3, protéine clef de la voie de signalisation de la leptine. Cette déphosphorylation est liée à une augmentation de l'activité de PTP-1B, ce qui peut également expliquer en partie la diminution de la sensibilité hypothalamique à l'insuline.

L'origine du stress du réticulum endoplasmique au niveau de l'hypothalamus est encore mal connue. Il semble que les acides gras libres puissent avoir un effet déclencheur direct puisque des neurones hypothalamiques en culture exposés *in vitro* à des acides gras libres présentent un stress du réticulum endoplasmique, mais pas d'inflammation²⁹⁹. Toutefois, la réponse UPR, marqueur du stress du réticulum endoplasmique, paraît majoritairement mise en place en réponse à l'activation du récepteur TLR-4, responsable également de l'établissement de la réponse inflammatoire hypothalamique, par les acides gras libres³⁰⁰.

c) Stress oxydant

Les EAOs sont des dérivés oxygénés qui sont notamment impliquées dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose par le pancréas⁷⁸. Ces EAOs sont également produites au niveau hypothalamique en réponse à l'arrivée de

substrats énergétiques³⁰¹, où elles contribuent à la détection du glucose et à la stimulation nerveuse de la sécrétion d'insuline. En effet, Leloup *et al*³⁰² ont montré en 2006 chez le rat que l'injection au niveau central de bloqueurs de la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui entraîne la génération d'EOs, permet, d'une part, d'augmenter l'activité électrique des neurones glucoexcités et, d'autre part, de stimuler la production d'insuline périphérique. A l'inverse, l'injection préalable d'antioxydants dans le même modèle animal inhibe l'activation de ces neurones sensibles au glucose et bloque la sécrétion d'insuline en réponse à une injection intracarotidienne de glucose. Ainsi, une altération de la production de ces EOs au niveau hypothalamique peut donc contribuer à l'établissement de pathologies métaboliques.

Dans ce cadre, des rats soumis à un régime obésitogène pendant 5 mois présentent effectivement un taux central d'EOs plus important que les animaux soumis à un régime contrôle³⁰³. Par ailleurs, le rat Zucker, autre modèle de pathologie métabolique³⁰⁴, présente également une altération de la production hypothalamique de ces EOs qui génère une hypersensibilité hypothalamique au glucose. Cette altération observée dans ce modèle d'obésité est la conséquence, d'une part, d'une augmentation de l'activité des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et, d'autre part, de la diminution des défenses antioxydantes au niveau de l'hypothalamus³⁰⁵. Ainsi, l'augmentation des taux d'EOs hypothalamiques en condition d'obésité pourrait contribuer à l'établissement d'une hyperinsulinémie, caractéristique du diabète de type II. En effet, les EOs hypothalamiques sont notamment capables de moduler l'activité de canaux ioniques voltage-dépendants et de moduler l'activité électrique neuronale³⁰⁶. Ce phénomène peut augmenter la stimulation nerveuse de la sécrétion d'insuline par le pancréas et donc participer à la mise en place de pathologies métaboliques.

IV. Communications périphérie / système nerveux central dans le métabolisme glucidique

A) Le tractus digestif

L'estomac et l'intestin sont le siège de la digestion des aliments et sont donc très impliqués dans la régulation du métabolisme glucidique. De fait, le tractus

gastro-intestinal est capable de générer plusieurs sortes de signaux, à la fois mécaniques et endocriniens, qui vont pouvoir moduler l'activité de l'hypothalamus. On parle alors d'un axe intestin / cerveau.

1) Distension gastrique

Lors d'une prise alimentaire, les aliments arrivent au niveau de l'estomac qui poursuit le travail de dégradation des aliments commencé par la mastication. Les aliments ingérés y seront transformés de façon mécanique en fines particules par brassage grâce aux muscles lisses, mais également de façon chimique par l'action de sucs gastriques sécrétés par des cellules spécialisées localisées dans le *fundus*. Au fur et à mesure de l'ingestion d'aliments, l'estomac se remplit de plus en plus, ce qui va entraîner, grâce à l'existence de mécanorécepteurs situés dans la paroi intestinale, un relâchement progressif des muscles lisses permettant notamment la dilatation de l'estomac.

Ces mécanorécepteurs et ce phénomène de dilatation de l'estomac jouent un rôle important dans la mise en place du signal de satiété durant la prise alimentaire. En effet, Lee *et al*³⁰⁷ ont montré *via* l'insertion de ballons gonflables dans l'estomac de volontaires sains que les sujets éprouvaient des sensations allant de la simple satiété jusqu'à la douleur et que l'intensité de ces sensations était directement corrélée à l'importance de la dilation de l'estomac induite par le ballon. De plus, l'installation de tels ballons dans l'estomac de sujets massivement obèses permet d'augmenter artificiellement la distension de l'estomac et de réduire transitoirement la sensation de faim des sujets³⁰⁸.

Cette modulation du comportement alimentaire en fonction de la distension de l'estomac suggère donc un effet sur le système nerveux central, siège de la régulation du comportement alimentaire. A ce titre, plusieurs études ont montré qu'une fois activés, les mécanorécepteurs de l'estomac relayaient l'information au tronc cérébral et à d'autres régions centrales³⁰⁹ *via* le nerf vague et les nerfs splanchniques³¹⁰. Toutefois, à l'heure actuelle, les relais neuronaux au sein du système nerveux central ainsi que les acteurs moléculaires impliqués dans la mise en place de cet effet satiétogène sont encore très mal connus, malgré quelques pistes sur l'implication du neurotransmetteur GABA (*γ-Aminobutyric acid*)³¹¹.

2) Peptides gastro-intestinaux

Il existe au niveau gastrique et intestinal une quinzaine de types de cellules sécrétrices de peptides régulateurs agissant soit localement soit par voie sanguine. Plusieurs pistes suggèrent que ces sécrétions peuvent également participer à la régulation de l'homéostasie énergétique. Parmi ces différents peptides intestinaux, la CCK (*cholecystokinine*), le GLP-1 et la ghréline sont les plus importants et les mieux décrits. Nous nous limiterons dans cette partie à décrire les effets de ces peptides impliquant cet axe intestin / cerveau.

a) Cholecystokinine

La CCK est une protéine produite au niveau de l'estomac, par les cellules G localisées dans l'*antrum*. Elle est également produite au niveau intestinal, plus particulièrement au niveau du duodénum et du jéjunum par les cellules I³¹². Par ailleurs, ce peptide est également fortement exprimé au sein du système nerveux central³¹³ notamment dans certains noyaux hypothalamiques. Au niveau extra-hypothalamique, les zones exprimant la CCK sont majoritairement l'hippocampe, les amygdales et le thalamus^{314,315}. Il a été montré chez le rat que la CCK coexistait avec la dopamine dans certains neurones du mésencéphale³¹⁶, et avec le neurotransmetteur GABA dans le cortex³¹⁷.

La présence ou l'absence d'un groupement sulfate sur la partie terminale de ce peptide module l'activité biologique et l'affinité pour les récepteurs. Il existe en effet 2 récepteurs à la CCK, nommés respectivement CCK-1 et CCK-2. Ce sont tous deux des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G_q³¹⁸ qui peuvent être pharmacologiquement distingués par leur affinité avec leur ligand. Ainsi, le récepteur CCK-1 présente une très forte affinité pour la CCK sulfatée³¹⁹, tandis que l'affinité du récepteur CCK-2 est identique pour les formes sulfatées et non sulfatées de la CCK³²⁰. Ces récepteurs sont largement distribués dans l'ensemble de l'organisme. Toutefois, le récepteur CCK-2 est majoritairement retrouvé dans l'ensemble du système nerveux central³²¹, alors que la présence du récepteur CCK-1 au niveau central se limite à quelques noyaux hypothalamiques. A l'inverse, ce récepteur CCK-1 est majoritaire en périphérie où il est notamment présent au niveau du pancréas³²², de l'estomac³²³, des muscles lisses intestinaux³²⁴ ainsi que sur des

afférences vagues³²⁵. L'expression périphérique du récepteur CCK-2 se limite à quelques cellules immunitaires comme les monocytes³²⁶ et les lymphocytes T³²⁷. Pour l'ensemble de ces récepteurs, la voie de signalisation mise en place après fixation de la CCK est la même et implique l'activation de la calmoduline et de la PKC qui pourront alors agir sur différentes kinases responsables de la mise en place des différents effets de la CCK.

Parmi ceux-ci, l'effet satiétogène a été le premier suspecté. En effet, les taux plasmatiques de CCK sont augmentés en réponse à une prise alimentaire, notamment par l'arrivée de protéines et de lipides et diminuent lors du jeûne³²⁸. De plus, l'injection systémique de CCK permet de réduire la prise alimentaire chez le rat³²⁹ et les souris délétées pour le récepteur CCK-1 ne sont pas sensibles à cet effet³³⁰. Plusieurs équipes se sont intéressées aux mécanismes impliqués et l'équipe de Smith *et al*³³¹ ont montré en 1981 qu'une bivaotomie menée chez le rat permet de supprimer l'effet anorexigène de la CCK. De plus, Ritter *et al*³³² ont rapporté par la suite une diminution de l'activité des neurones du tronc cérébral en réponse à la CCK chez des animaux dont le nerf vague a été détruit par un traitement à la capsaïcine. Ces observations suggèrent donc que la CCK produite au niveau de l'estomac et de l'intestin en réponse à une prise alimentaire entraînerait une activation du nerf vague *via* la fixation au récepteur CCK-1 présent sur les afférences vagues innervant le tractus digestif. Au-delà de cet effet sur la prise alimentaire, l'équipe de Cheung *et al*³³³ a montré que la CCK intestinale permettait de diminuer la production hépatique de glucose *via* un relais nerveux au niveau central. Très récemment, une équipe a pour la première fois impliqué la CCK hypothalamique dans l'amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline³³⁴. Ces dernières données suggèrent donc que la CCK produite au niveau intestinal puisse atteindre l'hypothalamus par voie sanguine afin de moduler le métabolisme glucidique.

Les mécanismes précis s'établissant au sein du système nerveux central sont encore mal connus. Plusieurs auteurs ont montré l'expression de *c-Fos* au niveau du NTS, du PVN et du noyau supraoptique en réponse à une injection périphérique de CCK, expression supprimée par une bivaotomie et par un antagoniste des récepteurs CCK-1^{335,336}. Par ailleurs, Sabatier *et al*³³⁷ ont

montré dans un modèle de rat anesthésié que l'activité globale des neurones du VMH était diminuée en réponse à une injection périphérique de CCK. De nouvelles études doivent donc être menées afin de comprendre parfaitement les mécanismes centraux impliqués dans les effets de la CCK ainsi que leur éventuelle dérégulation.

Dans des modèles d'obésité, il a été remarqué chez les rongeurs une forte diminution de l'expression de c-Fos au niveau des neurones du NTS en réponse à la CCK par rapport à des animaux sains³³⁸ ainsi qu'une forte diminution de l'effet satiétogène³³⁹. Par ailleurs, la diminution de la production hépatique de glucose en réponse à la CCK est également altérée³³³. Les taux plasmatiques de CCK ainsi que le récepteur CCK-1 sont pourtant augmentés chez les obèses^{340,341}. Ceci suggère donc une diminution de la sensibilité à la CCK chez l'obèse^{342,343} mais les mécanismes exacts par lesquels celle-ci s'établit sous un régime hyperlipidique restent encore inconnus. A l'heure actuelle, quelques données suggèrent l'implication de la leptine. En effet, cette hormone est capable de potentialiser les effets de la CCK sur l'activation du nerf vague³⁴⁴. Or, on observe souvent en condition d'obésité une résistance à l'action de la leptine, ce qui pourrait donc contribuer à la diminution des effets de la CCK.

b) Ghréline

La ghréline est un peptide de 28 acides aminés isolé par Kojima *et al*³⁴⁵ en 1999. Il dérive d'un précurseur de 117 acides aminés nommé préproghréline, comportant une séquence signal de 24 acides aminés qui sera éliminée en premier, formant ainsi la proghréline. Par la suite, ce peptide de 94 acides aminés sera à nouveau clivé en ghréline et en un autre peptide de 66 acides aminés nommé C-ghréline³⁴⁶. Ce dernier servira notamment de précurseur à la formation de l'obestatine, un peptide aux effets opposés à ceux de la ghréline³⁴⁷ **(Figure 23)**.

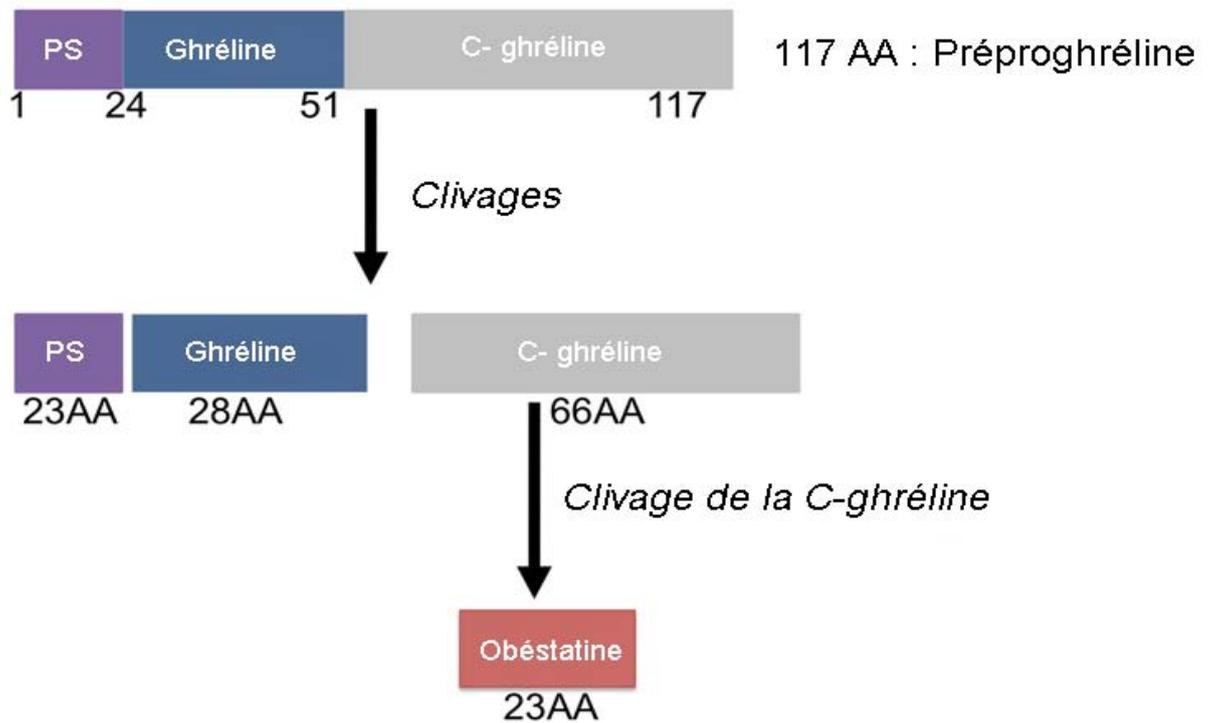


Figure 23 : Maturation de la ghréline (d'après Seim. 2011). Le précurseur de la ghréline va subir plusieurs clivages qui vont générer plusieurs peptides de tailles inférieures. La ghréline est ainsi formée après élimination du peptide signal. La partie C-terminale du précurseur formera la C-ghréline, qui sera à l'origine de la formation de l'obestatine.

Il existe 2 formes principales de ghréline. En effet, le peptide peut être acétylé au niveau d'un résidu sérine par une enzyme nommée GOAT (*Ghrelin-O-Acetyl Transferase*)³⁴⁸. Cette forme est la plus communément admise, bien que la forme non acétylée soit produite en quantité plus importante. Ceci est certainement en lien avec le fait que la forme non acétylée a longtemps été considérée comme inactive car incapable de se lier au même récepteur que la forme acétylée³⁴⁶. La ghréline (acétylée) a été identifiée comme étant le ligand endogène du récepteur sécrétagogue de l'hormone de croissance (*GHSR*), un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine G capable d'activer la phospholipase C³⁴⁵. Ce récepteur est fortement exprimé en périphérie et a été retrouvé notamment au niveau de l'intestin, du pancréas, du tissu adipeux et sur les afférences vagales au niveau gastro-intestinal^{349,350}. Il est également retrouvé au niveau central dans plusieurs noyaux de l'hypothalamus³⁵¹, particulièrement sur les neurones à NPY du noyau arqué³⁵². Toutefois, plusieurs pistes suggèrent aussi l'existence d'un ou plusieurs autre(s) récepteur(s) encore non identifié(s), notamment car des lignées cellulaires

dépourvues du récepteur « classique » GHSR répondent à un traitement à la ghréline³⁵³. Certains auteurs proposent, en effet, que cela soit la conséquence de la fixation de la forme non acétylée de la ghréline à un ou plusieurs récepteur(s) restant encore à déterminer³⁵⁴.

La ghréline est produite et sécrétée principalement par l'estomac et l'intestin³⁵⁵ et dans une moindre mesure par les cellules ϵ du pancréas³⁵⁶. Cette production est modulée par l'état énergétique de l'organisme. En effet, les taux circulants sont augmentés lorsque l'organisme manque d'énergie (jeûne, hypoglycémie ou encore cachexie). A l'inverse, ces taux sont diminués dans des conditions d'excès énergétique (comme après une prise alimentaire, une hyperglycémie et en condition d'obésité)³⁵⁷. Mc Cowen *et al*³⁵⁸ ont d'ailleurs mis en évidence un effet inhibiteur de l'insuline sur la production de ghréline. Les mécanismes précis impliqués dans ces régulations sont encore inconnus mais Williams *et al*³⁵⁹ ont toutefois montré une contribution des fibres efférentes du nerf vague dans la stimulation de la production de ghréline lors du jeûne.

Cette modulation de la production de ghréline en fonction de l'état énergétique global de l'organisme laissait donc penser à une implication de ce peptide dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Ainsi, plusieurs équipes ont montré que l'injection aiguë de ghréline, aussi bien en périphérie qu'au niveau central, entraîne une augmentation de la prise alimentaire chez le rongeur comme chez l'humain^{360,361}. De la même façon, l'injection périphérique chronique chez le rongeur mène à une hyperphagie, une augmentation du poids corporel et favorise l'adipogénèse³⁶². Ces observations montrent donc que la ghréline est capable d'agir au niveau hypothalamique afin d'induire un effet orexigène. Il s'agit d'ailleurs du seul peptide gastro-intestinal orexigène connu à ce jour.

Bien que la ghréline circulante puisse traverser la barrière hémato-encéphalique, ce passage a été montré comme étant très faible³⁶³, suggérant donc que ces effets sur l'hypothalamus s'établissent plutôt *via* une voie nerveuse. L'équipe de Date *et al*³⁵⁰ ont d'ailleurs observé une diminution de l'activité du nerf vague en réponse à la ghréline ainsi qu'une disparition de l'effet orexigène chez des rats vagotomisés. Dans une autre étude, la même équipe a montré que l'injection périphérique de ghréline augmentait la libération

de noradrénaline au sein du noyau arqué *via* un relais au sein du noyau du tractus solitaire³⁶⁴. Dans ce même noyau, Hewson *et al*³⁶⁵ ont également montré que l'injection périphérique de ghréline induisait l'expression du marqueur *c-Fos*. Ces données ont été complétées par Nakazato *et al*³⁶⁶ qui ont rapporté une augmentation de l'activité des neurones à NPY/AgRP. Ainsi, au même titre que la CCK évoquée précédemment, la ghréline produite au niveau intestinal est capable de modifier l'activité du nerf vague, ce qui va permettre la modification de l'activité de neurones hypothalamiques impliqués dans la régulation du comportement alimentaire.

Chez l'obèse, les taux de ghréline sont fortement réduits³⁶⁷. Cette observation est en accord avec le fait que les taux plasmatiques de ghréline soient corrélés négativement avec le poids corporel, l'insulinémie à jeun et la leptinémie³⁶⁸. En revanche, l'établissement d'une résistance à la ghréline dans des conditions d'obésité est encore sujet à controverses. En effet, Perreault *et al*³⁶⁹ ont rapporté que des souris rendues obèses par un régime hyperlipidique étaient moins sensibles à la ghréline que les souris saines tandis que Druce *et al*³⁷⁰ rapportent que l'injection périphérique de ghréline est toujours capable d'induire une prise alimentaire augmentée chez l'humain obèse. De nouvelles études doivent donc être menées afin de comprendre parfaitement d'éventuelles dérégulations touchant cette régulation nerveuse de la prise par la ghréline en condition d'obésité.

c) GLP-1

Comme nous l'avons évoqué auparavant, le GLP-1 est un peptide sécrété par les cellules endocrines de l'épithélium intestinal en réponse aux nutriments. Ce peptide passe dans la circulation sanguine et est responsable de l'établissement de l'effet incrétine *via* une stimulation directe de la production d'insuline par le pancréas associée à une augmentation de la sensibilité à l'insuline³⁷¹.

Une fois produit en réponse à l'arrivée de nutriments dans l'intestin, le GLP-1 *via* des relais situés dans l'intestin et la veine hépatoportale (évoquée dans la partie suivante) va pouvoir agir sur le système nerveux autonome afférent³⁷². De manière classique, le cerveau intègre alors ces informations en provenance

du tractus gastro-intestinal et module l'activité des tissus périphériques. De plus, certaines études montrent également que le récepteur au GLP-1 est nécessaire au niveau central afin de permettre l'établissement de l'effet insulino-trope de ce peptide puisque l'injection centrale d'un antagoniste de ce récepteur avant une charge intragastrique de glucose réduit fortement la sécrétion d'insuline⁷⁰. Cela suggère donc que le GLP-1 est sécrété également dans le cerveau en réponse à la détection de glucose au niveau intestinal.

Ainsi, le modèle suivant a été imaginé³⁷³ (**Figure 24**) : l'arrivée de nutriments est détectée par l'intestin qui libère alors plusieurs peptides gastro-intestinaux comme le GLP-1. Cela génère alors l'envoi d'un message nerveux afférent au cerveau. L'intégration de ce signal entérique par le tronc cérébral va engendrer l'envoi d'un message au niveau de l'hypothalamus avec notamment une production de GLP-1 directement au niveau hypothalamique. La modification de l'activité de certains neurones résultant de ce message va permettre la stimulation de la sécrétion d'insuline. En parallèle, un message d'origine inconnue sera également envoyé aux muscles en vue de les préparer à capter le glucose circulant. Cependant, lorsque le cerveau aura directement détecté l'arrivée du glucose dans la circulation sanguine, un nouveau message, opposé au premier, sera à nouveau envoyé aux muscles et entraînera une insulino-résistance musculaire transitoire. Ce mécanisme permet alors de rediriger le glucose vers le foie et de permettre sa mise en réserve sous forme de glycogène hépatique dans le but de préparer la période de jeûne entre deux repas.

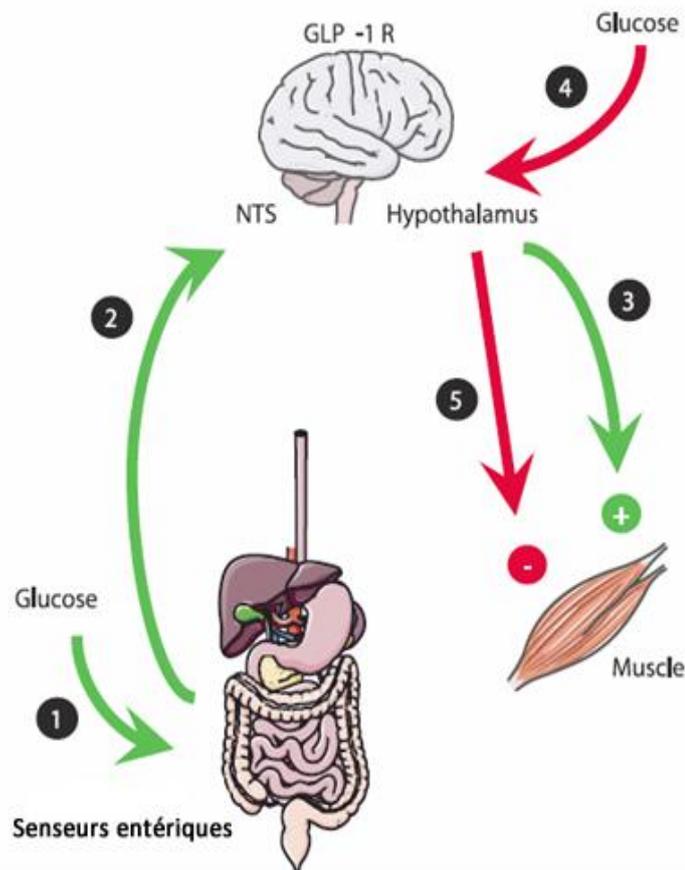


Figure 24 : Schéma des effets extrapancréatiques du GLP-1 (d'après Knauf. 2009). La détection de glucose au niveau entérique va entraîner l'élaboration d'un message nerveux entraînant la production de GLP-1 au niveau hypothalamique. Cette production de GLP-1 va entraîner l'élaboration d'un message nerveux à destination des muscles afin de les préparer à la captation du glucose. Lorsque le cerveau détecte lui-même directement les molécules de glucose, il élabore alors un second message antagoniste au précédent, générant alors une insulino-résistance transitoire permettant de privilégier la captation du glucose circulant par le foie.

B) Le foie

La veine hépatoportale est une veine conduisant le sang provenant des organes digestifs tels que l'intestin vers le foie. En 1984, Adachi *et al*³⁷⁴ avaient montré l'existence d'afférences nerveuses hépatiques sensibles au glucose en partie connectées avec des noyaux du tronc cérébral et de l'hypothalamus. Par la suite, En 1997, Hevener *et al*³⁷⁵ ont montré plus précisément l'existence d'un système de détection du glucose localisé dans cette veine. Ces données suggèrent donc un relais nerveux dans l'établissement des effets sous-jacents à la détection de glucose au niveau de la veine hépatoportale.

Ce mécanisme est sensible à un gradient de concentration de glucose entre la veine hépatoportale et l'artère hépatique et est capable de contrôler de nombreuses fonctions, notamment l'utilisation du glucose par le foie et le muscle squelettique. En effet, le transport du glucose est augmenté dans le foie lorsqu'un gradient de glucose est réalisé grâce à une perfusion différentielle de glucose^{376,377}. De plus, l'utilisation du glucose par les muscles est également contrôlée par le détecteur de la veine hépatoportale puisque, chez la souris, la perfusion d'un débit de glucose basal équivalent à la production hépatique de glucose induit une hypoglycémie *via* une augmentation de la clairance musculaire du glucose³⁷⁸. Par ailleurs, ce système a également été montré comme capable de diminuer la prise alimentaire³⁷⁹ et d'augmenter rapidement la sécrétion d'insuline³⁸⁰. Ainsi, l'ensemble de ces effets suggère que la détection de glucose au niveau de la veine hépatoportale par des cellules spécialisées pourrait servir, d'une part, à minimiser l'hyperglycémie post-prandiale et, d'autre part, à initier la fin du repas.

L'équipement moléculaire de ces cellules sensibles au glucose est encore peu connu. Cependant, Burcelin *et al*³⁸¹ ont montré que la présence du transporteur de glucose GLUT2 était indispensable. Par ailleurs, la même équipe a également montré un rôle majeur du récepteur du GLP-1 puisque le blocage de ce récepteur, ou son invalidation génétique, suffissent à supprimer les capacités de détection du glucose de la veine hépatoportale³⁸². Il existe une corrélation entre l'activation du système de détection portal et l'activité de certains neurones glucosensibles au sein de l'hypothalamus latéral³⁸³. Cela suggère donc que l'arrivée de glucose au sein de la veine hépatoportale va activer une voie nerveuse afférente dont les informations seront intégrées au niveau de l'hypothalamus. Les effets observés par la suite sur l'utilisation du glucose dans le foie et le muscle, ainsi que l'augmentation de la sécrétion d'insuline seraient donc la conséquence d'un influx nerveux généré par l'hypothalamus en réponse aux informations afférentes. Dans ce sens, une dénervation sympathique efférente localisée au niveau du foie permet d'ailleurs d'empêcher l'augmentation de l'utilisation en réponse à une injection portale de glucose³⁸⁴.

C) Le pancréas

1) Insuline

Comme cela a été évoqué précédemment, l'insuline est produite et sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans en réponse au glucose. L'idée que l'insuline circulante puisse agir au niveau de l'hypothalamus est supportée par plusieurs études qui ont, d'une part, montré que cette hormone était capable de franchir la barrière hémato-encéphalique³⁸⁵ et, d'autre part, que le récepteur à l'insuline était fortement exprimé au sein du système nerveux central, et particulièrement dans l'hypothalamus³⁸⁶. Ces observations suggèrent donc que l'insuline pourrait agir au niveau hypothalamique pour contribuer au maintien de l'homéostasie énergétique.

Plusieurs équipes se sont donc fixer comme objectif d'étudier les effets métaboliques d'une injection centrale d'insuline. En 2008, un travail de Koch *et al*³⁸⁷ utilisant deux modèles de souris avec une inactivation inducible des récepteurs à l'insuline (une totale et une restreinte aux tissus périphériques) a montré que les animaux ayant notamment perdu les récepteurs à l'insuline au niveau central présentaient une hyperglycémie à jeun et une réduction de la masse grasse plus prononcée que chez les animaux n'ayant perdu les récepteurs à l'insuline qu'au niveau périphérique. Ce résultat est donc le signe que les effets centraux de l'insuline sur le contrôle de l'homéostasie glucidique sont extrêmement importants. D'autres travaux ont d'ailleurs rapporté que la perte des récepteurs à l'insuline uniquement au niveau hypothalamique chez le rat suffisait à déclencher une hyperphagie et également l'établissement d'une insulino-résistance périphérique³⁸⁸. Cette observation de modulation de la prise alimentaire est donc en accord avec les travaux de Pritchard *et al*¹⁴⁵ qui montrent que l'injection intrapéritonéale d'insuline à des rats augmente l'expression du neuropeptide anorexigène POMC dans le noyau arqué, et avec ceux de Schwartz *et al*³⁸⁹ rapportant une diminution très importante de l'expression du NPY en réponse à l'injection centrale d'insuline. Par ailleurs, Spanswick *et al*²¹² avaient rapporté que l'insuline était capable d'hyperpolariser certains neurones glucosensibles chez les rats sains, mais pas chez les rats

obèses, expliquant donc en partie les perturbations de la prise alimentaires associées à l'obésité.

Dans le même temps, d'autres équipes ont montré une augmentation du stockage du glucose sous forme de glycogène dans le muscle squelettique¹⁷⁵ ainsi qu'une augmentation périphérique de la sensibilité à l'insuline associée à une diminution de la production hépatique de glucose³⁹⁰. Par ailleurs, il a également été mis en évidence une augmentation localisée de l'activité du système nerveux sympathique en réponse à l'injection icv d'insuline³⁹¹. Enfin, en 2005, Poci *et al*³⁹² ont montré que l'ouverture des canaux K⁺ de certains neurones en réponse à l'insuline entraîne une activation du nerf vague responsable de l'inhibition de la production hépatique de glucose.

Les acteurs moléculaires impliqués dans ces effets centraux de l'insuline n'avaient pas été étudiés jusqu'à récemment. En 2007, Cabou *et al*¹⁹⁷ ont montré une implication du NO dans la mise en place de ces effets. En effet, chez des souris présentant une hyperinsulinémie systémique (comme cela est le cas après une prise alimentaire), la phosphorylation de la eNOS hypothalamique est significativement augmentée, signe d'une augmentation de l'activité de cette enzyme et donc de production de NO. Les effets centraux de l'insuline ne sont d'ailleurs pas retrouvés chez des souris invalidées pour le gène de la eNOS.

Ainsi, le NO semble être un acteur majeur de la mise en place des effets centraux de l'insuline et cela pourrait contribuer à la mise en place de l'insulinorésistance chez les animaux obèses. En effet, on retrouve une diminution de l'activation de la eNOS chez les souris diabétiques¹⁹⁷. Par ailleurs, il existe également une activation endogène de la protéine kinase C au cours du diabète dans l'hypothalamus de souris. Cette activation pourrait contribuer à altérer la voie de signalisation de l'insuline et altérerait donc la production finale de NO par la eNOS³⁹³.

2) Glucagon

A l'inverse de l'insuline, le glucagon exerce peu d'effets au niveau central. Cela est peut être la conséquence de la présence de GLP-1 et de son récepteur à ce

niveau, le GLP-1 étant dérivé du même précurseur que le glucagon. Ainsi, le glucagon n'exerce qu'un seul effet central, indirect, et relayé par le foie. Le glucagon est rapidement sécrété en réponse à une prise alimentaire³⁹⁴. Cette sécrétion entraîne une forte augmentation de la concentration en glucagon au niveau de la veine porte³⁹⁵ mais pas au niveau systémique³⁹⁶. Cela suggère donc effectivement que le foie soit la cible de l'action du glucagon au cours de ce phénomène.

Ainsi, au niveau hépatique, le glucagon participe à l'établissement d'un effet satiétogène. En effet, l'équipe de Geary *et al*³⁹⁷ ont montré en 1993 que l'injection portale de glucagon à des rats entraîne une diminution de la prise alimentaire. Dans la même étude, une vagotomie hépatique prévient cet effet, suggérant donc l'implication du nerf vague. Toutefois, à l'heure actuelle, la voie de transduction par laquelle le glucagon est capable de générer un message vagal afférent reste inconnue. Certaines données laissent plutôt penser à un mécanisme indirect, et notamment l'absence de récepteurs au glucagon sur les projections hépatiques du nerf vague.

D) Le tissu adipeux

Depuis plusieurs années, un grand nombre d'études montrent que les adipocytes sont des cellules douées d'une très importante activité sécrétoire. Nommées adipokines, ces sécrétions sont libérées dans la circulation sanguine et exercent un grand nombre d'effets. Parmi ceux-ci, un des plus importants est leur implication dans la régulation de l'homéostasie énergétique, *via* des effets périphériques et des effets centraux. Au cours de cette partie, nous évoquerons principalement les effets centraux des adipokines les plus importantes.

1) Leptine

Le gène codant la leptine a pu être isolé en 1994³⁹⁸. Partant de l'observation qu'une mutation sur le gène *Ob* de la souris résultait en l'apparition d'une obésité massive souvent associée à un diabète de type II, ceux-ci ont imaginé que le produit de ce gène pouvait être impliqué dans certaines régulations métaboliques. La leptine est une protéine de 167 acides aminés présente dans de nombreuses espèces animales, où elle est très conservée (80% d'homologie

entre humain, souris et rat)³⁹⁸. Sa production est majoritairement assurée par le tissu adipeux et peut être régulée par de nombreux facteurs tels que l'insuline³⁹⁹ et le TNF- α ⁴⁰⁰. Toutefois, l'ARNm de la leptine a été également retrouvé dans le placenta, l'intestin, le foie, le muscle squelettique et le cerveau mais à des niveaux d'expression beaucoup plus faibles⁴⁰¹, ceci suggérant une grande diversité dans les fonctions de la leptine.

Le gène *Db* du récepteur de la leptine (Ob-R) a été cloné en 1995⁴⁰². Il code pour un récepteur appartenant à la famille des récepteurs aux cytokines de classe I. Le produit de ce gène peut subir différents épissages, ce qui permet l'existence de 6 variants de ce récepteur^{403,404} qui diffèrent par la taille de leur chaîne intracellulaire. Ainsi, parmi les deux variants majoritairement exprimés Ob-Ra et Ob-Rb, on distingue un récepteur avec un domaine intracellulaire conséquent (Ob-Rb) et un récepteur tronqué au niveau intracellulaire, plus court (Ob-Ra). Ce dernier est notamment fortement exprimé dans les microvaisseaux des plexus choroïdes⁴⁰⁵. Du fait de la taille réduite de son domaine intracellulaire l'empêchant de permettre une transduction du signal correcte, certaines pistes évoquent le fait qu'il jouerait un rôle dans le transport de la leptine circulante périphérique vers le compartiment central⁴⁰⁶. Le récepteur Ob-Rb quant à lui est capable d'assurer la transduction du signal quand la leptine se fixe sur son domaine récepteur de l'hormone. Il est principalement exprimé au niveau du noyau arqué, du noyau ventromédian et du noyau dorsomédian^{407,408}. Plus précisément, les types neuronaux exprimant cette forme du récepteur sont les neurones impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et exprimant les neuropeptides NPY/AgRP⁴⁰⁹ et POMC/CART⁴¹⁰.

Brièvement, la liaison de la leptine au domaine extracellulaire de son récepteur va permettre le recrutement intracellulaire de la tyrosine kinase JAK2, qui permettra la phosphorylation de plusieurs tyrosines au niveau du domaine intracellulaire du récepteur : Tyr⁹⁸⁵, Tyr¹⁰⁷⁷ et Tyr¹¹³⁸. La phosphorylation sur cette dernière tyrosine permet l'activation par phosphorylation et la translocation nucléaire du facteur de transcription STAT3⁴¹¹. Ce facteur permettra notamment l'expression de la protéine SOCS3 (*Suppressor of cytokine signaling 3*), jouant un rôle dans la fin du signal induit par la leptine en inhibant JAK2 (*Janus Kinase 2*). La phosphorylation sur la Tyr⁹⁸⁵ permet d'ailleurs

d'améliorer cette interaction SOCS3/JAK2 et contribue donc à la fin du signal. Enfin, la phosphorylation sur Tyr¹⁰⁷⁷ permet le recrutement d'un autre facteur de transcription, STAT5, qui régulera ensuite l'expression de ses gènes cibles ⁴¹² (Figure 25).

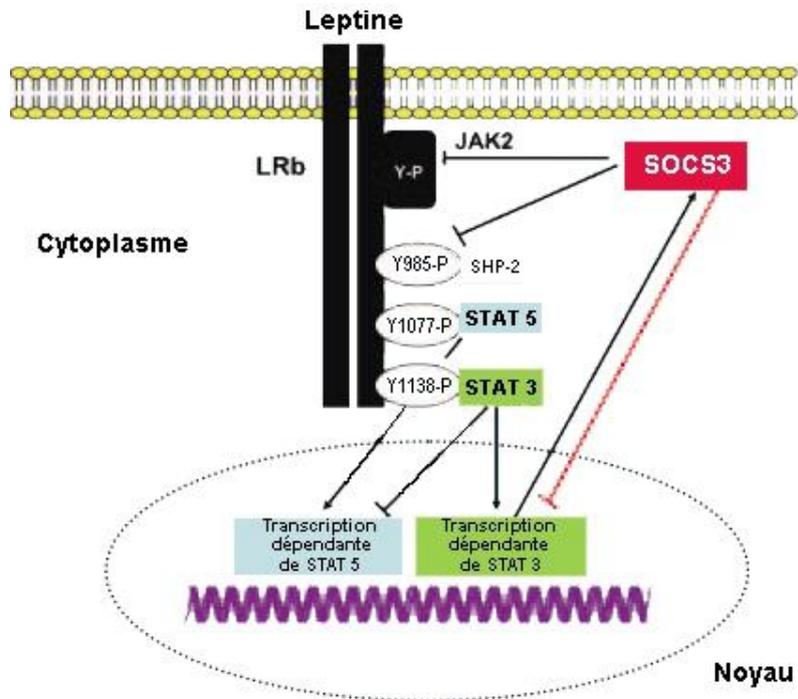


Figure 25 : Voie de signalisation de la leptine (D'après Ahima. 2008). La fixation de la leptine à son récepteur active la kinase JAK2 qui va phosphoryler plusieurs tyrosines sur le domaine intracellulaire du récepteur. Cela permettra le recrutement et l'activation de facteurs de transcriptions de la famille STAT qui réguleront l'expression des gènes cibles. La fin du signal est permise par la protéine SOCS3 qui déphosphoryle JAK2.

Toutefois, les mécanismes précis de la voie de signalisation de la leptine au niveau hypothalamique restent encore discutés. En effet, une étude s'intéressant aux changements moléculaires hypothalamiques suite à une injection icv de leptine *in vivo* chez le rat n'a pas retrouvé d'activation de STAT5 ni de phosphorylation d'aucun membre de la famille des JAKs ⁴¹³. A l'inverse, d'autres études considèrent que la voie de signalisation « classique » de la leptine s'établit également dans l'hypothalamus et montrent même que la délétion de STAT5 dans l'hypothalamus mène à une hyperphagie et une obésité ⁴¹⁴. En revanche, l'implication et l'importance de STAT3 dans la mise en place des effets centraux de la leptine n'est, elle, pas soumise à controverse. La suppression et/ou l'invalidation de ce facteur de transcription au niveau hypothalamique mène également à une hyperphagie et une obésité ^{415,416}.

Toutefois, les altérations métaboliques observées lors de ces manipulations génétiques sont moins sévères que chez les animaux *Db/Db*, invalidées pour le gène du récepteur à la leptine, suggérant l'existence de voies additionnelles. Ainsi, plusieurs équipes ont également impliqué la voie PI3K⁴¹⁷ et la voie des MAP kinases⁴¹⁸. La fin de la signalisation est permise par SOCS3 qui inhibe les protéines de la famille JAK et de la famille STAT. La phosphatase PTP-1B est également un régulateur négatif de la signalisation de la leptine, aussi bien au niveau central qu'au niveau périphérique^{419,420}, qui agit en inhibant JAK2.

Au niveau hypothalamique, la leptine a été surtout décrite comme impliquée dans la balance énergétique et dans le comportement alimentaire pour son effet anorexigène. En effet, les souris *Ob/Ob*, invalidées pour le gène de la leptine et les souris *Db/Db*, sont caractérisées par une hyperphagie, une diminution de la dépense énergétique menant à une obésité massive. L'équipe de Ring *et al*⁴²¹ a montré que la perte de la leptine uniquement au niveau hypothalamique entraînait également l'établissement d'une obésité. Toutefois, cette obésité est moins importante que celle observée chez les animaux *Db/Db* malgré une prise alimentaire identique. A l'inverse, l'injection centrale de leptine chez la souris normale induit une diminution de la prise alimentaire ainsi qu'une augmentation de la dépense énergétique⁴²². La leptine est produite par le tissu adipeux de façon proportionnelle à l'importance de la taille de ce dernier⁴²³, et est sécrétée dans la circulation sanguine. Cette adipokine va ensuite atteindre l'hypothalamus et jouer le rôle de « signal d'adiposité », c'est-à-dire qu'elle va permettre de signaler au système nerveux central l'état des réserves adipeuses de l'organisme. Ce dernier modulera alors le comportement alimentaire et la dépense énergétique en fonction de l'intensité du signal. Plus précisément, la leptine va se lier à ses récepteurs au niveau du noyau arqué et diminuer l'activité des neurones orexigènes (NPY/AgRP) et, à l'inverse, stimuler celle des neurones anorexigènes (POMC/CART). L'équipe de Cota *et al*¹⁸³ a impliqué la protéine mTOR dans cet effet, du fait de sa colocalisation avec les neuropeptides NPY et POMC et de l'augmentation de son activité suite à une injection centrale de leptine. De plus, le fait d'augmenter pharmacologiquement l'activité de mTOR au niveau hypothalamique diminue la prise alimentaire et le

poids corporel des animaux traités. A l'inverse, le blocage de cette protéine entraîne la perte des effets anorexigènes de la leptine.

La leptine centrale va également pouvoir modifier l'activité de certains organes périphériques *via* la modification de l'activité de certaines branches du système nerveux autonome ⁴²⁴. Ainsi, la leptine injectée en icv chez la souris entraîne une augmentation de l'utilisation du glucose en périphérie dans plusieurs organes tels que le muscle squelettique, et le tissu adipeux et ce, sans modification des taux circulants d'insuline ⁴²⁵. Par ailleurs, German *et al* ⁴²⁶ ont également montré en 2009 que la leptine présente au niveau hypothalamique était capable d'augmenter la sensibilité à l'insuline du foie par l'intermédiaire du nerf vague. Très récemment, la même équipe a montré que l'injection centrale de leptine à des rats rendus diabétiques par un traitement à la streptozotocine permettait de diminuer la glycémie de ces animaux par un mécanisme, encore inconnu, indépendant des effets de la leptine sur la prise alimentaire, l'insuline ou le transport de glucose ⁴²⁷.

L'obésité est caractérisée par des niveaux plasmatiques de leptine élevés. Ainsi, ces forts taux devraient normalement exercer leurs effets bénéfiques sur le métabolisme glucidique. Pourtant, les animaux rendus obèses en étant nourris avec un régime hyperlipidique développent des perturbations de l'homéostasie glucidique. Cela laisse donc penser à l'établissement d'un phénomène de résistance à la leptine en condition d'obésité. Cette hypothèse a été confirmée en 1998 suite à un traitement à la leptine chez des souris saines et obèses et à l'évaluation de la sensibilité de chaque groupe d'animaux au traitement ⁴²⁸. La cause et les mécanismes de mise en place de ce phénomène de résistance à la leptine ne sont pas encore totalement connus mais plusieurs pistes ont déjà été largement explorées. Ainsi, il a été montré un défaut dans le transport de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique en condition d'obésité, où les animaux obèses présentent une diminution de 2/3 du transport de la leptine vers le compartiment central par rapport aux animaux sains ⁴²⁹. Cette observation est en accord avec la diminution du ratio leptine centrale / leptine plasmatique en condition d'obésité ⁴³⁰. Associé également à la diminution du transport de la leptine vers ses cibles hypothalamiques, le récepteur à chaîne longue capable d'induire une transduction du signal, Ob-Rb,

est moins exprimé au niveau central chez les obèses⁴³¹. Enfin, au niveau de la voie de signalisation, il a également été rapporté une suractivation des protéines SOCS-3 et PTP-1B impliquées, comme nous l'avons vu auparavant, dans la fin du signal de la leptine⁴³².

2) Adiponectine

L'adiponectine est une protéine de 244 acides aminés codée par le gène APM1 (*Adipose Most Important Transcript 1*). Sa découverte en 1995 est le fruit du travail de Scherer *et al*⁴³³, qui ont d'ailleurs immédiatement suspecté une implication de cette adipokine dans l'homéostasie glucidique en raison de la modulation de son expression par l'insuline. De façon intéressante, l'adiponectine est la seule adipokine dont les taux soient corrélés négativement à l'IMC (*Indice de masse corporelle*) et positivement avec la sensibilité à l'insuline⁴³⁴. Cette protéine est exprimée en très grande quantité par l'adipocyte en conditions physiologiques. Le niveau d'expression est toutefois différent selon le tissu adipeux étudié puisqu'il est 30% plus faible dans le tissu adipeux viscéral que dans le tissu adipeux sous-cutané⁴³⁵. L'adiponectine peut également être produite lors de certaines situations pathologiques par le foie⁴³⁶.

L'adiponectine possède 2 récepteurs, nommés AdipoR1 et AdipoR2, partageant 68% d'homologie. Ceux-ci présentent 7 domaines transmembranaires mais sont structurellement et fonctionnellement différents des récepteurs couplés aux protéines G. On retrouve ces récepteurs au niveau du tissu adipeux, du foie, du cœur, du muscle squelettique et du pancréas⁴³⁷. Les 2 récepteurs sont également exprimés dans l'hypothalamus⁴³⁸, principalement au niveau des neurones à POMC et NPY du noyau arqué⁴³⁹, des neurones à ocytocine du noyau paraventriculaire⁴⁴⁰ et au niveau de l'hypothalamus latéral⁴⁴¹. Une autre équipe a également montré chez la souris une expression de ces récepteurs, plus importante pour AdipoR1, au niveau des neurones corticaux⁴⁴². Cette large distribution des récepteurs au niveau central, ainsi que la présence de l'adiponectine dans le liquide cébrospinal laissent fortement penser que l'adiponectine circulante est capable d'agir au niveau central pour réguler plusieurs fonctions importantes de l'homéostasie énergétique.

Plusieurs études se sont intéressées à l'étude des effets d'une injection icv d'adiponectine sur cette régulation et beaucoup de résultats restent contradictoires ⁴⁴³. De façon générale, l'adiponectine injectée au niveau de l'hypothalamus semble capable de diminuer la prise alimentaire de près de 40% chez le rat (effet médié uniquement par le récepteur AdipoR1) ⁴⁴⁴ et de diminuer le poids corporel *via* une augmentation de la dépense énergétique chez la souris ⁴⁴⁵. Les voies de signalisation impliquées dans ces effets centraux de l'adiponectine restent encore largement à étudier. Certaines études impliquent la corticolibérine, agent anorexigène et thermogénique, dont l'expression et la libération sont augmentées par l'adiponectine au niveau du noyau paraventriculaire ⁴⁴⁶. Une autre voie potentiellement impliquée dans la mise en place de ces effets est le système mélanocortine, puisque les souris Agouti, ne répondent pas à l'adiponectine ⁴⁴⁵. A l'inverse, d'autres travaux montrent une augmentation de l'activité de l'AMPK induite par l'adiponectine au niveau du noyau arqué, ce qui tendrait donc à augmenter la prise alimentaire ⁴⁴⁷. Ces observations quelquefois antagonistes pourraient être expliquées par un croisement de plusieurs voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique. En effet, la fixation de l'adiponectine à ses récepteurs entraîne au niveau intracellulaire le recrutement de la protéine adaptatrice APPL1 (*Adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1*) ⁴⁴⁸ qui possède la capacité d'activer la voie de l'AMPK et également la voie de signalisation de l'insuline ainsi que celle de la leptine. Récemment, l'équipe de Park *et al* ⁴⁴⁹ a montré que l'injection icv chronique d'adiponectine chez le rat modulait de façon importante le métabolisme glucidique. En effet, ce traitement permettait, d'une part, d'augmenter la survie et le nombre de cellules β pancréatiques et, d'autre part, d'augmenter la dépense énergétique, d'améliorer la sensibilité à l'insuline et de diminuer la production hépatique de glucose.

3) Apeline

a) Généralités

La découverte de l'apeline est le fruit du travail de l'équipe de Tatemoto *et al* ⁴⁵⁰ en 1998. A l'origine, le travail visait à identifier le ligand endogène du récepteur

APJ, un récepteur orphelin à 7 domaines transmembranaires. Ce récepteur avait été découvert en 1993 par O'Dowd *et al*⁴⁵¹, alors à la recherche d'un homologue du récepteur à la vasopressine.

- *Le récepteur APJ*

Localisé sur la bande q12 du chromosome 11 humain, APJ possède 380 acides aminés et sa structure possède une forte homologie avec celle du récepteur à l'angiotensine (sans toutefois pouvoir se lier à celle-ci). Il s'agit d'un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine G_{i/o}. Il a pu être identifié chez un grand nombre d'espèces animales telles que l'humain, le rat, la souris, la vache, le macaque et le xénope⁴⁵². Pour chacune de ces espèces, on retrouve une forte homologie de séquence avec celle du récepteur humain, signe qu'il s'agit probablement d'un système fortement conservé au cours de l'évolution. A titre d'exemple, le récepteur APJ murin comprend 377 acides aminés et une homologie de séquence de 92% avec la version humaine de ce récepteur⁴⁵³.

L'ARN messager d'APJ a été détecté dans de nombreux tissus⁴⁵⁴. Ainsi, chez le rat, on le retrouve exprimé dans de nombreuses zones du système nerveux central, et notamment dans l'hypothalamus, au sein des neurones magnocellulaires vasopressinergiques et ocytocinergiques du noyau paraventriculaire et du noyau supra-optique, ainsi que dans le noyau arqué. Il est également retrouvé dans le cortex, le thalamus et le mésencéphale⁴⁵⁵. En périphérie, l'ARN messager d'APJ est présent dans un large panel de tissus, mais en quantité fortement variables selon les organes, que ce soit chez le rat ou chez l'humain. Le poumon, le cœur, la thyroïde et le tissu adipeux sont ceux exprimant le plus fortement ce récepteur. Des taux plus modérés ont été mesurés au niveau du rein, de l'intestin, du pancréas, de la rate, du muscle squelettique et du foie⁴⁵⁶.

- *Structure, distribution et régulation de la production de l'apeline*

Ligand endogène de ce récepteur APJ, l'apeline (pour **APJ** endogenous ligand) est un peptide de 36 acides aminés⁴⁵⁰. Il dérive d'un précurseur de 77 acides aminés, nommé préproapeline. Ce précurseur existe sous la forme d'un dimère

dont les liaisons sont assurées par la présence de ponts disulfures. Riche en acides aminés basiques, cela le rend fortement susceptible d'être clivé par des endopeptidases. Un clivage au niveau de l'acide aminé 22 va générer la proapeline, peptide de 55 acides aminés. D'autres clivages ultérieurs sur l'ensemble de ce peptide vont amener à la production de peptides d'apeline de différentes tailles (**Figure 26**). Ainsi, on connaît l'apeline 36, l'apeline 17, l'apeline 13 ou encore l'apeline 12. Chacun de ces peptides est capable de se lier à APJ, mais avec une affinité et des capacités d'induction de signal différentes ⁴⁵⁷. Ainsi, à titre de comparaison, l'apeline 13 est 8 fois plus puissante que l'apeline 17, et 60 fois plus puissante que l'apeline 36 ⁴⁵⁰.

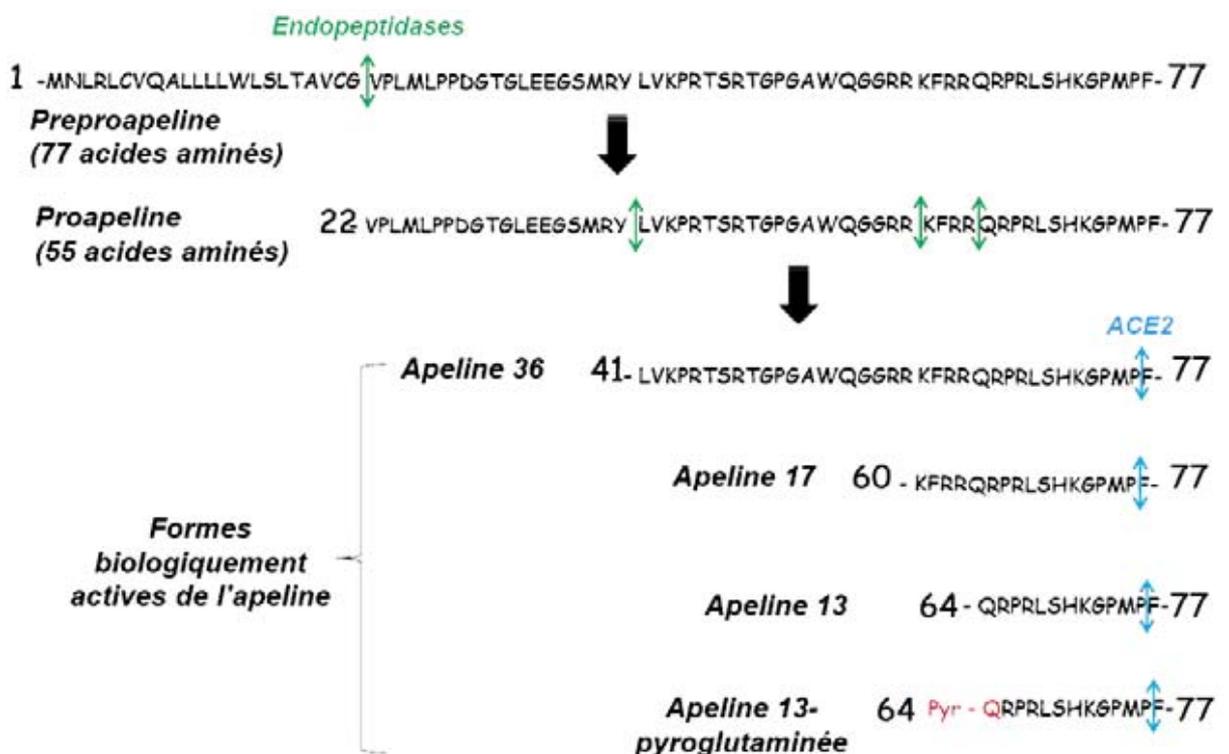


Figure 26: Maturation de l'apeline. La préproapeline est clivée en proapeline par des endopeptidase au niveau de sites riches en acides-aminés basiques (flèche verte). La proapeline est ensuite clivée en différentes formes d'apeline biologiquement actives. Parmi celles-ci, l'apeline 13 peut être modifiée post-traductionnellement par la transformation de la glutamine en position N-terminale en pyroglutamine (apeline 13-pyroglutaminée : notée en rouge sur le schéma). Enfin, les différentes formes actives d'apeline peuvent être inactivées par le clivage de la phénylalanine C-terminale par l'ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2).

Plusieurs équipes ont entrepris d'étudier la distribution tissulaire de l'apeline dans des tissus centraux et périphériques (**Figure 27**) d'humains et de rats ^{455,457}. Celle-ci a été, au même titre que son récepteur, retrouvée exprimée dans un grand nombre de tissus. Au niveau central, des neurones apelinergiques

sont présents dans l'hypothalamus (principalement le noyau arqué, le noyau supraoptique et le noyau paraventriculaire), le noyau caudé, le thalamus, le mésencéphale et l'hypophyse. Des études de double marquage en immunofluorescence ont montré que l'apeline était localisée dans les mêmes neurones hypothalamiques que la vasopressine⁴⁵⁸ et l'ocytocine^{459,460}. Plus récemment, l'apeline a également été identifiée comme colocalisée au sein du noyau arqué avec les neurones à POMC⁴⁶¹. En périphérie, elle est exprimée au niveau de la rate, de l'intestin, du pancréas, du rein, des gonades, du cœur, du poumon et du tissu adipeux blanc⁴⁵⁷. Boucher *et al*⁴⁶² ont également montré que l'apeline était non seulement produite, mais aussi sécrétée par le tissu adipeux, faisant d'elle une nouvelle adipokine.

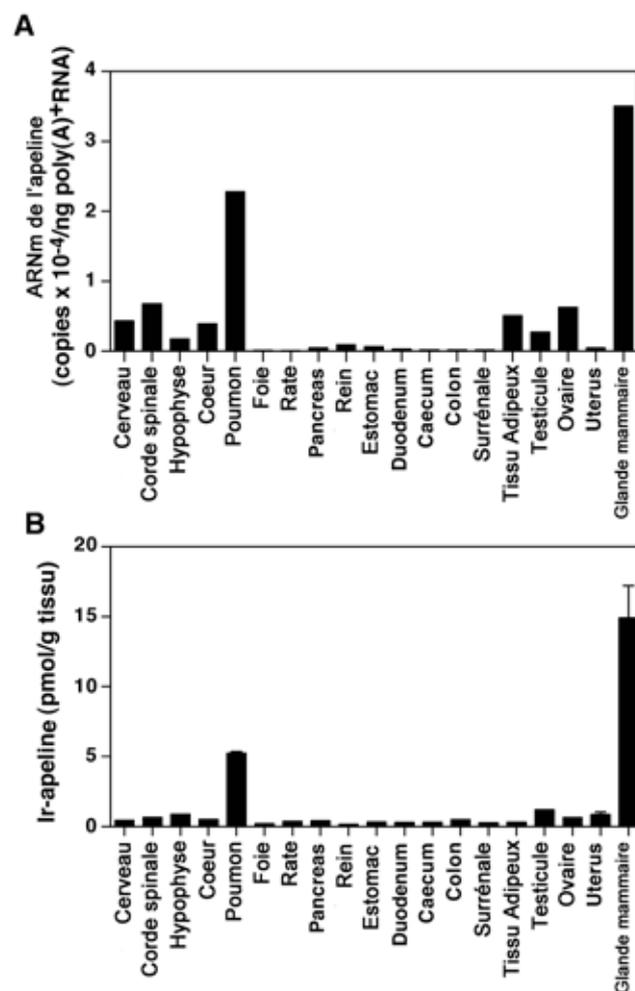


Figure 27: Distribution tissulaire de l'ARNm et du peptide de l'apeline (D'après Kawamata. 2001). A) L'ARNm de l'apeline est distribué dans de nombreux tissus parmi lesquels le système nerveux central, le cœur, le poumon, la glande mammaire et le tissu adipeux. B) Le peptide de l'apeline est surtout retrouvé dans les poumons et dans la glande mammaire

La production d'apeline par l'adipocyte est régulée par plusieurs facteurs. Elle est notamment étroitement associée aux taux d'insuline. En effet, toujours dans les travaux menés par Boucher *et al*⁴⁶², il a été montré sur des adipocytes isolés d'humains et de souris que l'insuline permettait d'augmenter l'expression de l'apeline. Cet effet passe par la stimulation de la PI3K, de la PKC et des MAP kinases. Des travaux menés par la suite sur des explants de tissu adipeux humains ont également montré que le TNF- α est également un facteur permettant d'augmenter cette expression. Les voies de signalisation impliquées sont les mêmes, à l'exception de la PKC⁴⁶³. De plus, une étude a récemment pu montrer une augmentation de la production d'apeline induite par d'autres facteurs inflammatoires tels que le LPS et l'IL-1⁴⁶⁴. Enfin, le facteur de transcription PGC-1 α est également capable d'augmenter l'expression de cette adipokine⁴⁶⁵.

- *Voies de signalisation activées par l'apeline*

Comme nous l'avons vu précédemment, le récepteur APJ est couplé à une protéine G_{i/o}. Ce couplage est décrit comme pouvant activer la voie de kinases nommées ERK (extracellular signal-regulated kinase) appartenant à la voie des MAPKs. Plus précisément, l'apeline est capable d'activer par phosphorylation les protéines p42 et p44 appartenant à cette famille. L'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique démontre que cette activation est médiée par la PKC⁴⁶⁶. L'activation de la PKC par l'apeline a d'ailleurs été rapportée par d'autres travaux simultanés. En effet, en étudiant les effets de l'apeline sur la contraction cardiaque, Szokodi *et al*⁴⁶⁷ ont caractérisé cette protéine comme étant un activateur de la PKC et également de la PLC (*Phospholipase C*).

L'apeline est également capable d'activer la p70-S6K. En effet, Masri *et al*⁴⁶⁸ ont pu montrer que l'apeline provoquait la phosphorylation rapide et maintenue dans le temps de cette kinase au niveau de 2 résidus thréonine et d'un résidu sérine. La p70S6K est une serine/thréonine kinase activée par la voie PI3K⁴⁶⁹ qui joue un rôle dans le contrôle de la synthèse protéique et dans la croissance et la prolifération cellulaire. Cette kinase est notamment présente au sein du système nerveux central⁴⁷⁰ où elle peut, nous l'avons vu, interagir avec la

protéine mTOR et avoir ainsi un rôle potentiel dans la régulation de l'homéostasie énergétique ¹⁸⁷.

Enfin, des travaux menés *in vitro* et *in vivo* ont établi que l'apeline pouvait aussi activer des protéines largement impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique telles que la protéine Akt, l'AMPK, et la eNOS ^{471,472,473}.

- *Phénotype des souris invalidées pour le gène de l'apeline*

La large distribution tissulaire de l'apeline ainsi que la multitude de voies de signalisation qu'elle est capable d'activer ont rapidement suggéré son implication dans un nombre conséquent de mécanismes physiologiques. Le développement de souris invalidées pour le gène de l'apeline ⁴⁷⁴ et l'étude complète du phénotype de ces animaux ont apporté de nouvelles données dans la compréhension de ces régulations.

Les souris invalidées pour le gène de l'apeline présentent un phénotype altéré par rapport aux souris normales principalement en ce qui concerne le système cardiovasculaire, les phénomènes angiogéniques et les paramètres métaboliques. En effet, ces animaux transgéniques développent en vieillissant une diminution de la contractilité cardiaque, aboutissant au final à une insuffisance cardiaque sévère ⁴⁷⁴. Par ailleurs, ces animaux présentent également un retard dans la vascularisation de la rétine ⁴⁷⁵ et également une réponse diminuée à certains facteurs angiogéniques tels que le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et le FGF (*Fibroblast Growth Factor*) ⁴⁷⁶. Récemment, l'apeline a également été proposée comme agent neuroprotecteur concernant le développement de la sclérose amyotrophique latérale puisque cette pathologie progresse plus rapidement chez les souris n'exprimant pas l'apeline ⁴⁷⁷. Concernant les modifications métaboliques survenant chez ces animaux, les travaux de Yue *et al* ⁴⁷³ ont mis en évidence l'apparition d'une insulino-résistance, d'une hyperinsulinémie et d'une diminution du transport de glucose au sein du muscle squelettique.

b) Rôle physiologique de l'apeline périphérique sur le métabolisme glucidique

Les travaux de Yue *et al* ⁴⁷³, l'identification de l'apeline en tant qu'adipokine, tout comme l'augmentation de son expression en présence d'insuline, par Boucher

*et al*⁴⁶² en 2005 a permis d'envisager un rôle de ce peptide au sein du métabolisme énergétique. Cette idée est renforcée par les travaux de Sorhede Winzell *et al*⁴⁷⁸ qui montrent d'une part que le récepteur APJ est présent au niveau du pancréas et, d'autre part, que l'injection d'apeline 36 par voie veineuse entraîne une diminution de la sécrétion d'insuline au cours d'un test de tolérance au glucose chez des souris saines et chez des souris obèses. Dans la même étude, des îlots pancréatiques isolés traités à l'apeline voient leur production d'insuline significativement diminuée en réponse à une concentration élevée de glucose⁴⁷⁸, suggérant donc un effet direct de l'apeline sur ces îlots.

L'étude de l'implication de l'apeline dans la régulation de l'homéostasie énergétique est une des thématiques principales de notre laboratoire. Ainsi, en 2008, l'équipe a pu montrer qu'une injection intraveineuse d'apeline exerçait un effet bénéfique en diminuant la glycémie, augmentant la tolérance au glucose et augmentant le transport et l'utilisation du glucose au niveau du muscle squelettique et du tissu adipeux⁴⁷¹. Cet effet, impliquant l'AMPK et la eNOS, est retrouvé à la fois chez les animaux sains et les animaux obèses et diabétiques, faisant donc de l'apeline une cible pharmacologique de choix dans l'élaboration de traitements anti-diabétiques.

c) Rôle physiologique de l'apeline au niveau central

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'apeline et son récepteur APJ sont largement exprimés au sein de l'hypothalamus, et particulièrement dans le noyau arqué et le noyau paraventriculaire qui sont des zones fortement impliquées dans l'homéostasie énergétique et la régulation hydrominérale. Partant de ces observations, plusieurs études se sont donc consacrées à étudier les effets de l'apeline sur ces régulations.

- *Prise hydrique et régulation des fluides corporels*

L'ensemble des structures nerveuses impliquées dans la régulation hydrominérale convergent essentiellement vers le noyau paraventriculaire et le noyau supraoptique. Dans ces 2 noyaux hypothalamiques, l'apeline et son récepteur APJ sont très fortement exprimés et sont, de plus, tous les 2 présents

au niveau des neurones vasopressinergiques. De plus, les souris invalidées pour le récepteur APJ présentent une diminution de la prise hydrique ainsi que des taux de vasopressine augmentés ^{479,480}. La vasopressine étant une hormone antidiurétique, ces données pouvaient laisser penser à une éventuelle implication de l'apeline dans la régulation de la libération de vasopressine, voire dans la régulation de la prise hydrique et la régulation des fluides corporels.

Ainsi, utilisant plusieurs modèles animaux comme des rates en lactation (dans lesquelles on retrouve une hyperactivité des neurones vasopressinergiques afin de conserver au maximum le contenu hydrique de l'organisme pour une production optimale de lait) ou des souris privées d'eau durant 24 heures, plusieurs études montrent que l'apeline injectée de façon aiguë en icv réduit l'activité des neurones à vasopressine, diminuant de fait les taux sanguins de cette hormone et entraînant donc une diurèse ^{481,482}. Ces résultats tendent donc à montrer que l'apeline serait un inhibiteur des effets de la vasopressine.

Une étude immunohistochimique quantitative menée chez le rat privé d'eau durant 24 heures montre une diminution du contenu des neurones vasopressinergiques du noyau paraventriculaire et du noyau supraoptique en vasopressine et une augmentation du contenu en apeline. L'utilisation d'un antagoniste au récepteur à la vasopressine sur ces mêmes neurones permet d'inhiber cette variation du contenu en apeline. A l'inverse, l'injection icv aiguë de vasopressine ou d'un agoniste de son récepteur permet l'établissement de cette augmentation ⁴⁵⁸. Ces données suggèrent donc que la vasopressine puisse aussi réguler la production de l'apeline au niveau neuronal.

- *Prise alimentaire*

Les travaux concernant les effets de l'apeline centrale sur la régulation de la prise alimentaire sont plutôt contradictoires. Taheri *et al* ⁴⁸³ furent les premiers en 2002 à déterminer – entre autres - les effets d'une injection icv aiguë d'apeline 13 sur la prise alimentaire de rats. Ils ont ainsi observé que celle-ci était sans effet chez des animaux nourris, mais qu'en revanche l'apeline entraînait une augmentation dose dépendante de la prise alimentaire chez des animaux préalablement soumis à un jeûne. Une étude plus récente s'est ensuite intéressée chez la souris à l'étude des effets d'une injection icv

chronique d'apeline 13 à la dose de 1µg/jour pendant 10 jours. Les résultats ont montré une prise alimentaire augmentée des animaux traités à l'apeline par rapport aux animaux témoins à partir du 4^{ème} jour de traitement⁴⁸⁴. L'ensemble de ces résultats semblait donc montrer clairement un effet orexigène de l'apeline centrale. Seulement, d'autres études ont rapporté une diminution de la prise alimentaire en réponse à l'injection icv d'apeline^{485,486}. Dans ce sens, Lv *et al*⁴⁸⁷ ont très récemment rapporté un effet anorexigène de l'apeline icv injectée de façon aiguë. Dans cette étude, les auteurs proposent également la corticolibérine comme acteur moléculaire puisque le prétraitement des animaux par un antagoniste de ses récepteurs permet de reverser l'effet observé.

Ainsi, les effets sur la prise alimentaire semblent dépendre de plusieurs paramètres tels que le modèle animal utilisé, la dose d'apeline injectée, le mode d'injection et également du statut nutritionnel et de la situation métabolique du modèle. En effet, dans une étude de Clarke *et al*⁴⁸⁶, ceux-ci rapportent précisément une diminution de la prise alimentaire en réponse à l'apeline chez les animaux sains, mais aucun effet chez des animaux obèses. Les auteurs ont également rapporté une diminution de l'expression d'APJ au sein de l'hypothalamus des animaux obèses, pouvant donc éventuellement expliquer la perte des effets centraux de l'apeline dans ce modèle. De nouvelles études doivent donc être menées avant de pouvoir conclure de façon claire sur un éventuel effet de l'apeline sur la prise alimentaire.

- *Apeline centrale et régulation de l'homéostasie énergétique*

Les travaux concernant les effets centraux de l'apeline dans le contrôle de l'homéostasie énergétique ne se sont limités en majorité qu'à l'étude de la prise alimentaire et de la prise hydrique. Pour cette raison, le travail de doctorat présenté dans ce manuscrit s'est en partie intéressé à étudier les effets de l'apeline centrale sur l'homéostasie glucidique.

PARTIE II : OBJECTIFS ET TRAVAUX DE THESE

I. Objectifs

Le maintien de l'homéostasie glucidique est un phénomène complexe et finement régulé, impliquant de très nombreux acteurs. Dans ce cadre s'établit une véritable communication inter-organes *via* des messages nerveux et/ou endocriniens qui moduleront les activités respectives de ces différents organes afin de maintenir l'homéostasie glucidique.

L'objectif général de ce travail de thèse était de s'attacher à étudier les communications établies entre les organes périphériques et l'hypothalamus dans le cadre de la régulation de l'homéostasie glucidique en conditions physiologiques mais également dans des conditions physiopathologiques, à travers l'implication de deux acteurs différents que sont l'apeline et le monoxyde d'azote.

Pour cela, nous nous sommes dans un premier temps intéressés à la détermination possible d'une communication établie entre le tissu adipeux et l'hypothalamus à travers l'étude du rôle central de l'apeline dans le contrôle du métabolisme glucidique. Par la suite, nous avons également étudié l'altération dans un modèle d'obésité de la communication établie par l'intestin avec l'hypothalamus dans le cadre de la détection du glucose au niveau intestinal en nous concentrant sur un acteur majeur de cette communication qu'est le monoxyde d'azote.

II. Article 1 : L'apeline centrale contrôle l'homéostasie glucidique chez la souris par un mécanisme impliquant le NO

1) Introduction

Au début de ce travail de doctorat, plusieurs études avaient mis en évidence un lien entre l'apeline *périphérique* et le métabolisme énergétique. Dans ce domaine, il avait notamment été mis en avant un lien réciproque entre l'apeline et l'insuline⁴⁷⁸ et les travaux d'Higuchi *et al*⁴⁸⁸ avaient montré une diminution de l'adiposité résultant d'une dépense énergétique augmentée suite à un traitement chronique à l'apeline. Par la suite, plusieurs travaux de notre équipe ont renforcé ce lien. En effet, une première étude avait mis en évidence que l'apeline était un peptide produit et sécrété également par le tissu adipeux, caractérisant ainsi l'apeline comme une nouvelle adipokine⁴⁶². Des travaux menés par Attané *et al*⁴⁸⁹ ont par ailleurs montré la capacité de l'apeline à augmenter l'oxydation complète des lipides *via* une mitochondriogénèse et une activité mitochondriale augmentée au sein du muscle squelettique. Concernant le métabolisme glucidique, notre équipe avait finalement montré que l'injection périphérique d'apeline permettait de diminuer la glycémie de souris saines mais aussi de souris obèses et diabétiques, et ceci par une voie indépendante de l'insuline⁴⁷¹. Ces effets de l'apeline sur la glycémie de souris obèses et diabétiques montrent qu'il ne s'établit pas de résistance périphérique à l'apeline. Compte tenu de ces effets bénéfiques, de l'augmentation des taux d'apeline observée chez les obèses et du développement de perturbations de la glycémie en condition d'obésité, cela suggère l'existence de perturbations centrales.

Au niveau central, plusieurs études avaient montré un effet sur la prise alimentaire mais se sont révélées contradictoires, l'effet semblant dépendre de la dose et du modèle animal utilisé^{484,485}. Dans une de ces études, menée par Clarke *et al*⁴⁸⁶, les auteurs rapportaient également une diminution des taux circulants d'insuline en réponse au traitement icv à l'apeline. En dehors de ces données, très peu de choses étaient connues concernant les effets de l'apeline *centrale* sur des paramètres importants du métabolisme glucidique tels que la glycémie à jeun, la tolérance au glucose ou encore la sensibilité à l'insuline.

Pour répondre à ces questions, nous avons tout d'abord injecté la forme pyroglutaminée de 13 acides aminés de l'apeline à différentes concentrations dans le ventricule latéral droit de souris saines dans des conditions nourries et à jeun. Cette première expérience a permis de sélectionner 2 concentrations ayant des effets opposés sur l'évolution de la glycémie. Les effets de chacune de ces doses sur le métabolisme glucidique ont alors été étudiés en détail. Ainsi, l'injection icv d'une faible dose d'apeline (2µl à 10pM) était sans effet chez des souris préalablement soumises à un jeûne court mais permettait, en revanche, de diminuer la glycémie de souris en condition nourrie. Par ailleurs, la tolérance au glucose et à l'insuline de ces animaux était augmentée par le traitement. En revanche, l'injection icv d'une plus forte dose d'apeline (2µl à 20nM), correspondant à la moitié de la quantité d'apeline présente dans un hypothalamus de souris, était sans effet en condition nourrie mais entraînait dans des conditions de jeûne une hyperglycémie associée à une diminution de la tolérance au glucose et une diminution de la sensibilité à l'insuline.

Ayant alors montré une réelle implication de l'apeline centrale sur le métabolisme glucidique, nous avons voulu par la suite étudier ses effets dans un modèle physiopathologique de diabète et d'obésité en réalisant nos injections icv chez des souris soumises à un régime obésitogène et diabétogène durant une période de 3 mois. Dans ce modèle, seuls les effets « délétères » associés à l'injection icv d'une forte dose d'apeline étaient conservés. Cette observation suggérait donc que ces différents effets de l'apeline centrale soient relayés par des acteurs moléculaires différents, et que l'agent permettant la mise en place des effets « bénéfiques » de l'injection icv d'une faible dose d'apeline était altéré dans un modèle physiopathologique. Dans ce cadre, grâce à des approches *in vivo* pharmacologiques et génétiques et une méthode originale de détection ampérométrique en temps réel menée *ex vivo*, nous avons pu impliquer le monoxyde d'azote dans la mise en place des effets « bénéfiques » et montrer son dysfonctionnement chez des souris obèses et diabétiques, expliquant donc la disparition de ces effets dans un modèle physiopathologique.

2) Article

Central Apelin Controls Glucose Homeostasis via a Nitric Oxide-Dependent Pathway in Mice

Thibaut Duparc,^{1,2} André Colom,^{1,2} Patrice D. Cani,³ Nicolas Massaly,⁴ Sophie Rastrelli,^{1,2} Anne Drougard,^{1,2} Sophie Le Gonidec,¹ Lionel Moulédous,⁵ Bernard Frances,⁴ Isabelle Leclercq,⁶ Catherine Llorens-Cortes,⁷ J. Andrew Pospisilik,⁸ Nathalie M. Delzenne,³ Philippe Valet,^{1,2} Isabelle Castan-Laurell,^{1,2} and Claude Knauf^{1,2}

Abstract

Aims: Apelin and its receptor have emerged as promising targets for the treatment of insulin resistance. Indeed, peripheral administration of apelin stimulates glucose utilization and insulin sensitivity via a nitric oxide (NO) pathway. In addition to being expressed on peripheral metabolically active adipose tissues, apelin is also found in the brain. However, no data are available on the role of central effects of apelin on metabolic control. We studied glucose metabolism in response to acute and chronic intracerebroventricular (i.c.v.) injection of apelin performed in normal and obese/diabetic mice. **Results:** We demonstrate that i.c.v. injection of apelin into fed mice improves glucose control via NO-dependent mechanisms. These results have been strengthened by transgenic (eNOS-KO mice), pharmacological (L-NMMA i.c.v. treated mice), and real-time measurement of NO release with amperometric probes detection. High-fat diet-fed mice displayed a severely blunted response to i.c.v. apelin associated with a lack of NO response by the hypothalamus. Moreover, central administration of high dose apelin in fasted normal mice provoked hyperinsulinemia, hyperglycemia, glucose intolerance, and insulin resistance. **Conclusion:** These data provide compelling evidence that central apelin participates in the regulation of glucose homeostasis and suggest a novel pathophysiological mechanism involved in the transition from normal to diabetic state. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 1477–1496.

Introduction

EVERY YEAR THE NUMBER of described adipokines continues to grow (1). Their roles in physiological and pathophysiological systems, including the development of metabolic syndrome, are well documented (28). Apelin is one of few adipokines whose expression pattern, and that of its cognate receptor (APJ), include peripheral tissue and central neurons (7, 11). During the last years, numerous studies have demonstrated a clear relation between energy metabolism and peripheral apelin action (12, 17, 19). Under normal conditions, a positive correlation is observed between plasma apelin and insulin levels during the fasting-to-fed transition (3, 18, 42). Under pathophysiological conditions, the peripheral apelinergic system seems to be deregulated. While some researchers found that

Innovation

Although apelin is expressed in hypothalamic neurons, nothing is known concerning its central effect in the control of glucose homeostasis. We demonstrate that apelin can modify hypothalamic neuron activity via an NO pathway and then control peripheral glycemia. Our results clearly show that central apelin has dose-dependent and pleiotropic effects depending on the nutritional state. Despite its beneficial effect observed at a low-dose level on glucose homeostasis, we suggest that a high dose of central apelin could be considered as a novel candidate for the transition from normal to diabetic state.

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1048, Team 3, Toulouse, France.

²Université Paul Sabatier, UPS, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), CHU Rangueil, Toulouse Cedex 4, France.

³Louvain Drug Research Institute, LDRI, Metabolism and Nutrition Research Group, and ⁴Laboratory of Hepato-gastroenterology, Institut de Recherche Expérimentale et Clinique, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium.

⁵Centre de Recherches sur la Cognition Animale, Université de Toulouse, Toulouse, France.

⁶Unité Mécanismes D'action des Substances Opioides, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Centre National de la Recherche Scientifique Toulouse Cedex 04, France.

⁷INSERM U691, Collège de France, Paris, France.

⁸Max Planck Institute for Immunobiology, Freiburg, Germany.

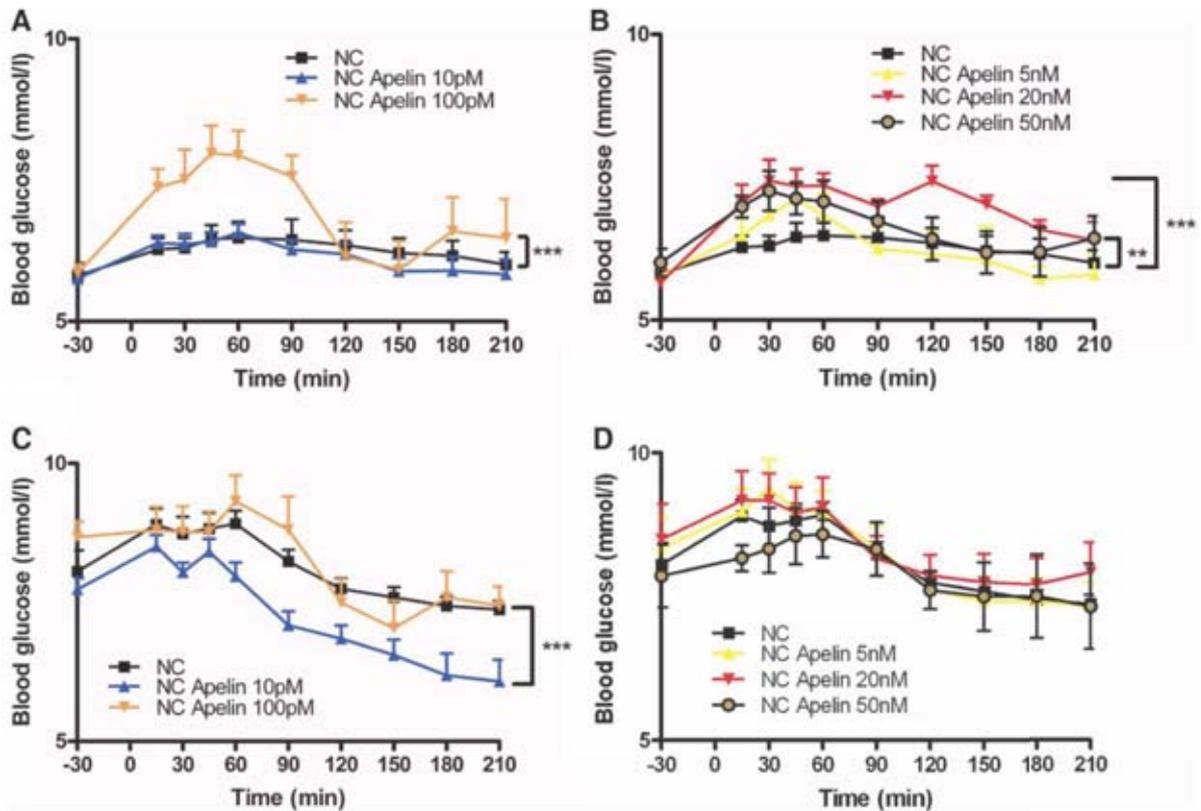
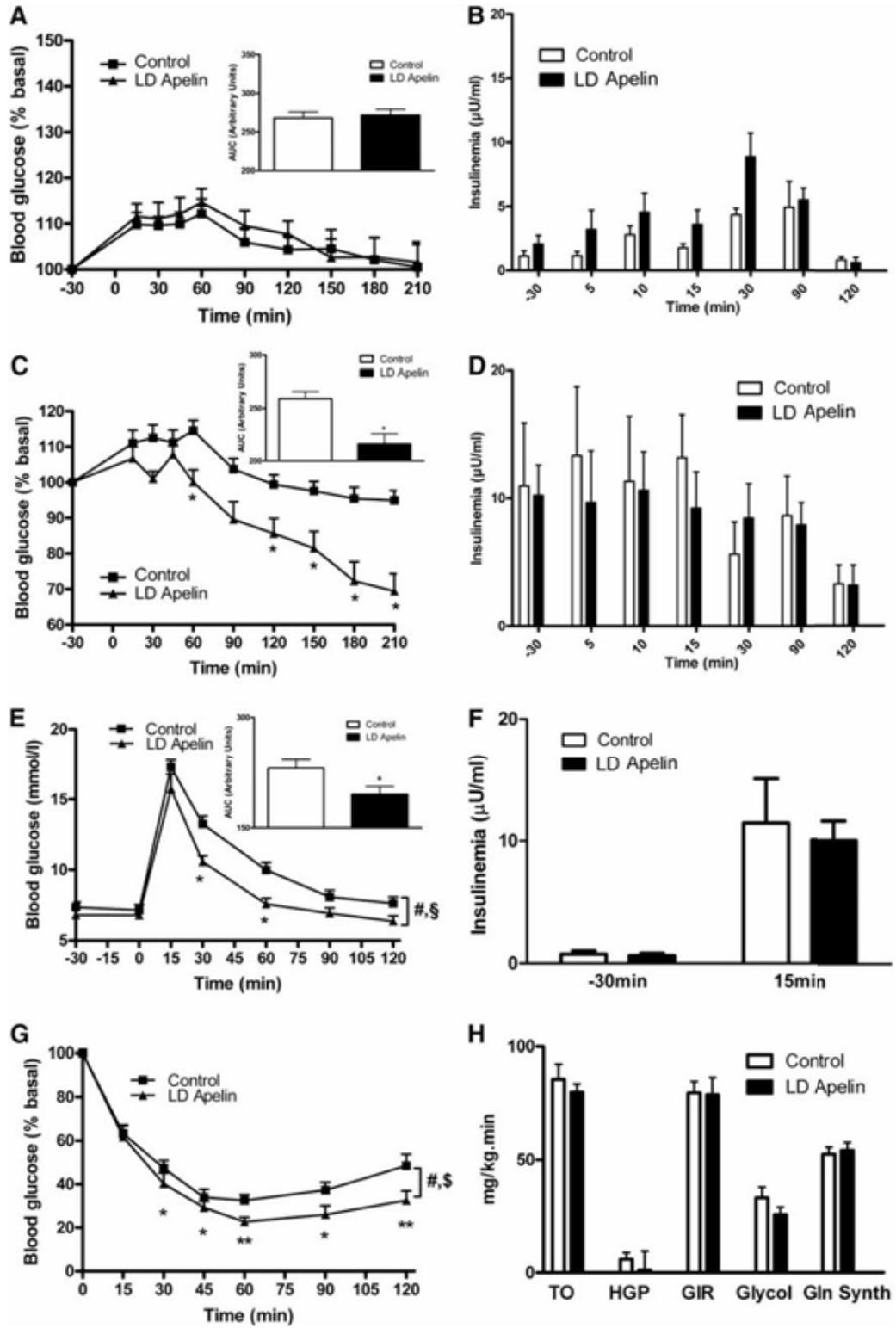


FIG. 1. Dose response of acute i.c.v. apelin injection on peripheral glycemia in fasted and fed state. (A) Effects of 10 pM and 100 pM apelin i.c.v. injected ($n = 17$ and 6 , respectively) on blood glucose in fasted normal chow (NC) WT mice compared to aCSF injected fasted NC WT mice (NC; $n = 18$); $***p < 0.001$, NC vs. NC apelin 100 pM following one-way ANOVA analysis followed by Dunnett's *post-hoc* test. (B) Effects of 5 nM, 20 nM, and 50 nM apelin i.c.v. injected ($n = 6$, 6 , and 8 , respectively) on blood glucose in fasted NC WT mice compared to aCSF injected fasted NC WT mice ($n = 8$); $**p < 0.01$, NC vs. NC apelin 50 nM and $***p < 0.001$, NC vs. NC apelin 20 nM following one-way ANOVA analysis followed by Dunnett's *post-hoc* test. (C) Effects of 10 pM and 100 pM apelin i.c.v. injected ($n = 15$ and 8 , respectively) on blood glucose in fed NC WT mice compared to aCSF injected fed NC WT mice ($n = 10$). $***p < 0.001$, NC vs. NC apelin 10 pM following one-way ANOVA analysis followed by Dunnett's *post-hoc* test. (D) Effects of 5 nM, 20 nM, and 50 nM apelin i.c.v. injected (NC; $n = 10$, 8 , and 6 , respectively) on blood glucose in fed WT mice compared to aCSF injected fed WT mice (NC; $n = 8$). Results are the mean \pm SEM.

levels of plasma apelin in human and mice are increased in obesity, diabetes (18, 42), and in insulin resistance (12), other studies demonstrate that plasma apelin is reduced in type 2 diabetes patients (14). Recently, we have demonstrated that acute intravenous (iv) apelin decreases glycemia and increases

glucose utilization in the whole body of mice fed normal chow (NC) by stimulating glucose uptake, especially in skeletal muscles via an AMPK and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) dependent pathway (12). Also, in high-fat diet (HFD) induction of insulin-resistant mice; apelin improves glucose

FIG. 2. Brain low-dose (LD) apelin controls glucose homeostasis in NC wild-type (WT) mice. (A) Effect of acute i.c.v. injection of LD apelin ($n = 17$) on blood glucose in fasted NC WT mice compared to aCSF injected fasted NC WT mice ($n = 18$). The adjacent bar graph represents the average area under the curve (AUC). (B) Time course insulinemia evolution before and after i.c.v. injection of LD apelin (black, $n = 5$) or aCSF (white, $n = 5$) in another set of fasted NC WT mice. (C) Effect of i.c.v. injected LD apelin on blood glucose ($n = 15$) in fed NC WT mice compared to aCSF injected fed NC WT mice ($n = 15$). The adjacent bar graph represents the average AUC. $*p < 0.05$. (D) Time course insulinemia evolution before and after i.c.v. injection of LD apelin (black, $n = 6$) or aCSF (white, $n = 5$) in another set of fed NC WT mice. (E) OGTT in 6-hour-fasted NC WT mice i.c.v. injected with LD apelin ($n = 10$) or aCSF ($n = 11$). The adjacent bar graph represents the average AUC; $*p < 0.05$. Two-way ANOVA followed by *t*-test *post hoc* reveals time ($^{\#}p < 0.001$) and treatment ($^{\$}p < 0.001$) effects. (F) OGTT-associated insulinemia in 6-hour-fasted NC WT mice i.c.v. injected with LD apelin (black, $n = 10$) or aCSF (white, $n = 11$). (G) ITT in 6-hour-fasted NC WT mice i.c.v. injected with LD apelin ($n = 9$) or aCSF ($n = 12$); $*p < 0.05$, $**p < 0.01$. Two-way ANOVA followed by *t*-test *post hoc* reveals time ($^{\#}p < 0.001$) and treatment ($^{\$}p < 0.01$) effects. (H) Turnover (TO), hepatic glucose production (HGP), glucose infusion rate (GIR), glycolysis (Glycol), and glycogen synthesis (Gln Synth) obtained during an euglycemic hyperinsulinemic clamp in 6-hour-fasted NC WT mice i.c.v. injected with LD apelin ($n = 6$) or aCSF ($n = 5$). Results are the mean \pm SEM.



tolerance and insulin sensitivity (12), suggesting a potential compensatory role of the high levels of apelin observed in obese subjects. In keeping with these data, apelin KO mice are hyperinsulinemic and insulin resistant (49). Altogether, these data support a role for apelin in the control of glucose homeostasis.

The receptor APJ is expressed in several hypothalamic structures (10, 32, 33), including major targets of hormonal, nervous, and metabolic signals (22) that can modify hypothalamic activity. Apelinergic neuronal cell bodies are located in the preoptic region, the hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei, and at highest density in the arcuate nucleus (33). Apelinergic nerve fibers are also found in hypothalamic structures including the ventromedial and dorsomedial hypothalamic nuclei (VMH, DM), arcuate nucleus (ARC), and median eminence (33). Interestingly, intracerebroventricular (i.c.v.) insulin injection has been shown to modify two major peripheral apelin signaling mediators, AMPK (31) and eNOS (5), leading to an increase in peripheral glucose utilization. Although the localization of apelinergic neurons is well documented, the role of brain apelin/APJ system on glucose metabolism remains unknown.

The objective of this study was to investigate the role of brain apelin in the control of whole body glucose homeostasis. Using acute i.c.v. injection, we show that central apelin controls peripheral glycemia, insulin secretion, and glucose and insulin tolerance in mice. Using amperometric nitric oxide (NO) real-time measurement in the hypothalamus, pharmacological and transgenic approaches, we demonstrate that the beneficial effects of i.c.v. apelin are mediated through a NO-dependent signaling pathway that is altered in both HFD obese/diabetic mice and after administration of an acute high dose of i.c.v. apelin. In accordance with these data, we show that chronic i.c.v. perfusion of a high dose of apelin triggers the onset of metabolic alterations associated with type 2 diabetes, including a decrease in insulin tolerance. Thus, our data provide novel insight into the role of apelin in the central regulation of glucose homeostasis, and identify apelin as a novel central factor mediating the transition from a normal to insulin resistant state at high levels.

Results

Dose-response effect on glycemia in response to i.c.v. apelin in fasted or fed mice

Several hormones, such as the incretin glucagon-like peptide 1, exert their action only in hyperglycemic but not in euglycemic conditions (4). Based on this physiological finding, we speculate that apelin may exert an effect depending of the nutritional state. In accordance with this hypothesis, we found that high-dose of i.c.v. apelin increased glycemia in the fasted state (Figs. 1A and 1B) but not in the fed state (Figs. 1C and 1D). At the opposite, low-dose of i.c.v. apelin had no effect on fasted state (Fig. 1A), but decreased glycemia in fed conditions (Fig.

1C). Two doses ($2 \mu\text{l}$ of 10 pM corresponding to $20 \cdot 10^{-3} \text{ fmol}$, or $2 \mu\text{l}$ of 20 nM corresponding to 40 fmol) were selected for this study in respect to their effects on glycemia (Fig. 1). The first one (called "low-dose (LD)" in the text) was selected for its effect on fed glycemia, whereas the second one (called "high-dose (HD)") for its fasted hyperglycemic effect. The high dose (HD) of apelin ($2 \mu\text{l}$ of 20 nM) corresponds approximately to half the quantity of total tissue apelin found in C57b6 mouse hypothalamus ($74 \pm 4 \text{ fmoles per hypothalamus}$). These doses of apelin-13 injected iv did not modify blood glucose or insulin concentration (unpublished personal data).

Effect of acute i.c.v. LD apelin injection on peripheral glucose metabolism in physiological and pathophysiological conditions

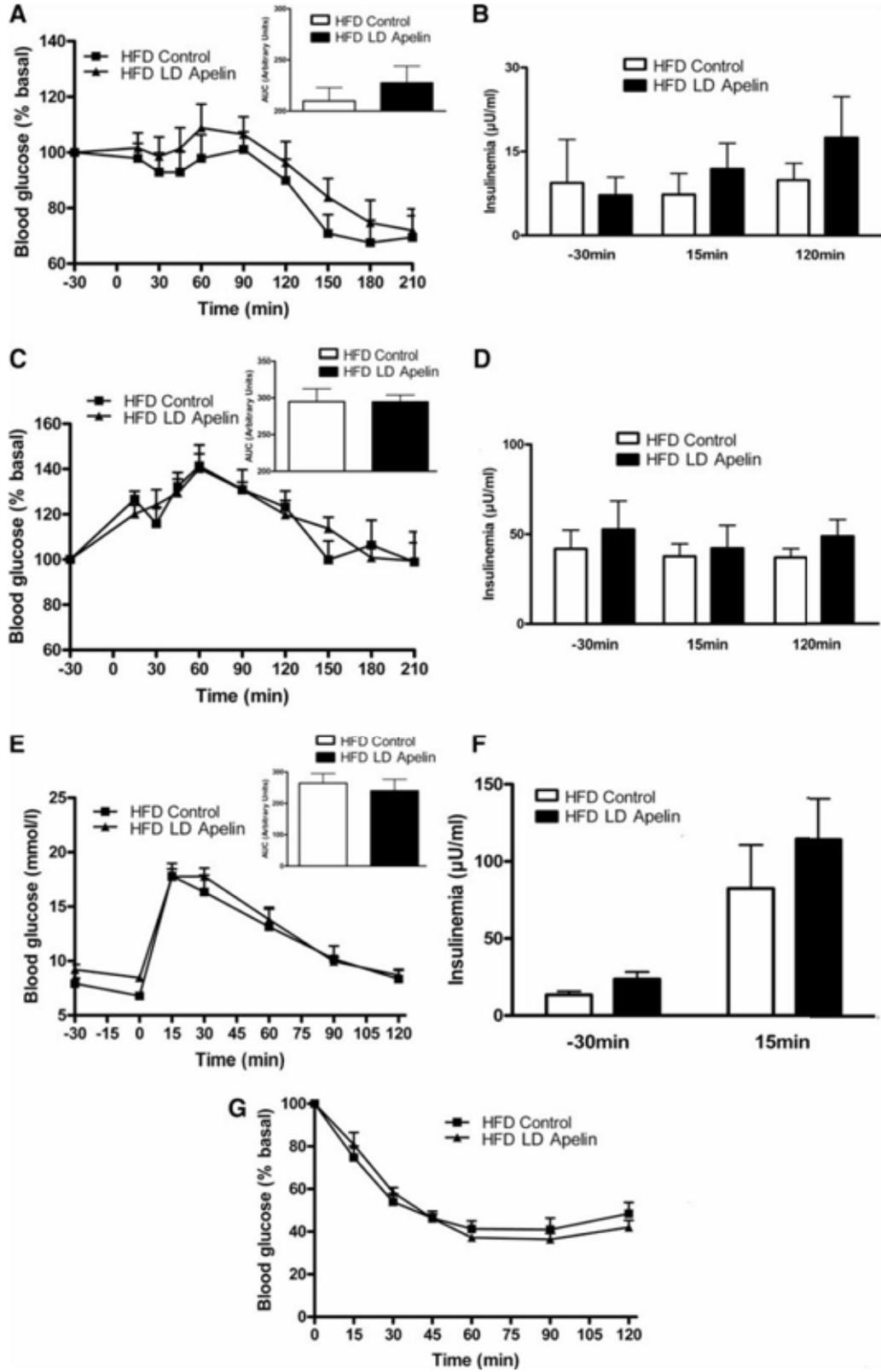
In the fasted state, i.c.v. LD apelin injection did not significantly affect glycemia (Fig. 2A) and insulinemia (Fig. 2B). In the fed state, i.c.v. LD apelin induced a significant decrease in glycemia from 60 to 210 min (Fig. 2C), without altering insulin profiles (Fig. 2D). Further, LD apelin treatment significantly improved glucose tolerance in response to an oral glucose bolus (Fig. 2E). In keeping with the measures made during the fed state, insulin levels remained unchanged (Fig. 2F). Then, we performed an insulin tolerance test (ITT) at supraphysiological insulin dose (1 mU/g) and found that i.c.v. LD apelin-treated mice were more insulin tolerant compared to control (Fig. 2G). Nevertheless, euglycemic hyperinsulinemic clamp studies performed at physiological insulin levels (2.5 mU/kg/min) did not show any modification of the peripheral insulin sensitivity. Indeed, no modification of glucose turnover, hepatic glucose production, glucose infusion rate, glycolysis and glycogen synthesis (Fig. 2H) were observed in i.c.v. LD apelin-treated mice.

Given that during obese/diabetic states, resistance to central regulators of metabolism is often observed (30), we perfused i.c.v. LD apelin in HFD obese/diabetic mice. In the fasted state, i.c.v. LD apelin injection did not modify glycemia (Fig. 3A) and insulinemia (Fig. 3B). The potential improvement of glucose homeostasis of i.c.v. LD apelin was completely abolished in HFD conditions. Indeed, fed glycemia (Fig. 3C) and insulinemia (Fig. 3D), glucose tolerance (Figs. 3E and 3F) and insulin tolerance (Fig. 3G) of HFD i.c.v. treated LD apelin mice were similar to HFD control mice.

Circadian variations of plasma apelin levels in NC and HFD mice

We observed that i.c.v. LD apelin failed to improve glucose homeostasis parameters in HFD mice. One explanation for this result could be that hypothalamus, a circumven-

FIG. 3. Loss of beneficial effects on glucose homeostasis of acute i.c.v. LD apelin in HFD mice. (A) Effect of acute i.c.v. injection of LD apelin ($n=10$) on blood glucose in fasted HFD WT mice compared to aCSF injected fasted HFD WT mice ($n=9$). The adjacent bar graph represents the average AUC. **(B)** Time-course insulinemia evolution before and after i.c.v. injection of LD apelin (black, $n=7$) or aCSF (white, $n=6$) in another set of fasted HFD WT mice. **(C)** Effect of acute i.c.v. injection of LD apelin ($n=8$) on blood glucose in fed HFD WT mice compared to aCSF injected fed HFD WT mice ($n=6$). The adjacent bar graph represents the average AUC. **(D)** Time course insulinemia evolution before and after acute i.c.v. injection of LD apelin (black, $n=7$) or aCSF (white, $n=6$) in another set of fed HFD WT mice. **(E)** OGTT in 6-hour-fasted HFD WT mice i.c.v. injected with LD apelin ($n=9$) or aCSF ($n=10$). The adjacent bar graph represents the average AUC. **(F)** OGTT-associated insulinemia in 6-hour-fasted HFD WT mice i.c.v. injected with LD apelin (black, $n=9$) or aCSF (white, $n=10$). **(G)** ITT in 6-hour-fasted HFD WT mice i.c.v. injected with LD apelin ($n=7$) or aCSF ($n=8$). Results are the mean \pm SEM.



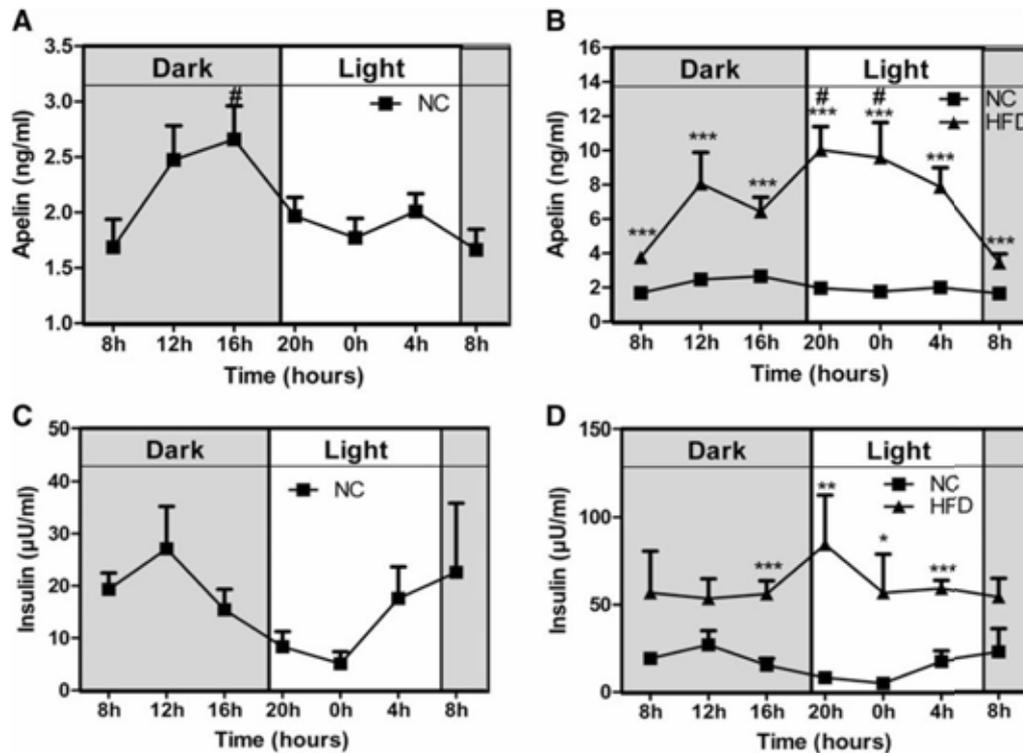


FIG. 4. Circadian plasma apelin variations are altered in HFD mice. (A) Circadian plasma apelin variations in NC WT mice ($n=5$). All data were compared to 8 hour. $^*p<0.05$ vs. 8 hour following one-way ANOVA analysis followed by Dunnett's *post-hoc* test. (B) Circadian plasma apelin variations in HFD WT mice compared to NC WT mice ($n=5$). $^{***}p<0.001$ NC versus HFD; $^*p<0.05$ vs. 8 hour following one-way ANOVA analysis, followed by Dunnett's *post-hoc* test. (C) Circadian plasma insulin variations in NC WT mice ($n=5$). (D) Circadian plasma insulin variations in HFD WT mice compared to NC WT mice ($n=5$); $^*p<0.05$, $^{**}p<0.01$, and $^{***}p<0.001$ NC versus HFD. Results are the mean \pm SEM.

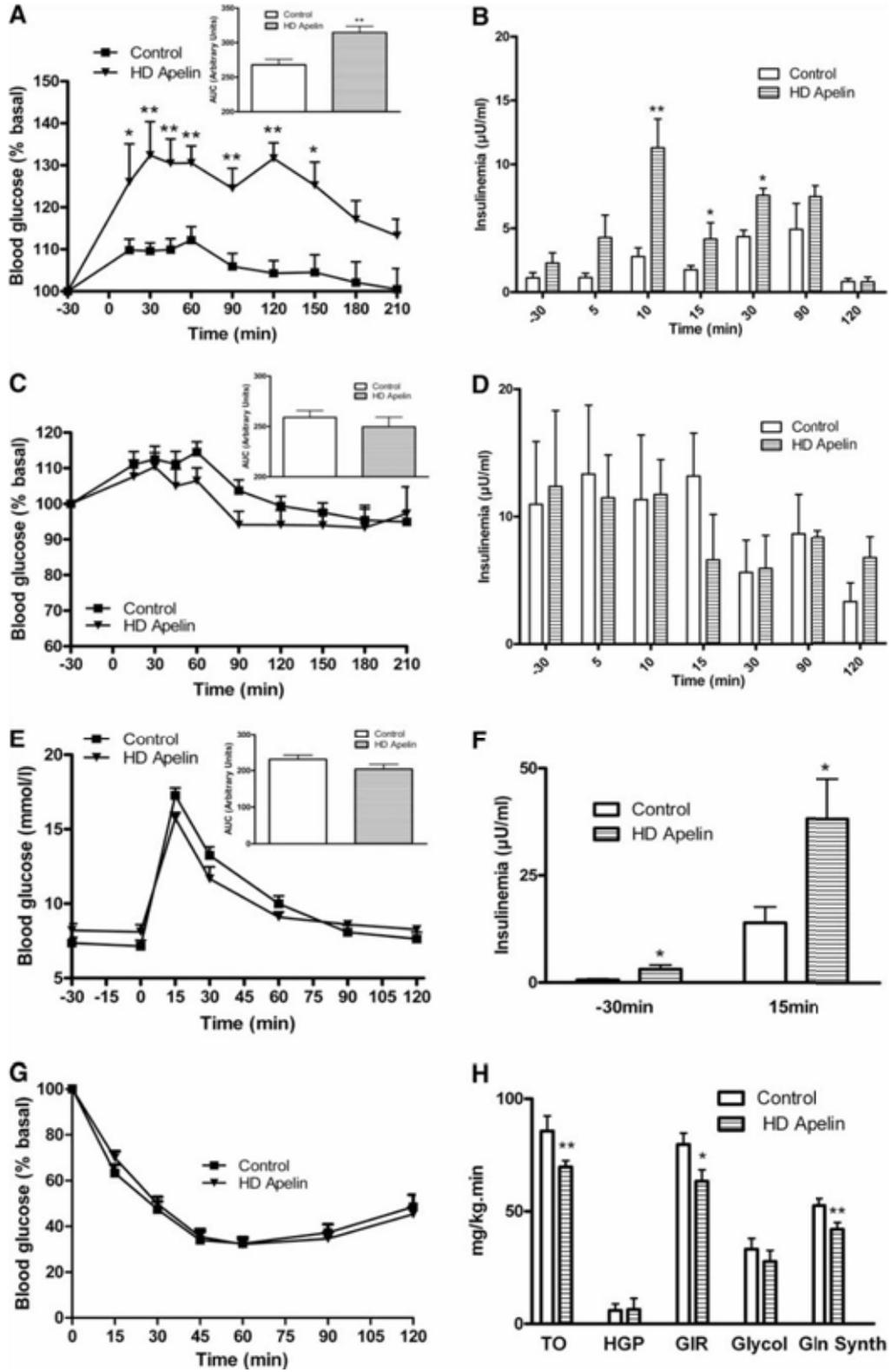
tricular structure where the blood-brain barrier displays physiological modifications (35), may be differentially stimulated by circulating apelin. In accordance with this hypothesis, we measured circadian variations of plasma apelin levels in physiological and physiopathological states. Plasma apelin levels in NC mice followed a circadian rhythm with an increase during the dark period (corresponding to the fed period) (Fig. 4A). In contrast to NC mice, HFD mice showed a deregulation of this rhythm since apelin plasma levels increased significantly during the entire day (Fig. 4B). As expected, plasma insulin levels follow a similar profile to those of apelin (Figs. 4C and 4D). This set of experiments

supports the hypothesis that high levels of plasma apelin could contribute to brain neuronal alterations observed in obese/diabetic state.

Effect of acute i.c.v. of HD apelin injection on peripheral glucose metabolism in physiological and physiopathological conditions

As HFD mice showed altered circadian plasma apelin concentrations, we speculated that HD apelin could modify the physiological response of the brain. Acute i.c.v. HD apelin increased peripheral glycemia (Fig. 5A) and insulinemia (Fig.

FIG. 5. Acute i.c.v. injection of high-dose (HD) apelin alters glucose metabolism. (A) Effect of acute i.c.v. injection of HD apelin ($n=6$) on blood glucose in fasted NC WT mice compared to aCSF injected fasted NC WT mice ($n=18$). The adjacent bar graph represents the average AUC; $^*p<0.05$, $^{**}p<0.01$. (B) Time course insulinemia evolution before and after i.c.v. injection of HD apelin (hatched, $n=5$) or aCSF (white, $n=5$) in another set of fasted NC WT mice; $^*p<0.05$, $^{**}p<0.01$. (C) Effect of acute i.c.v. injection of HD apelin ($n=6$) on blood glucose in fed NC WT mice compared to aCSF injected fed NC WT mice ($n=8$). The adjacent bar graph represents the average AUC; $^*p<0.05$, $^{**}p<0.01$. (D) Time course insulinemia evolution before and after i.c.v. injection of HD apelin (hatched, $n=5$) or aCSF (white, $n=5$) in another set of fed NC WT mice; $^*p<0.05$, $^{**}p<0.01$. (E) OGTT in 6-hour-fasted NC WT mice i.c.v. injected with HD apelin ($n=7$) or aCSF ($n=11$). The adjacent bar graph represents the average AUC. (F) OGTT-associated insulinemia in 6-hour-fasted NC WT mice i.c.v. injected with HD apelin (hatched, $n=7$) or aCSF (white, $n=11$); $^*p<0.05$. (G) ITT in 6-hour-fasted NC WT mice i.c.v. injected with HD apelin ($n=12$) or aCSF ($n=12$). (H) Turnover (TO), hepatic glucose production (HGP), glucose infusion rate (GIR), glycolysis (Glycol), and glycogen synthesis (Gln Synth) obtained during an euglycemic hyperinsulinemic clamp in 6-hour-fasted NC WT mice i.c.v. injected with HD apelin ($n=6$) or aCSF ($n=5$); $^*p<0.05$, $^{**}p<0.01$. Results are the mean \pm SEM.



5B) in fasting normal mice. No significant variation of glycemia (Fig. 5C) and insulinemia (Fig. 5D) were observed in the fed state in response to i.c.v. HD apelin. Glucose tolerance was not modified in i.c.v. HD apelin treated mice compared to control (Fig. 5E), but was associated with a significant increase in insulinemia (Fig. 5F), suggesting a moderate insulin resistance state. Besides the fact that we did not observe any modification of the insulin tolerance upon supraphysiological insulin administration during ITT (Fig. 5G), euglycemic hyperinsulinemic clamp performed at physiological insulin dose confirmed that i.c.v. HD apelin promotes insulin resistance. Indeed, i.c.v. HD apelin decreased whole-body insulin sensitivity, as shown by the reduced glucose infusion rate and glucose turnover. This phenomenon was associated with a lower glycogen synthesis (Fig. 5H), whereas the other parameters were not affected. Because plasma apelin levels were increased during obesity and since we observed that injection of i.c.v. HD apelin induced hyperglycemia and hyperinsulinemia in NC mice, we investigated the effect of HD apelin i.c.v. injection in a HFD diabetic/obese mice model (12). In response to HD apelin, glycemia was significantly increased during fasting (Fig. 6A) without modification of insulinemia (Fig. 6B). Fed glycemia/insulinemia (Figs. 6C and 6D), glucose/insulin tolerance (Figs. 6E–6G) were not modified by acute i.c.v. HD apelin in HFD mice.

Variation of c-Fos expression in the hypothalamus in response to acute apelin injection in physiological conditions

Modifications of glycemia/insulinemia in response to acute i.c.v. apelin varied according to the injected dose and the nutritional state, raising the possibility that distinct hypothalamic regions were responsible for these effects. To test this hypothesis, we measured c-Fos expression in three major hypothalamic regions implicated in glucose metabolism under the previously tested conditions (22). I.c.v. bolus injection of LD apelin significantly increased c-Fos expression in the VMH and DM under fasting conditions, and only in the DM in the fed state in NC mice (Figs. 7A and 7B). c-Fos expression is significantly increased in the VMH and decreased in the ARC of HD apelin-treated mice in the fasted state (Fig. 7A). I.c.v. bolus injection of HD apelin did not modify c-Fos expression in studied hypothalamic regions (Fig. 7B). These data suggest that beneficial vs. deleterious effects of apelin may be explained by differential activation of hypothalamic regions. Thus, high quantity of apelin in the hypothalamus may be a crucial element to the establishment of a diabetic state.

Hypothalamic NO as a potential target to brain LD apelin

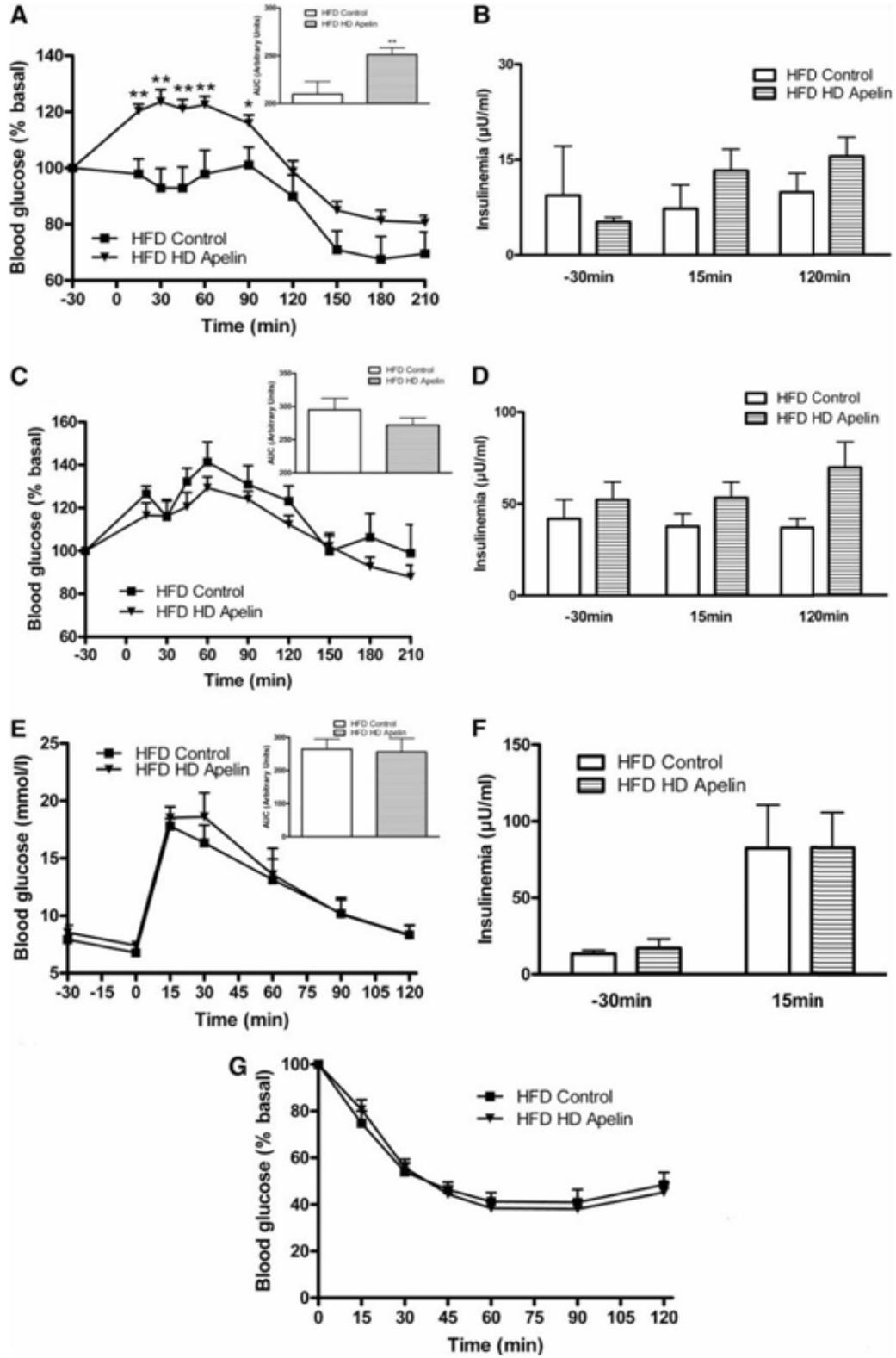
Given that hypothalamic NO is implicated in the control of glucose homeostasis (36) and NO is a major effector of apelin signaling in the periphery (12), we measured real-time NO release *ex vivo* in the hypothalamus in response to LD apelin. No significant variation on NO release was observed in hypothalamic slices removed from fasting animals (Fig. 8A). Delta variation of NO release from basal are similar to that observed previously (16). In fed state, LD apelin rapidly increased NO release from hypothalamic slices from 2 to 15 minutes (Fig. 8B). On hypothalamic explants, HD apelin did not increase NO release in fasting conditions (Fig. 8C), and failed to increase continuously NO release during the 20 minutes of the experiment in fed states as opposed to LD apelin (Fig. 8D). To explain such differences according to the nutritional state and apelin concentrations, we studied variations of eNOS expression on *ex vivo* hypothalamus stimulated by either LD or HD apelin. Contrary to HD apelin, which did not modify the ratio of phospho/total eNOS expression in all experimental conditions (Figs. 8E and 8F), LD apelin increased the active phosphorylated form of eNOS in fed (Fig. 8F) but not in fasted state (Fig. 8E). These results suggest that NO release from stimulated-LD apelin hypothalamus implicated an increase of eNOS activity. As we observed in HFD mice that 1) beneficial effect of LD apelin was impaired and, 2) hypothalamic eNOS pathway was seriously blunted in pathophysiological conditions (6), we studied the impact of LD or HD apelin on NO release from hypothalamic slices taken from HFD fed mice. No significant variation on NO release was observed in response to LD or HD apelin in fed state (Figs. 8G and 8H), and similar results were obtained in fasted conditions (data not shown).

Altogether these results suggest that obesity and insulin-resistant state participate to the disruption of the apelin-NO-dependent hypothalamic response.

Effect of acute i.c.v. LD or HD apelin on peripheral glucose metabolism in total eNOS KO and L-NMMA i.c.v. control treated mice

To address the dependence of the observed central apelin effects on the generation of NO, we repeated the above experiments in total eNOS KO mice. All beneficial effects of apelin on glucose homeostasis were lost in eNOS KO mice, including glucose tolerance (Figs. 9A and 9B) and fed glycemia (AUC: eNOS KO Control = 224.8 ± 14.9 vs. eNOS KO Apelin = 205.5 ± 12.3). eNOS KO mice perfused with i.c.v. NO donor did not present modification of glucose tolerance (ex-

FIG. 6. Persistent hyperglycemic effect of i.c.v. HD apelin on glucose homeostasis in HFD mice. (A) Effect of acute i.c.v. injection of HD apelin ($n=6$) on blood glucose in fasted HFD WT mice compared to aCSF injected fasted HFD WT mice ($n=5$). The adjacent bar graph represents the average AUC; * $p<0.05$, ** $p<0.01$. **(B)** Time course insulinemia evolution before and after i.c.v. injection of HD apelin (hatched, $n=6$) or aCSF (white, $n=6$) in another set of fasted HFD WT mice. **(C)** Effect of acute i.c.v. injection of HD apelin ($n=6$) on blood glucose in fed HFD WT mice compared to aCSF injected fed HFD WT mice ($n=8$). The adjacent bar graph represents the average AUC. **(D)** Time course insulinemia evolution before and after i.c.v. injection of HD apelin (hatched, $n=6$) or aCSF (white, $n=6$) in another set of fasted HFD WT mice. **(E)** OGTT in 6-hour-fasted HFD WT mice i.c.v. injected with HD apelin ($n=8$) or aCSF ($n=10$). The adjacent bar graph represents the average AUC. **(F)** OGTT-associated insulinemia in 6-hour-fasted HFD WT mice i.c.v. injected with HD apelin (hatched, $n=8$) or aCSF (white, $n=10$). **(G)** ITT in 6-hour-fasted HFD WT mice i.c.v. injected with HD apelin ($n=8$) or aCSF ($n=8$). Results are the mean ± SEM.



cept a slight decrease of glycemia at t60 and t90 following SNAP i.c.v. administration in eNOS KO mice) (Fig. 9A) associated with a drastic increase in insulin release (Fig. 9B). This suggests that 1) the lack of response to LD apelin could be at least in part due to the absence of a functional hypothalamic eNOS, and 2) insulin resistance is one major characteristic of eNOS KO mice (37). In accordance with these findings, pharmacological blockade of NOS using L-NMMA administration in wild-type mice completely abolished the beneficial effects of apelin observed on glucose homeostasis (Figs. 9C and 9D). Then we found that LD apelin did not increase NO release from *ex vivo* hypothalamus taken from eNOS KO mice (Fig. 9E) or from *ex vivo* control hypothalamus incubated with L-NMMA (Fig. 9F).

As we observed that beneficial effect of LD apelin on fed glycemia in NC mice requires a functional hypothalamic NO pathway as opposed to HD apelin, we investigated the effect of HD apelin in eNOS KO mice or L-NMMA i.c.v. treated normal NC mice. In fed eNOS KO mice, i.c.v. HD apelin increased peripheral glycemia (Fig. 9G) without modification of plasma insulin (15.7 ± 4.0 vs. $22.9 \pm 6.0 \mu\text{U/mL}$ at t30; 9.8 ± 1.7 vs. $14.3 \pm 4.2 \mu\text{U/mL}$ at t15; 7.6 ± 1.4 vs. $11.7 \pm 4.3 \mu\text{U/mL}$ at t120; control vs HD apelin; $n=12$ vs. $n=6$, respectively). Glucose and insulin tolerance were not modified by acute i.c.v. HD apelin in eNOS KO mice and NO release in fed conditions was unchanged (data not shown). This suggests first that the hyperglycemic effects are NO-independent, and second, that in the fed state basal hypothalamic NO is sufficient to counteract the hyperglycemic effects of HD apelin in normal mice. Importantly, and in agreement with measurements made in the eNOS KO mice, HD apelin moderately increased peripheral glycemia in L-NMMA i.c.v. treated fed mice (Fig. 9H) without modification of plasma insulin (10.2 ± 2.3 vs. $5.1 \pm 0.7 \mu\text{U/mL}$ at t30; 8.3 ± 1.4 vs. $8.3 \pm 1.5 \mu\text{U/mL}$ at t15; 5.7 ± 1.0 vs. $9.3 \pm 1.6 \mu\text{U/mL}$ at t120; control vs HD apelin; $n=5$ vs. $n=11$, respectively), corroborating the existence of a second, distinct NO-independent pathway mediating the HD apelin effects. All other parameters (glucose/Insulin tolerance, NO release in fed conditions) were not modified by acute i.c.v. HD apelin (data not shown).

Effect of i.c.v. chronic HD apelin injection on peripheral glucose metabolism in physiological conditions

Marked elevations in the circulating concentrations of insulin and leptin are considered hallmarks of the obese and diabetic condition. Diet-induced obese mice exhibit a parallel and marked increase in plasma apelin and obese/diabetic state was associated with a chronic administration of apelin (Fig. 4). In order to assess the potential effects of a continuous priming of apelin in the brain, we assessed the effect of a 2-week continuous i.c.v. HD apelin perfusion on glucose homeostasis parameters. Body weight (26.0 ± 0.4 vs. 26.4 ± 0.3 g at week 1; 26.5 ± 0.4 vs. 26.4 ± 0.4 g at week 2, control vs chronic HD apelin; $n=6$ vs. $n=7$, respectively) and food intake (13.9 ± 0.4 vs. 14.2 ± 0.2 kcal/day/mouse at week 1; 15.7 ± 0.3 vs. 16.1 ± 0.6 kcal/day/mouse at week 2, control vs chronic HD apelin; $n=6$ vs. $n=7$, respectively) did not vary in chronic HD apelin-treated mice. In fasted state, glycemia and insulinemia significantly increased at week 2 of chronic HD apelin treatment (Figs. 10A and 10B). Fed glycemia and in-

sulinemia did not change during the 2-weeks of experiment (Figs. 10C and 10D), corroborating the acute effect previously observed on fed state. Mice treated with HD apelin showed a significant decrease in insulin tolerance compared to control mice (Fig. 10F), reinforcing the negative impact of HD apelin in the brain.

Discussion

The brain, and more precisely the hypothalamus, is perhaps the primary orchestrator of whole body fuel sensing (26). We demonstrate here for the first time that hypothalamic apelin controls glucose homeostasis in physiological and physiopathological states. The beneficial effects of LD apelin in the hypothalamus are NO dependent, as opposed to HD apelin. In fact, our results exhibit a dose-dependent divergence in net metabolic consequence. Thus, our data suggest elevated hypothalamic apelin as a potential mediator of the diabetic state (Fig. 11).

One of the major peripheral effectors of apelin function is eNOS. The apelin/eNOS axis is represented in numerous physiological processes including vascular functions (45, 50) and peripheral glucose utilization (12), and not surprising perturbation of the axis is associated with both hypertension and diabetes, respectively. Using pharmacological and transgenic approaches, we demonstrate that NO is implicated in hypothalamic LD apelin-driven signaling effects. The observed NO release measurements (nanomolar concentrations) lie within the physiological range and are consistent with previously published functions of NO (29). Consistent with the observed effects, both constitutively expressed forms of NOS (nNOS and eNOS) are found in the hypothalamus. Also, both forms have previously been shown to be capable of modulating the central tone of glucose homeostasis (6, 16). Here, we demonstrate that beneficial effect of i.c.v. LD apelin implies an increase phosphorylation of eNOS only in fed conditions. Moreover, our finding that eNOS KO mice do not respond to i.c.v. LD apelin supports a dominant role for the eNOS isoform in the apelin-driven effects. We cannot rule out the fact that one characteristic of eNOS KO mice is to present a clear insulin-resistant state and the absence of i.c.v. LD apelin effect could be related to peripheral disturbance. Conversely to this hypothesis, eNOS KO mice are still able to respond to i.c.v. SNAP by an increase in insulinemia as previously observed in a rat model in which hypothalamus is stimulated by intracarotid NO donor (27). In spite of a lack of clear amelioration of glucose tolerance, eNOS KO mice present a more rapid return to normal glycemia (from t60 to t120, Fig. 9A). All these data suggest that the brain of eNOS KO mice can respond to NO donor with peripheral physiological changes. We can speculate that these modifications can be amplifying in response to higher (supraphysiological) doses of i.c.v. NO donor.

Interestingly, when challenged with HD central apelin, both eNOS KO and L-NMMA treated mice present an increase in glycemia in the fed state. These findings suggest that a basal tone of NO in the hypothalamus is crucial for the maintenance of a physiological glycemia, and NO from endothelial origin is implicated in the hypoglycemic effect of apelin. This hypothesis is supported by the work of Shankar *et al.* (36) demonstrating that i.c.v. L-NMMA injection in the rat increases insulin resistance. Finally, *ex vivo* hypothalami

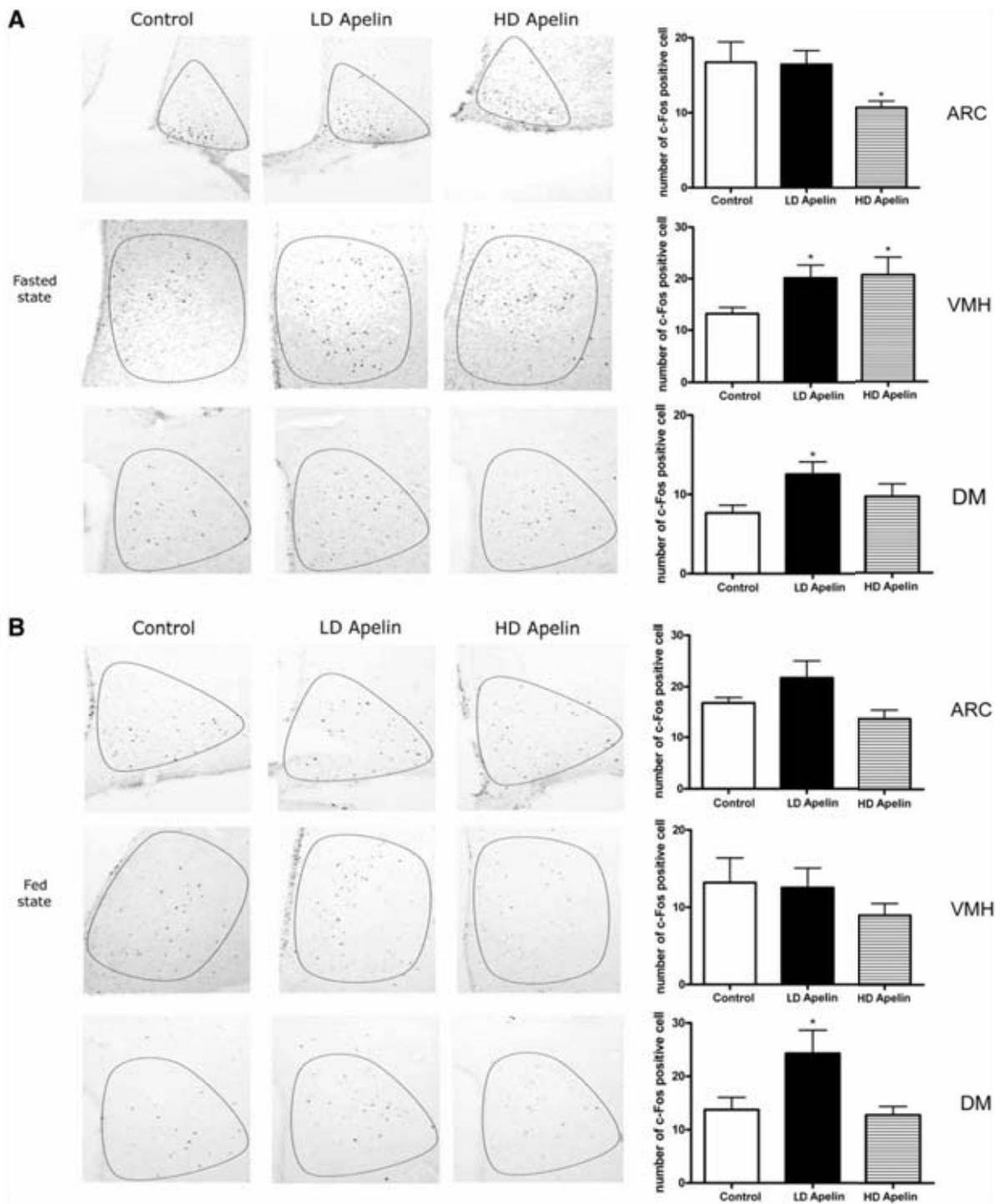
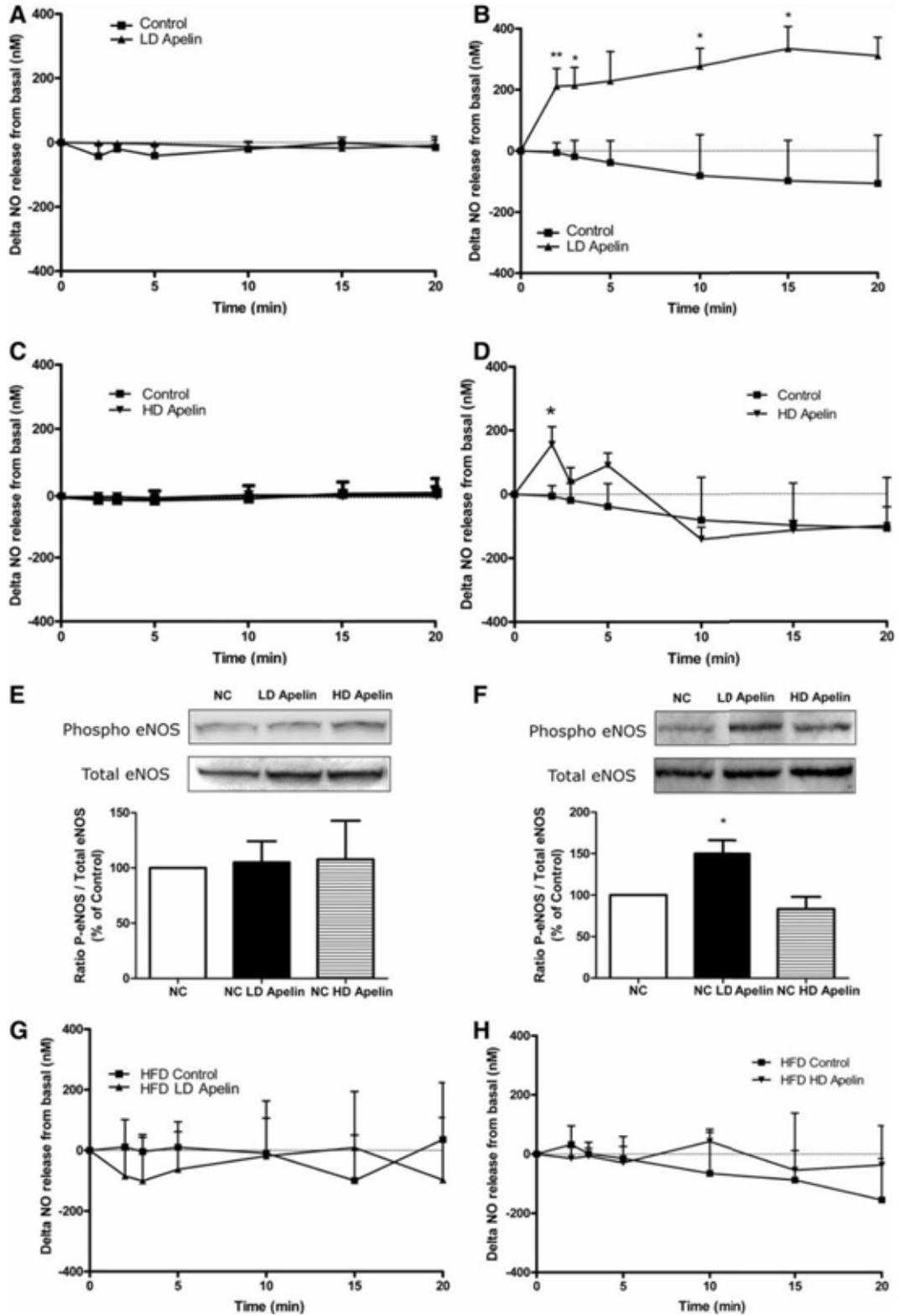


FIG. 7. Differential c-Fos activation by i.c.v. LD or HD apelin in the hypothalamus. (A) Representative staining of c-Fos-expressing cells in the ARC, VMH, and DM nuclei after i.c.v. injection of LD apelin ($n=4$), HD apelin ($n=4$), or aCSF ($n=4$) in fasted NC WT mice. Means \pm SEM are represented in a graph; $*p < 0.05$ versus aCSF. **(B)** Representative staining of c-Fos-expressing cells in the ARC, VMH, and DM nuclei after i.c.v. injection of LD apelin ($n=4$), HD apelin ($n=4$), or aCSF ($n=4$) in fed NC WT mice; $*p < 0.05$ versus aCSF. Results are the mean \pm SEM.



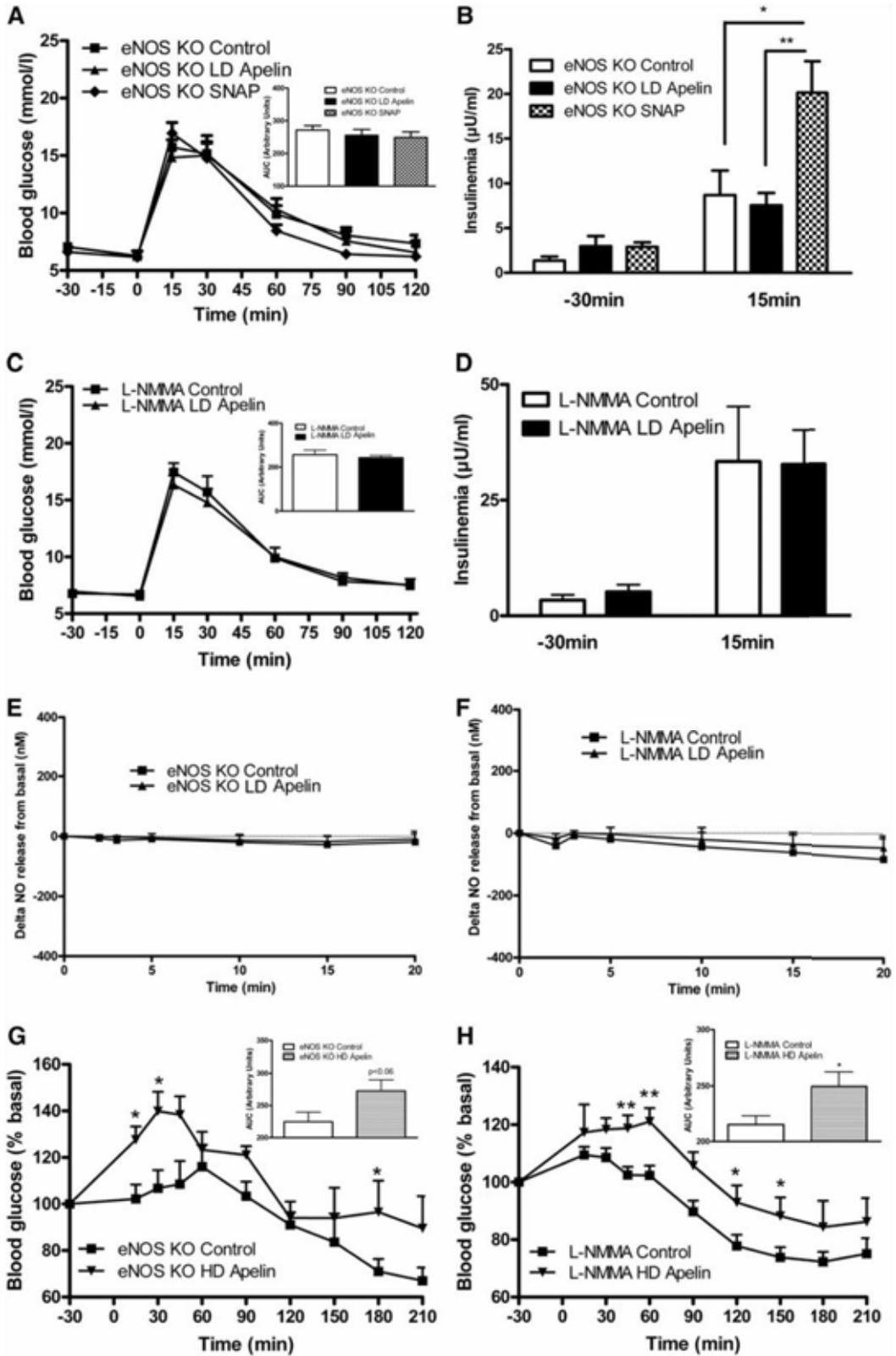
treated with HD apelin did not exhibit increased NO release throughout the 20 minutes of exposure, suggesting that HD apelin activates inhibitory signals for NO. In contrast to LD apelin, we hypothesize that HD apelin may decrease NO release in hypothalamic explants, as observed with leptin on pituitary cells (25). This hypothesis supposes that high levels of hypothalamic apelin are able to stimulate inhibitory factors of NOS activity such as beta-endorphin (15) or of eNOS cofactors such as reactive oxygen species (20). In support of such a mechanism, we have observed that HD apelin stimulates hydrogen peroxide release from *ex vivo* hypothalamus (data not shown). The fact that HD apelin did not increase the phosphorylation of eNOS in fed conditions as opposed to LD apelin, further reinforce this hypothesis. An equally plausible hypothesis would be that the APJ receptor-induced signaling cascade exhibits desensitization in response to HD apelin. Indeed, i.c.v. apelin has been shown to induce a downregulation of the receptor itself in the hypothalamus of HFD mice (8).

We hypothesized that elevated levels of central apelin might impair glucose homeostasis since obese/diabetic mice, which are sensitive to peripheral apelin (12), present increased plasma apelin levels. Both the finding of abolished circadian apelin regulation in HFD-treated mice (Fig. 4) and that of chronic apelin triggering insulin intolerance (Fig. 9) are consistent with this hypothesis. Interestingly, the finding that HD central apelin increases blood glucose during fasting (Fig. 5) suggests a link between central apelin and the control of hepatic glucose production. Although hepatic glucose production was not significantly modified during the clamp, a link between central apelin and liver could be suggested since HD apelin increases blood glucose during fasting. Numerous studies have implicated the autonomous nervous system in the central control of liver glucose metabolism. Indeed, hepatic denervation (48) and electrical stimulation (38) modify glycogen liver content. Also, the stimulation of the VMH produces hyperglycemia by increasing glycogenolysis and gluconeogenesis (9) which are mediated by sympathetic efferents. Importantly, the previously described kinetics of sympathetic gluco-regulation (glycogenolysis within minutes; gluconeogenesis within hours) (39–41) clearly fits with our observation of two waves of increased glucose release after HD apelin. While these hepatic gluco-regulatory effects and the c-Fos staining profiles (Fig. 7) clearly highlight an activity of apelin at the VMH, the concurrent capacity of apelin to initiate insulin release suggests the additional involvement of parasympathetic regulation and thus of additional hypothalamic nuclei (the lateral hypothalamus and periventricular hypothalamic nucleus). Such a concept could

explain the dose dependency of apelin action and places the apelin/APJ axis as a novel central regulator of glucose homeostasis. In accordance with this hypothesis, we found that i.c.v. apelin differentially affects glucose metabolism. LD apelin improve fed glycemia and glucose tolerance. In fasted state, LD apelin did not changes glycemia, while supraphysiological insulin stimulation increased insulin tolerance. To verify this hypothesis, we performed euglycemic-hyperinsulinemic clamp studies and did not find any modification of glucose turnover. Therefore, this suggests that in the fasted state, the brain cannot adequately respond to LD apelin as opposed to a hyperglycemic state. Interestingly, HD apelin markedly increased plasma insulin secretion during fasted state and oral glucose load. This last observation suggests that HD apelin promotes a moderate insulin resistance state. Nonetheless, we did not find any changes of insulin tolerance upon ITT, however, we may not rule out that the supraphysiological dose of insulin used exceeds the physiological impact of i.c.v. HD apelin, thereby jeopardizing the real assessment of insulin sensitivity. Therefore, we decided to investigate insulin sensitivity by using the gold standard method, namely the euglycemic-hyperinsulinemic clamp studies. Importantly, by using this method, we found that HD apelin administration promotes whole body insulin resistance.

Although i.c.v. apelin controls peripheral glucose homeostasis, chronic i.c.v. perfusion of apelin does not modify cumulative food intake in our experiment. This result is in accordance with Taheri *et al.* (44) which demonstrates similar effect in rats. At the opposite, numerous studies implicate central apelin as a positive (47) or negative regulator (43) of food intake. Such discrepancies could be explain by injection process (acute vs. chronic), the dose injected in lateral ventricle (low vs. high) and by the nutritional state (fast vs. fed) (44). In our study, we demonstrate that LD apelin targets hypothalamic NO in fed conditions. One of the mechanisms could be explained by the fact that the hypothalamus needs an impregnation of peripheral factors (including glucose and/or insulin) to adequately respond to brain apelin via NO. In accordance with this hypothesis, Becskei *et al.* (2) demonstrate a differential expression of c-Fos expression in the arcuate nucleus of fasted, chow-refed or *ad libitum* fed mice associated to variations of plasma hormones concentrations (insulin, leptin, ghrelin). In this study, the authors also demonstrate that supplementation of food with macronutrients (protein, fat, or carbohydrates) may modify c-Fos expression in refeeding mice, suggesting that the arcuate nucleus represents an important site in the short-term control of energy intake. However, the feeding-related factors implicated in the genesis of the transition from fasted to fed state in the hypothalamus,

FIG. 8. i.c.v. LD apelin targets eNOS in the hypothalamus. (A) *Ex vivo* hypothalamic NO release measured by real-time amperometric detection in fasted NC WT mice after injection of LD apelin ($n=5$) or aCSF ($n=6$). (B) *Ex vivo* hypothalamic NO release measured by real-time amperometric detection in fed NC WT mice after injection of LD apelin ($n=5$) or aCSF ($n=6$); * $p<0.05$, ** $p<0.01$. (C) *Ex vivo* hypothalamic NO release measured by real-time amperometric detection in fasted NC WT mice after injection of HD apelin ($n=4$) or aCSF ($n=5$). (D) *Ex vivo* hypothalamic NO release measured by real-time amperometric detection in fed NC WT mice after injection of HD apelin ($n=6$) or aCSF ($n=6$); * $p<0.05$. (E) Representative blots and quantification of eNOS expression (phosphorylated and total forms) in *ex vivo* hypothalamus of fasted NC mice incubated with saline, LD apelin, or HD apelin ($n=4$). (F) Representative blots and quantification of eNOS expression (phosphorylated and total forms) in *ex vivo* hypothalamus of fed NC mice incubated with saline, LD apelin, or HD apelin ($n=4$); * $p<0.05$. (G) *Ex vivo* hypothalamic NO release measured by real-time amperometric detection in fed HFD WT mice after injection of LD apelin ($n=5$) or aCSF ($n=6$). (H) *Ex vivo* hypothalamic NO release measured by real-time amperometric detection in fed HFD WT mice after injection of HD apelin ($n=5$) or aCSF ($n=6$). Results are the mean \pm SEM.



and thus contributing to the brain apelin/NO effect during fed state, remain to be defined. Thus, we can speculate that the capacity of hypothalamic nuclei to respond to apelin varied in function of numerous parameters, including the nutritional state as suggested by our c-Fos study in the hypothalamus and by plasma apelin variations observed during the day. Such variations of hypothalamic c-Fos expression during the nutritional state and/or apelin levels may have consequence on autonomous nervous system activity which could explain peripheral variations observed on glycemia and insulin release. Thus, we can speculate that such a modification of hypothalamus activity in our model may have consequences on glucose homeostasis, and identification of apelinergic neurons and efferent nervous signals implicated in this control need to be further explored.

This study shows for the first time that centrally injection of apelin modulates glucose homeostasis. The downstream effects are pleiotropic, dose-dependent, and involve several distinct hypothalamic nuclei that link hepatic glucose production, insulin release, and centers mediating autonomic control. Finally, results including generation of a central apelin-resistant state *in vivo* reveal apelin/APJ as a novel mechanistic candidate for the transition from normal to diabetic states. In fact, potential therapeutic strategies based on apelin/APJ system have to preferentially target peripheral apelin effects since they are conserved in HFD mice model (12). Evaluation of the quantity of iv apelin able to reach the brain while retaining beneficial peripheral effect on glycemia will be a major issue for the future clinical relevance of apelin.

Materials and Methods

Mice

Animals were handled in accordance with the principles and guidelines established by the National Institute of Medical Research (INSERM) and by the local ethical committee of the IFR-BMT. C57Bl6/J mice and mice deficient in endothelial NO synthase (eNOS^{-/-}) on a C57Bl6/J background were obtained from Charles River Laboratory (L'Arbresle, France). Mice were housed conventionally in a constant temperature (20°–22°C) and humidity (50%–60%) animal room and with a 12/12h light/dark cycle (lights off at 7:00 AM) and free access to food and water through the 24h period. All injections and experiments were performed in 13–15-week-old males. A group of male mice was subjected to high fat diet (HFD) containing 20%

protein, 35% carbohydrate, and 45% fat (SAFE, Augy, France). HFD-fed mice were followed at regular intervals with measure of weight and blood parameters (glucose, insulin) until they were obese and insulin resistant corresponding to 3 months of HFD. Experiments were performed on 6h-fasted or fed mice. During the time of experiment (3 hours), mice fed overnight were placed in a new clean cage without food.

Surgical procedures

For *in vivo* acute and chronic perfusions, an indwelling i.c.v. catheter (Alzet Brain Perfusion Kit 3, 1–3 mm, Charles River, 0.1 mm lateral, 0.22 mm anteroposterior from the bregma and 1.5 mm deep) was implanted in anesthetized mice with isoflurane (Abbott, Ringis, France). For chronic perfusions, the i.c.v. catheter was connected to an osmotic mini-pump (Model 2004, Alzet; Cupertino, CA), as previously described (21).

Acute injections

Apelin. Bolus injection of 2 μ l of [Pyr]apelin-13 (concentration from 10 pM to 50 nM corresponding to $20 \cdot 10^{-3}$ fmol to 50 fmol, Bachem, UK), the most active apelin isoform (12), was injected directly to the i.c.v. catheter completed to 2 μ l of artificial cerebrospinal fluid (aCSF) for treated mice, or 4 μ l of aCSF for control mice. Blood glycemia was measured every 30 min from –30 to 210 min (time 0 corresponding to i.c.v. apelin injection). To limit stress due to accumulation of tail blood samples, insulinemia was measured at different time intervals from –30 to 120 min in another set of mice.

NOS inhibitor. Similar experiments were performed with a NOS inhibitor, NG-monomethyl-L-arginine (L-NMMA, Sigma), who was dissolved extemporaneously in aCSF, and then infused at a concentration of 100 μ M (2 μ l). The L-NMMA infusion was started 30 min before the start of the apelin injection.

Chronic perfusion of apelin

Using an osmotic mini-pump system connected to the lateral ventricle, we measured glucose homeostasis parameters, as previously described in detail (21). Briefly, the osmotic mini-pump delivers either aCSF or apelin-13 (high-dose, HD; 2 μ l of 20 nM) over 2 weeks, at a rate of 0.25 μ l/h. Fasted/fed glycemia and insulinemia, body weight, and food intake were evaluated every week. In a different set of mice, ITT were performed during the treatment.

FIG. 9. Genetic deletion of eNOS or pharmacological blockade of NOS affects i.c.v. LD apelin but not HD apelin effect on glucose homeostasis. (A) OGTT in 6-hour-fasted NC eNOS KO mice i.c.v. injected with LD apelin ($n=7$), the NO donor SNAP ($n=9$), or aCSF ($n=6$). The adjacent bar graph represents the average AUC. **(B)** OGTT-associated insulinemia in 6-hour-fasted NC eNOS KO mice i.c.v. injected with LD apelin (black, $n=7$), SNAP (hatched, $n=9$), or aCSF (white, $n=6$); $*p<0.05$ eNOS KO SNAP vs. eNOS KO Control and $**p<0.01$, eNOS KO SNAP vs. eNOS KO LD apelin following one-way ANOVA analysis, followed by Bonferoni's *post-hoc* test. **(C)** OGTT in 6-hour-fasted NC WT mice treated with L-NMMA and i.c.v. injected with LD apelin ($n=7$) or aCSF ($n=7$). The adjacent bar graph represents the average AUC. **(D)** OGTT-associated insulinemia in 6-hour-fasted NC WT mice treated with L-NMMA and i.c.v. injected with LD apelin (black, $n=7$) or aCSF (white, $n=7$). **(E)** *Ex vivo* hypothalamic NO release measured by real-time amperometric detection in fed NC eNOS KO mice after injection of LD apelin ($n=6$) or aCSF ($n=5$). **(F)** *Ex vivo* hypothalamic NO release measured by real-time amperometric detection in fed NC WT mice treated with L-NMMA after injection of LD apelin ($n=5$) or aCSF ($n=5$). **(G)** Effect of acute i.c.v. injection of HD apelin ($n=6$) on blood glucose in fed NC eNOS KO mice compared to aCSF injected fed NC eNOS KO mice ($n=11$). The adjacent bar graph represents the average AUC; $*p<0.05$. **(H)** Effect of acute i.c.v. injection of HD apelin ($n=11$) on blood glucose in fed NC WT mice treated with L-NMMA compared to aCSF injected fed NC WT mice treated with L-NMMA ($n=18$). The adjacent bar graph represents the average AUC; $*p<0.05$, $**p<0.01$. Results are the mean \pm SEM.

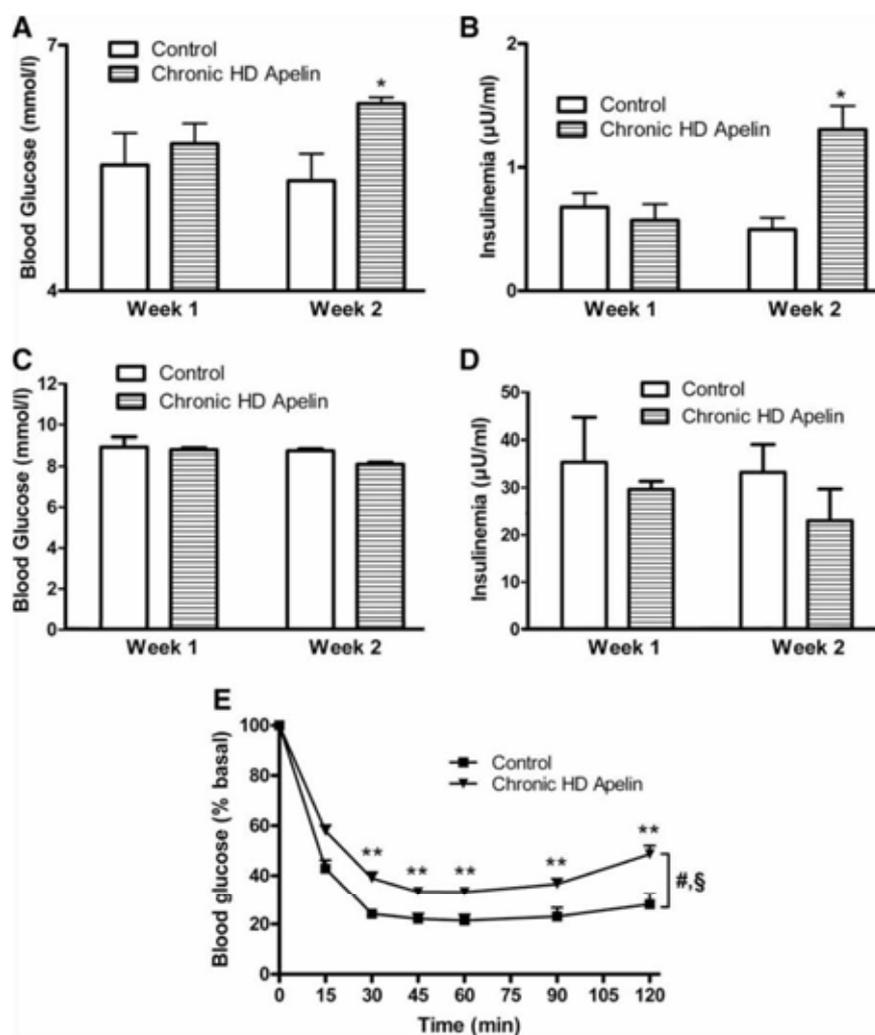


FIG. 10. Chronic i.c.v. HD apelin perfusion alters glucose metabolism in NC mice. (A) 2 weeks time-course blood glucose in fasted NC WT mice with chronic i.c.v. perfusion of HD apelin (hatched, $n=7$) or aCSF (white, $n=6$); $*p < 0.05$. (B) 2 weeks time-course insulinemia evolution in fasted NC WT mice with chronic i.c.v. infusion of HD apelin (hatched, $n=7$) or aCSF (white, $n=6$); $*p < 0.05$. (C) 2 weeks time-course blood glucose in fed NC WT mice with chronic i.c.v. perfusion of HD apelin (hatched, $n=7$) or aCSF (white, $n=6$). (D) 2 weeks time-course insulinemia evolution in fed NC WT mice with chronic i.c.v. infusion of HD apelin (hatched, $n=7$) or aCSF (white, $n=6$). (E) ITT in 6-hour-fasted NC WT mice with chronic i.c.v. infusion of HD apelin ($n=6$) or aCSF ($n=6$); $*p < 0.05$, $**p < 0.01$. Two-way ANOVA followed by *t*-test *post hoc* reveals time ($^{\#}p < 0.001$) and treatment ($^{\$}p < 0.001$) effects. Results are the mean \pm SEM.

Real-time amperometric NO measurements

Mice were decapitated without anesthesia after 6 hours of fasting or fed conditions. After dissection, hypothalamus fragment was washed in Krebs-Ringer bicarbonate/glucose buffer (pH 7.4) in an atmosphere of 95% O₂-5% CO₂ and then immersed in Eppendorf tubes containing 400 μ l of the same medium. Each tube contained one hypothalamus. After a 10 min recovery period, the spontaneous NO release was measured at 35°C for 20 min by using a NO-specific amperometric probe (ISO-NOPF, 100 μ m diameter, 5 mm length, World Precision Instruments, Aston Stevenage, UK) implanted directly in the hypothalamus (13, 16). Apelin-13 or saline was injected directly in the survival medium (final concentrations: 10 pM or 20 nM). Calibration of the electrochemical sensor was performed by the use of different concentrations of a nitrosothiol donor *S*-nitroso-*N*-acetyl-D,L-penicillamine (SNAP, Sigma), as previously described in details (16, 24). The concentration of NO gas in solution was measured in real-time with data acquisition (Apollo1000, World Precision Instruments, Aston Stevenage, UK) at a

sampling rate of 10 values/sec. The computer-interfaced DataTrax2 software (World Precision Instruments, Aston Stevenage, UK) performed data acquisition. Data are expressed as delta variation of NO release from basal.

Oral glucose tolerance test

6 hour-fasted mice were injected with i.c.v. apelin-13 or aCSF 120 min before oral glucose (3 g/kg) loading. Blood was collected from the tail vein at -30, 0, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min later for determination of glucose levels. Blood was also collected 30 min before and after 15 min glucose loading for determination of plasma insulin concentration, as previously described (21-23). In another set of mice, pharmacological blockade of NOS was induced by i.c.v. L-NMMA injection 150 min before apelin treatment, and consequences on glycemia and insulinemia were measured. In a similar way, experiments were performed in the presence of the NO donor SNAP (*S*-nitroso-*N*-acetyl-D,L-penicillamine, Sigma) that was dissolved extemporaneously in aCSF, and then infused at a dose of 22.7 nmol in 2 μ l completed to 2 μ l of aCSF in

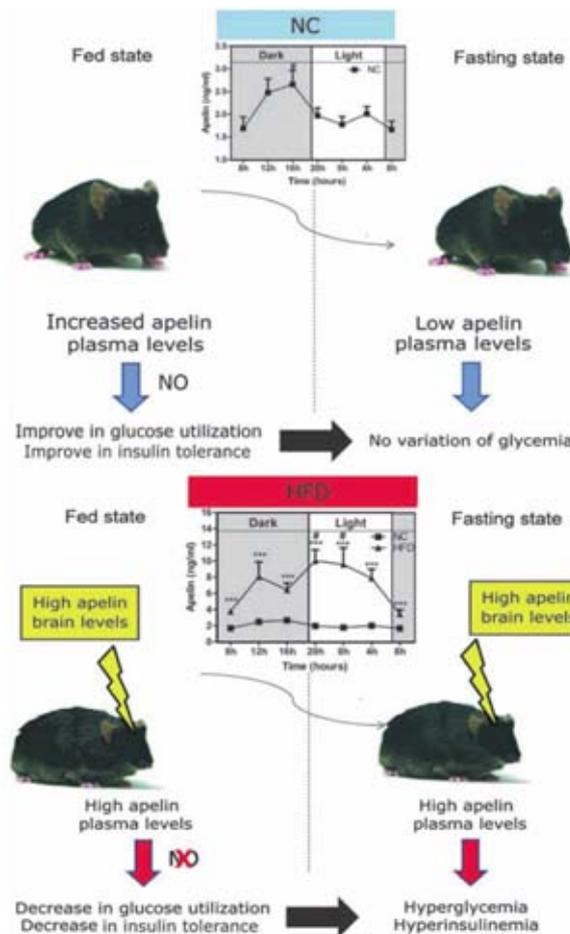


FIG. 11. Apelin mediates the transition from normal to the diabetic state. In the physiological fed state, the increase in plasma apelin levels exerts beneficial effects on peripheral glycemia. In the physiopathological state, the high plasma apelin levels may exert deleterious effects in the brain, resulting in hyperglycemia and hyperinsulinemia in fasted conditions, suggesting a novel role of apelin mediating the transition from normal to the diabetic state.

eNOS KO mice. At this dose, i.c.v. SNAP did not modify peripheral plasma concentrations of hormones including angiotensin II and vasopressin (34). SNAP infusion was started 120 min before oral glucose (3 g/kg) loading.

ITT

6 hour-fasted mice were injected with i.c.v. apelin-13 or aCSF 120 min before intraperitoneal insulin injection (1 mU/g), as previously described (46). Blood was collected from the tail vein at -30, 0, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min later for determination of glucose levels.

Euglycemic hyperinsulinemic clamp

A femoral iv catheter was implanted 7 days before clamp studies. Hepatic glucose production (HGP) and whole body glucose turnover (TO) were evaluated by the hyper-

insulinemic-euglycemic clamp technique, conducted at a 6-h fast with a continuous infusion of 2.5 mU/kg⁻¹/min⁻¹ human insulin (Actrapid) coupled with [3-³H]glucose (0.33 μCi, PerkinElmer, Boston, MA). 6 hour-fasted mice were injected with i.c.v. apelin-13 or aCSF before starting the clamp, as previously described (23). Tail blood glycemia was obtained at time 0 and every 10 min thereafter to adjust a variable 20% glucose infusion rate (GIR) to maintain euglycemia (5–6 mM). When steady-state was obtained (±90 min), blood samples (5 μl) were collected every 10 min for 1 h for estimation of plasma glucose specific activity. At steady state, the rate of glucose appearance (Ra) measured as=[3-³H]GIR/glucose specific activity equals the rate of peripheral glucose disposal (Rd) or TO. In insulin-stimulated conditions (2.5 mU/kg⁻¹/min⁻¹), HGP was obtained by subtracting the GIR (mg/kg⁻¹/min⁻¹) to the Rd previously calculated: HGP (Ra)=Rd - GIR. The whole-body glycolytic flux was calculated from the [3-³H]2O accumulated in the plasma during the last hour of the infusions. The whole-body glycogen synthesis (Gln Synth) rate was calculated by subtracting the glycolytic flux (glycolysis, glycol) from the glucose turnover rate. For each mouse, the mean values have been calculated and then averaged with values from mice from the same group.

Insulin assays

Serum insulin was measured using an ultra-sensitive mouse insulin ELISA (Mercodia, Uppsala, Sweden).

Variations of plasma apelin levels

Plasma apelin levels for NC and HFD mice were measured every 4 hours with a commercially available enzyme-linked immunoassay (ELISA) kit (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA). The sensitivity of the assay was 0.2 ng/ml and the intra-assay error was below 5%. The ELISA had 100% cross-reactivity with human apelin-12, apelin-13, and apelin-36.

Quantification of c-Fos expression in the hypothalamus

A bolus injection of 2 μl of Apelin-13 was performed as described above. Mice were anesthetized 2 h after the injection, perfused with 4% picric acid buffer and 4% formaldehyde. The brain was removed from the skull, postfixed with the formaldehyde buffer, cryoprotected one night in 20% sucrose, sectioned, and stained for immunohistochemistry, as previously described in detail (22).

Western blot analysis

Mice were decapitated without anesthesia after 6 hours of fasting or in fed conditions. After dissection, the hypothalamus fragment was washed in Krebs-Ringer bicarbonate/glucose buffer (pH 7.4) in an atmosphere containing 95% O₂-5% CO₂ and then immersed in tubes containing 400 μl of the same medium. Each tube contained one hypothalamus. Apelin-13 or saline was injected directly in the survival medium (final concentrations: 10 pM or 20 nM). After 3 min of incubation, each hypothalamus was frozen at -80°C in liquid nitrogen and homogenized in lysis buffer. Then, blots were performed as previously described (6). Briefly, the membranes were blocked for 90 min at room temperature with 5% dried milk and incubated overnight at 4°C with a primary

polyclonal antibody against total eNOS (dilution 1/1,000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or the phosphorylated active form (Ser1177) of eNOS (dilution 1/1,000; Cell Signaling Technology, Ozyme, St. Quentin Yvelines, France). After three washes, membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody (dilution 1/10,000; Amersham Biosciences Europe, Orsay, France) for 2 hours. Immunoreactivity was detected using an enhanced chemiluminescence detection kit (ECL system; Amersham Biosciences Europe) and exposure to X-ray film (Amersham Hyperfilm ECL, GE Health Care Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ). Bands were quantified using Image Quant system (GE Health Care Bio-Sciences Corp). Data are expressed as percentage of variations of ratio phosphorylated protein/total protein compared to control.

Statistical analysis

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

Acknowledgments

PDC is research associate from the FRS-FNRS (Fonds de la Recherche Scientifique) Belgium. This work was supported by the "Société Française de Nutrition" (SFN). We thank Pr Jean-François Arnal for eNOS KO mice generous gift, Amandine Everard from UCL and the "Plateforme Genotoul Anexplo" from Toulouse for excellent technical assistance. We thank Nadia De Mota for technical advice.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Ahima RS and Osei SY. Adipokines in obesity. *Front Horm Res* 36: 182–197, 2008.
- Becskei C, Lutz TA, and Riediger T. Diet-derived nutrients mediate the inhibition of hypothalamic NPY neurons in the arcuate nucleus of mice during refeeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297: R100–110, 2009.
- Boucher J, Masri B, Daviaud D, Gesta S, Guigne C, Mazucotelli A, Castan-Laurell I, Tack I, Knibiehler B, Carpene C, Audigier Y, Saulnier-Blache JS, and Valet P. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 146: 1764–1771, 2005.
- Burcelin R, Cani PD, and Knauf C. Glucagon-like peptide-1 and energy homeostasis. *J Nutr* 137: 2534S–2538S, 2007.
- Cabou C, Campistron G, Marsollier N, Leloup C, Cruciani-Guglielmacci C, Penicaud L, Drucker DJ, Magnan C, and Burcelin R. Brain glucagon-like peptide-1 regulates arterial blood flow, heart rate, and insulin sensitivity. *Diabetes* 57: 2577–2587, 2008.
- Cabou C, Cani PD, Campistron G, Knauf C, Mathieu C, Sartori C, Amar J, Scherrer U, and Burcelin R. Central insulin regulates heart rate and arterial blood flow: An endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism altered during diabetes. *Diabetes* 56: 2872–2877, 2007.
- Carpene C, Dray C, Attane C, Valet P, Portillo MP, Churrua I, Milagro FI, and Castan-Laurell I. Expanding role for the apelin/APJ system in physiopathology. *J Physiol Biochem* 63: 359–373, 2007.
- Clarke KJ, Whitaker KW, and Reyes TM. Diminished metabolic responses to centrally-administered apelin-13 in diet-induced obese rats fed a high-fat diet. *J Neuroendocrinol* 21: 83–89, 2009.
- Corssmit EP, Romijn JA, and Sauerwein HP. Review article: Regulation of glucose production with special attention to nonclassical regulatory mechanisms: A review. *Metabolism* 50: 742–755, 2001.
- De Mota N, Lenkei Z, and Llorens-Cortes C. Cloning, pharmacological characterization and brain distribution of the rat apelin receptor. *Neuroendocrinology* 72: 400–407, 2000.
- De Mota N, Reaux-Le Goazigo A, El Messari S, Chartrel N, Roesch D, Dujardin C, Kordon C, Vaudry H, Moos F, and Llorens-Cortes C. Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 10464–10469, 2004.
- Dray C, Knauf C, Daviaud D, Waget A, Boucher J, Buleon M, Cani PD, Attane C, Guigne C, Carpene C, Burcelin R, Castan-Laurell I, and Valet P. Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 8: 437–445, 2008.
- Duparc T, Naslain D, Colom AX, Muccioli GG, Massaly N, Delzenne NM, Valet P, Cani PD, and Knauf C. Jejunal inflammation in obese and diabetic mice impairs enteric glucose detection and modifies nitric oxide release in the hypothalamus. *Antioxid Redox Signal* 14: 415–423, 2011.
- Erdem G, Dogru T, Tasci I, Sonmez A, and Tapan S. Low plasma apelin levels in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 116: 289–292, 2008.
- Faletti AG, Mastronardi CA, Lomniczi A, Seilicovich A, Gimeno M, McCann SM, and Rettori V. beta-Endorphin blocks luteinizing hormone-releasing hormone release by inhibiting the nitricoxidergic pathway controlling its release. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1722–1726, 1999.
- Fioramonti X, Marsollier N, Song Z, Fakira KA, Patel RM, Brown S, Duparc T, Pica-Mendez A, Sanders NM, Knauf C, Valet P, McCrimmon RJ, Beuve A, Magnan C, and Routh VH. Ventromedial hypothalamic nitric oxide production is necessary for hypoglycemia detection and counter-regulation. *Diabetes* 59: 519–528, 2010.
- Frier BC, Williams DB, and Wright DC. The effects of apelin treatment on skeletal muscle mitochondrial content. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297: R1761–1768, 2009.
- Heinonen MV, Purhonen AK, Miettinen P, Paakkonen M, Pirinen E, Alhava E, Akerman K, and Herzig KH. Apelin, orexin-A and leptin plasma levels in morbid obesity and effect of gastric banding. *Regul Pept* 130: 7–13, 2005.
- Higuchi K, Masaki T, Gotoh K, Chiba S, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T, and Yoshimatsu H. Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology* 148: 2690–2697, 2007.
- Jaimes EA, Sweeney C, and Raji L. Effects of the reactive oxygen species hydrogen peroxide and hypochlorite on en-

- dothelial nitric oxide production. *Hypertension* 38: 877–883, 2001.
21. Knauf C, Cani PD, Ait-Belgnaoui A, Benani A, Dray C, Cabou C, Colom A, Uldry M, Rastrelli S, Sabatier E, Godet N, Waget A, Penicaud L, Valet P, and Burcelin R. Brain glucagon-like peptide 1 signaling controls the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and reduces energy expenditure. *Endocrinology* 149: 4768–4777, 2008.
 22. Knauf C, Cani PD, Kim DH, Iglesias MA, Chabo C, Waget A, Colom A, Rastrelli S, Delzenne NM, Drucker DJ, Seeley RJ, and Burcelin R. Role of central nervous system glucagon-like peptide-1 receptors in enteric glucose sensing. *Diabetes* 57: 2603–2612, 2008.
 23. Knauf C, Cani PD, Perrin C, Iglesias MA, Maury JF, Bernard E, Benhamed F, Gremeaux T, Drucker DJ, Kahn CR, Girard J, Tanti JF, Delzenne NM, Postic C, and Burcelin R. Brain glucagon-like peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage. *J Clin Invest* 115: 3554–3563, 2005.
 24. Knauf C, Prevot V, Stefano GB, Mortreux G, Beauvillain JC, and Croix D. Evidence for a spontaneous nitric oxide release from the rat median eminence: Influence on gonadotropin-releasing hormone release. *Endocrinology* 142: 2343–2350, 2001.
 25. Kosior-Korzecka U and Bobowiec R. Leptin effect on nitric oxide and GnRH-induced FSH secretion from ovine pituitary cells *in vitro*. *J Physiol Pharmacol* 57: 637–647, 2006.
 26. Lam TK, Schwartz GJ, and Rossetti L. Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nat Neurosci* 8: 579–584, 2005.
 27. Marsollier N, Kassis N, Mezghenna K, Soty M, Fioramonti X, Lacombe A, Joly A, Pillot B, Zitoun C, Vilar J, Mithieux G, Gross R, Lajoix AD, Routh V, Magnan C, and Cruciani-Guglielmacci C. Deregulation of hepatic insulin sensitivity induced by central lipid infusion in rats is mediated by nitric oxide. *PLoS One* 4: e6649, 2009.
 28. Maury E and Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 314: 1–16, 2010.
 29. McCann SM, Mastronardi C, de Laurentiis A, and Rettori V. The nitric oxide theory of aging revisited. *Ann NY Acad Sci* 1057: 64–84, 2005.
 30. Munzberg H and Myers MG, Jr. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci* 8: 566–570, 2005.
 31. Perrin C, Knauf C, and Burcelin R. Intracerebroventricular infusion of glucose, insulin, and the adenosine monophosphate-activated kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, controls muscle glycogen synthesis. *Endocrinology* 145: 4025–4033, 2004.
 32. Reaux A, De Mota N, Skultetyova I, Lenkei Z, El Messari S, Gallatz K, Corvol P, Palkovits M, and Llorens-Cortes C. Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J Neurochem* 77: 1085–1096, 2001.
 33. Reaux A, Gallatz K, Palkovits M, and Llorens-Cortes C. Distribution of apelin-synthesizing neurons in the adult rat brain. *Neuroscience* 113: 653–662, 2002.
 34. Reis WL, Giusti-Paiva A, Ventura RR, Margatho LO, Gomes DA, Elias LL, and Antunes-Rodrigues J. Central nitric oxide blocks vasopressin, oxytocin and atrial natriuretic peptide release and antidiuretic and natriuretic responses induced by central angiotensin II in conscious rats. *Exp Physiol* 92: 903–911, 2007.
 35. Rodríguez EM, Blázquez JL, and Guerra M. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: The former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides* 31: 757–776, 2010.
 36. Shankar R, Zhu J, Ladd B, Henry D, Shen H, and Baron A. Central nervous system nitric oxide synthase activity regulates insulin secretion and insulin action. *J Clin Invest* 102: 1403–1412, 1998.
 37. Shankar RR, Wu Y, Shen HQ, Zhu JS, and Baron AD. Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance. *Diabetes* 49: 684–687, 2000.
 38. Shimazu T. Innervation of the liver and glucoregulation: Roles of the hypothalamus and autonomic nerves. *Nutrition* 12: 65–66, 1996.
 39. Shimazu T and Fujimoto T. Regulation of glycogen metabolism in liver by the autonomic nervous system. IV. Neural control of glycogen biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 252: 18–27, 1971.
 40. Shimazu T and Fukuda A. Increased activities of glycogenolytic enzymes in liver after splanchnic-nerve stimulation. *Science* 150: 1607–1608, 1965.
 41. Shimazu T, Fukuda A, and Ban T. Reciprocal influences of the ventromedial and lateral hypothalamic nuclei on blood glucose level and liver glycogen content. *Nature* 210: 1178–1179, 1966.
 42. Soriguer F, Garrido-Sanchez L, Garcia-Serrano S, Garcia-Almeida JM, Garcia-Arnes J, Tinahones FJ, and Garcia-Fuentes E. Apelin levels are increased in morbidly obese subjects with type 2 diabetes mellitus. *Obes Surg* 19: 1574–1580, 2009.
 43. Sunter D, Hewson AK, and Dickson SL. Intracerebroventricular injection of apelin-13 reduces food intake in the rat. *Neurosci Lett* 353: 1–4, 2003.
 44. Taheri S, Murphy K, Cohen M, Sujkovic E, Kennedy A, Dhillon W, Dakin C, Sajedi A, Ghatei M, and Bloom S. The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 1208–1212, 2002.
 45. Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, Kumaki I, Zhang W, Kumano K, and Fujimiya M. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept* 99: 87–92, 2001.
 46. Tiraby C, Tavernier G, Capel F, Mairal A, Crampes F, Rami J, Pujol C, Boutin JA, and Langin D. Resistance to high-fat-diet-induced obesity and sexual dimorphism in the metabolic responses of transgenic mice with moderate uncoupling protein 3 overexpression in glycolytic skeletal muscles. *Diabetologia* 50: 2190–2199, 2007.
 47. Valle A, Hoggard N, Adams AC, Roca P, and Speakman JR. Chronic central administration of apelin-13 over 10 days increases food intake, body weight, locomotor activity and body temperature in C57BL/6 mice. *J Neuroendocrinol* 20: 79–84, 2008.
 48. Yi CX, Serlie MJ, Ackermans MT, Foppen E, Buijs RM, Sauerwein HP, Fliers E, and Kalsbeek A. A major role for perifornical orexin neurons in the control of glucose metabolism in rats. *Diabetes* 58: 1998–2005, 2009.
 49. Yue P, Jin H, Aillaud-Manzanera M, Deng AC, Azuma J, Asagami T, Kundu RK, Reaven GM, Quatermous T, and Tsao PS. Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E59–67, 2010.
 50. Zhong JC, Yu XY, Huang Y, Yung LM, Lau CW, and Lin SG. Apelin modulates aortic vascular tone via endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway in diabetic mice. *Cardiovasc Res* 74: 388–395, 2007.

Address correspondence to:

Dr. Claude Knauf
Université Paul Sabatier
Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC)
CHU Rangueil
1 Avenue Jean Poulhes
BP 84225
31432 Toulouse Cedex 4
France

E-mail: claud.knauf@inserm.fr

Date of first submission to ARS Central, July 6, 2010; date of final revised submission, February 25, 2011; date of acceptance, March 13, 2011.

Abbreviations Used

aCSF = artificial cerebrospinal fluid
ARC = arcuate nucleus
DM = dorsomedian hypothalamus
eNOS = endothelial nitric oxide synthase
HD = high dose
HFD = high-fat diet
i.c.v. = intracerebroventricular
ITT = insulin tolerance test
KO = knock-out
LD = low dose
L-NMMA = NG-monomethyl-L-arginine
nNOS = neuronal nitric oxide synthase
NO = nitric oxide
NOS = nitric oxide synthase
OGTT = oral glucose tolerance test
SNAP = S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine
VMH = ventromedian hypothalamus

3) Discussion et perspectives

Cette étude a permis de mettre en évidence pour la première fois un rôle important de l'apeline centrale dans la régulation du métabolisme glucidique en conditions physiologiques et physiopathologiques, avec des effets dose-dépendants et en relation avec le statut nutritionnel de l'animal.

La partie de notre étude menée sur des souris normopondérales a montré que la présence de faibles taux d'apeline au niveau central exerce des effets bénéfiques sur le métabolisme glucidique en condition nourrie. Plus précisément, nous avons observé chez les animaux ayant reçu ce traitement une diminution de la glycémie, associée à une augmentation de la tolérance au glucose et à l'insuline. Ces résultats suggèrent premièrement que l'apeline centrale soit impliquée de façon physiologique dans la régulation du métabolisme glucidique. Dans nos travaux, nous avons entrepris de mesurer les variations des taux circulants d'apeline sur une période de 24 heures chez des souris normopondérales. Les résultats obtenus montrent une augmentation de l'apelinémie des animaux en période nocturne, c'est-à-dire lors de la période de prise alimentaire des rongeurs. De façon intéressante, l'augmentation des taux d'apeline est corrélée avec l'augmentation de l'insulinémie. Ainsi, nous pouvons proposer qu'en réponse à l'arrivée de glucose au niveau sanguin suite à une prise alimentaire, la production d'apeline soit stimulée par l'insuline et qu'une partie de l'apeline puisse atteindre l'hypothalamus, « mimant » ainsi les effets de l'injection de faible taux d'apeline au niveau central, et agissant en synergie avec l'insuline afin de permettre une assimilation correcte du glucose. Dans ce travail, nous n'avons pas étudié de façon spécifique la variation des taux centraux d'apeline entre une condition de jeûne et une condition nourrie et ne pouvons donc exclure une augmentation directe de la production centrale d'apeline en réponse à une prise alimentaire.

Nous montrons également dans nos travaux l'établissement d'effets totalement opposés en condition de jeûne lorsque les taux centraux d'apeline sont plus importants. Dans ces conditions, les animaux présentent une hyperglycémie associée à une hyperinsulinémie. Les mêmes effets sont retrouvés chez des animaux obèses et diabétiques tandis que, dans ce modèle, les effets

bénéfiques de faibles taux d'apeline sont supprimés. Ces résultats suggèrent donc qu'une augmentation des taux hypothalamiques d'apeline puisse potentiellement participer à la mise en place du diabète de type II. Dans nos travaux, la mesure des variations de l'apelinémie sur une période de 24 heures montre que, chez les animaux obèses et diabétiques, les taux circulants d'apeline sont fortement augmentés et n'évoluent plus en fonction de la prise alimentaire. Ce résultat est en accord avec plusieurs études qui ont déjà décrit une augmentation de ces taux dans des situations pathologiques comportant un fort risque d'installation de diabète de type II telles que l'obésité ^{490,491}. Ainsi, l'augmentation de l'apelinémie résultant du fort développement de la masse adipeuse pourrait contribuer à cette augmentation centrale des taux d'apeline en condition d'obésité. Cette hypothèse considère toutefois que l'apeline périphérique soit capable d'atteindre l'hypothalamus, ce qui n'a pour l'instant jamais été clairement mis en évidence. Quelques données peuvent toutefois appuyer cette hypothèse. Higuchi *et al* ⁴⁸⁸ ont rapporté qu'un traitement de 14 jours à l'apeline injectée par voie intra-péritonéale entraîne une augmentation des taux d'apeline dans l'hypothalamus. Par ailleurs, des expériences préliminaires de notre laboratoire menées sur des souris délétées pour le gène de l'apeline ont également permis de détecter ce peptide au niveau hypothalamique après une injection périphérique. L'apeline pourrait aussi avoir une origine extra-adipocytaire. En effet, Reaux *et al* ⁴⁶¹ ont montré que ce peptide est également produit par les neurones à POMC de l'hypothalamus. Dans la même étude, les auteurs rapportent qu'en condition d'obésité, la production d'apeline par ces neurones est augmentée chez le rat comme chez la souris ce qui entraîne une augmentation des taux hypothalamiques d'apeline. Ainsi, de nouvelles études sont à mener afin d'identifier de manière précise la part de chaque organe producteur dans l'augmentation des taux centraux en conditions d'obésité. Le développement d'animaux invalidés de façon tissu-spécifique pour le gène de l'apeline sera d'une grande aide dans la réalisation de cette étape. Nous travaillons actuellement à la génération d'animaux délétés spécifiquement au niveau de l'hypothalamus pour le gène de l'apeline. Un tel modèle animal existe déjà pour l'expression hypothalamique de la leptine ⁴²¹, utilisant le système Cre-Lox avec la recombinaison Cre placée sous la dépendance du promoteur Nkx2.1, spécifique de l'hypothalamus ⁴⁹². Par

ailleurs, par l'utilisation du même système, nous cherchons également à générer des animaux ayant perdu le gène de l'apeline spécifiquement au sein du tissu adipeux en plaçant à cet effet la recombinaison *Cre* sous la dépendance du promoteur *aP2*⁴⁹³, majoritairement spécifique de l'adipocyte⁴⁹⁴.

Nous avons réalisé un marquage immunohistochimique de l'expression du proto-oncogène *c-Fos* au sein de 3 régions hypothalamiques fortement impliquées dans la régulation du métabolisme glucidique (noyau arqué, noyau ventromédian et noyau dorsomédian) après l'injection centrale d'apeline. De cette façon, nous avons pu mettre en évidence une activation différentielle de ces régions en fonction de la quantité d'apeline injectée et du statut nutritionnel de l'animal. Cependant, nous ne sommes pas actuellement en mesure de discerner une activation directe d'un noyau par l'apeline, d'une activation indirecte qui serait la conséquence de la modification de l'activité de neurones appartenant à un noyau voisin. Des travaux sont en cours au laboratoire afin de réaliser une injection intra-structurale d'un lentivirus permettant de surexprimer l'apeline au niveau de différents noyaux hypothalamiques de notre choix. Les résultats de ces manipulations permettront alors sans doute de pouvoir approfondir nos connaissances sur les implications exactes des différents noyaux hypothalamiques dans l'établissement des effets bénéfiques et délétères résultant de nos injections centrales d'apeline.

La diversité de ces effets ainsi que l'activation différente des noyaux hypothalamiques mis en évidence par nos travaux suggèrent que l'apeline puisse activer 2 voies de signalisation différentes selon la quantité d'apeline présente. L'utilisation d'une méthode de détection ampérométrique en temps réel et d'outils pharmacologiques nous a permis d'impliquer le NO hypothalamique en tant qu'acteur majeur de la mise en place des effets bénéfiques observés chez les animaux normoponderaux nourris. L'utilisation de souris *eNOS* *-/-* nous a permis d'impliquer plus particulièrement le NO produit par cette synthase puisque ces animaux restent insensibles à de faibles taux icv d'apeline. De façon intéressante, chez ces animaux génétiquement modifiés et également lorsque la *eNOS* hypothalamique est pharmacologiquement inhibée chez des animaux sains, les effets délétères d'une forte dose d'apeline sont également retrouvés en condition nourrie. Ce résultat suggère donc qu'un

tonus basal de production hypothalamique de NO est nécessaire à l'effet « hypoglycémiant » de l'apeline et renforce son rôle clef dans la régulation de l'homéostasie glucidique. Dans ce sens, Shankar *et al*¹⁹⁸ avaient déjà montré que l'inhibition pharmacologique de la production hypothalamique de NO génèrait une insulino-résistance. Par ailleurs, les animaux eNOS -/- présentent d'importantes altérations de l'homéostasie énergétique, notamment une résistance à l'insuline. Cette capacité de l'apeline à engendrer une production de NO était déjà connue puisque plusieurs travaux avaient montré une activation de la eNOS^{471,495,496}. La protéine eNOS est moins exprimée et moins active dans l'hypothalamus de souris obèses et diabétiques¹⁹⁷. Cette observation peut permettre d'expliquer la disparition des effets bénéfiques de faibles taux d'apeline hypothalamique chez des souris obèses et diabétiques. En revanche, les effets délétères d'une injection icv de forts taux d'apeline sont maintenus chez les animaux obèses et diabétiques et également chez les souris eNOS -/- suggérant que le NO n'est pas impliqué dans ces effets.

L'identification des mécanismes et des acteurs impliqués dans la mise en place de ces effets délétères en réponse à de forts taux d'apeline font actuellement l'objet de recherches au sein du laboratoire. L'établissement rapide des conséquences périphériques de l'injection centrale d'une forte dose d'apeline suggère fortement l'implication du système nerveux autonome. L'apparition précoce d'une hyperglycémie (dès 15 minutes après l'injection) ainsi que son maintien dans le temps (durant 180 minutes) en condition de jeûne laisse penser à une modulation nerveuse de l'activité hépatique, seul organe capable de produire une quantité aussi importante de glucose dans ces conditions. Appuyant cette hypothèse, le foie est un organe richement innervé⁴⁹⁷ et la stimulation électrique du système nerveux sympathique est capable d'entraîner en moins de 30 secondes une augmentation de l'activité de certaines enzymes glycolytiques comme la glycogène phosphorylase et la glucose-6-phosphatase⁴⁹⁸. Ce contrôle nerveux de l'activité enzymatique résulte en une diminution du contenu hépatique en glycogène moins de 5 minutes après la stimulation. Dans des temps plus longs, cette stimulation des fibres sympathiques du système nerveux autonome active le processus de néoglucogénèse, notamment *via* une augmentation de l'activité de la PEPCK

⁴⁹⁹. Prises ensemble, ces données mènent à s'intéresser à l'étude d'une possible stimulation par l'apeline centrale des mécanismes hépatiques de production de glucose que sont la glycogénolyse et la néoglucogénèse. L'implication du système nerveux autonome dans la mise en place de cet effet hyperglycémiant de forts taux d'apeline au niveau central doit également être étudiée, soit par la mesure directe de l'activité du système nerveux autonome en réponse à l'injection d'apeline, soit par l'utilisation d'animaux dénervés localement au niveau hépatique. L'injection de forts taux d'apeline au niveau central entraîne également une hyperinsulinémie périphérique. Ainsi, l'hypothèse de l'existence d'un axe apeline hypothalamique / pancréas n'est pas à exclure. Toutefois, avant de tenter de mettre en évidence l'existence de cet axe, il conviendra de vérifier que cette hyperinsulinémie n'est pas une simple conséquence de la stimulation de la production hépatique de glucose par l'apeline. Pour cela, le modèle d'animaux localement dénervés pourra être utilisé.

Les prochains travaux devront également déterminer l'acteur moléculaire impliqué dans l'établissement de ces effets délétères. Certaines données préliminaires laissent actuellement penser à l'implication des espèces actives de l'oxygène. Ces dérivés oxygénés présentent un intérêt tout particulier du fait de leur production exacerbée en condition d'obésité ³⁰⁵, de leur implication déjà montrée au niveau hypothalamique dans la régulation de l'homéostasie glucidique ³⁰² et des travaux de Yao *et al* ⁵⁰⁰ démontrant la capacité de l'apeline à augmenter leur production sur des neurones en culture. Par ailleurs, les EAOs produites au niveau central ont déjà été montrées dans certains cas comme capables d'augmenter l'activité du système nerveux sympathique ^{501,502} et, de façon très intéressante, les rats Zucker obèses, caractérisés par une production exacerbée d'EAOs au niveau hypothalamique ³⁰⁵ présentent un tonus sympathique plus élevé que leurs homologues sains ^{503,504}. Certains de ces dérivés oxygénés ont également la capacité d'inhiber la production de NO, notamment par l'inactivation de cofacteurs indispensables à la eNOS ⁵⁰⁵, et pourraient donc contribuer à l'inhibition de la voie « bénéfique » de l'apeline centrale. Si l'implication des EAOs est avérée, il sera alors important de connaître par quel(s) moyen(s) l'apeline est capable de stimuler leur production.

Dans ce cadre, l'étude de l'activité mitochondriale en réponse à la forte dose d'apeline sera une étape importante du fait, d'une part, de la forte production d'EAOs par cet organite et, d'autre part, de la capacité, montrée par notre équipe, de l'apeline à augmenter le nombre et l'activité des mitochondries au niveau musculaire⁴⁸⁹.

III. Article 2 : L'inflammation du jéjunum observée chez la souris obèse et diabétique altère la détection intestinale du glucose et modifie la production hypothalamique de NO

1) Introduction

La communication établie entre l'intestin et le cerveau dans le cadre de la détection de glucose au niveau intestinal est une étape importante de la régulation de l'homéostasie glucidique. En effet, la présence de glucose dans l'intestin entraîne l'activation de certaines voies hypothalamiques permettant notamment d'augmenter la sensibilité périphérique à l'insuline et de favoriser le stockage de ce glucose sous forme de glycogène au niveau musculaire, effet altéré en condition d'obésité et de diabète^{373,393}.

Un acteur hypothalamique majeur dans la mise en place de ces effets est le NO. Cet acteur central est très important dans la régulation centrale de l'homéostasie glucidique puisque le blocage de sa production à ce niveau entraîne l'établissement d'une hyperglycémie et d'une insulino-résistance¹⁹⁸. Ainsi, nous avons voulu savoir si l'altération de la détection intestinale du glucose chez les obèses pouvait être liée à une modification de la libération hypothalamique de NO dans de telles conditions. Pour cela, nous avons utilisé des souris normopondérales et des souris *Db/Db*, génétiquement obèses et diabétiques du fait de l'absence de récepteurs à la leptine fonctionnels. Dans ces 2 modèles, nous avons mesuré en temps réel directement dans l'hypothalamus la production de NO en réponse à une injection intra-gastrique d'une solution de glucose stimulant spécifiquement et uniquement les senseurs intestinaux, sans entraîner de variations de la glycémie³⁷³. De cette façon, nous avons observé que la détection de glucose au niveau intestinal entraînait une augmentation significative de la fréquence de production du NO au niveau hypothalamique uniquement chez les animaux sains, phénomène totalement altéré dans notre modèle d'obésité. Nous avons montré que ces animaux obèses présentaient également au niveau intestinal une augmentation du stress oxydant et du stress du réticulum endoplasmique. Nous proposons donc que,

du fait de ces altérations, l'intestin puisse participer également à l'établissement de pathologies métaboliques telles que le diabète de type II.

Jejunum Inflammation in Obese and Diabetic Mice Impairs Enteric Glucose Detection and Modifies Nitric Oxide Release in the Hypothalamus

Thibaut Duparc,^{1,2} Damien Naslain,³ André Colom,^{1,2} Giulio G. Muccioli,⁴ Nicolas Massaly,^{1,2} Nathalie M. Delzenne,³ Philippe Valet,^{1,2} Patrice D. Cani,^{3,*} and Claude Knaut^{1,2,*}

Abstract

Intestinal detection of nutrients is a crucial step to inform the whole body of the nutritional status. In this paradigm, peripheral information generated by nutrients is transferred to the brain, which in turn controls physiological functions, including glucose metabolism. Here, we investigated the effect of enteric glucose sensors stimulation on hypothalamic nitric oxide (NO) release in lean or in obese/diabetic (*db/db*) mice. By using specific NO amperometric probes implanted directly in the hypothalamus of mice, we demonstrated that NO release is stimulated in response to enteric glucose sensors activation in lean but not in *db/db* mice. Alteration of gut to hypothalamic NO signaling in *db/db* mice is associated with a drastic increase in inflammatory, oxidative/nitric oxide (iNOS, IL-1 β), and endoplasmic reticulum stress (*CHOP*, *ATF4*) genes expression in the jejunum. Although we could not exclude the importance of the hypothalamic inflammatory state in obese and diabetic mice, our results provide compelling evidence that enteric glucose sensors could be considered as potential targets for metabolic diseases. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 415–423.

Introduction

INTERORGAN COMMUNICATIONS are essential to maintain glucose homeostasis (35). The brain, and more particularly the hypothalamus, receives various metabolic signals from peripheral organs through humoral and neuronal pathways. Consequently, abnormal responses to hypothalamic neurons may cause the appearance of metabolic syndrome (9, 18, 25). The gut is the first that can detect variations of nutrients and is now considered a key partner in the control of glucose homeostasis. Intra-gastric injection of a low dose of glucose, which activates only enteric sensors, stimulates muscle glycogen synthesis through a hypothalamic glucagon-like peptide-1 (GLP-1)/neuropeptide-Y pathway. Moreover, high-fat-fed mice failed to respond to the intra-gastric glucose load, suggesting alterations of enteric glucose detection or hypothalamic response or both (18).

Chronic inflammation and endoplasmic reticulum (ER) stress are closely associated with metabolic syndrome, as revealed by high-fat-fed (31, 36) and transgenic diabetic/obese

mice models (16). *db/db* mice treated with an anticancer agent had reduced ER stress in liver and adipose tissue associated with an increase in insulin sensibility (15). Suppression of proinflammation in *db/db* mice treated with a phosphodiesterase inhibitor ameliorates the diabetic state (26).

One of the molecular actors of inflammation is nitric oxide (NO). Depending on the level of NO secreted by the cells, this gaseous diffusible factor may have physiological benefits (2, 34) or deleterious effects on type 2 diabetes (23). Interestingly, low concentrations of NO, as induced by activation of constitutive nitric oxide synthase (NOS), protect against ER stress, as opposed to massive NO release by iNOS (11). NOS is expressed in the hypothalamus (2, 13), and several elements implicate "peripheral signals- to hypothalamic NO- to peripheral tissues" in the control of glucose homeostasis. First, blockade of NOS activities in the brain of rodents induces hyperglycemia and insulin resistance (32). Second, hypothalamic NO could be considered a potential target of peripheral hormones (including insulin and GLP-1) to control arterial blood flow and insulin sensitivity (1, 2). Third,

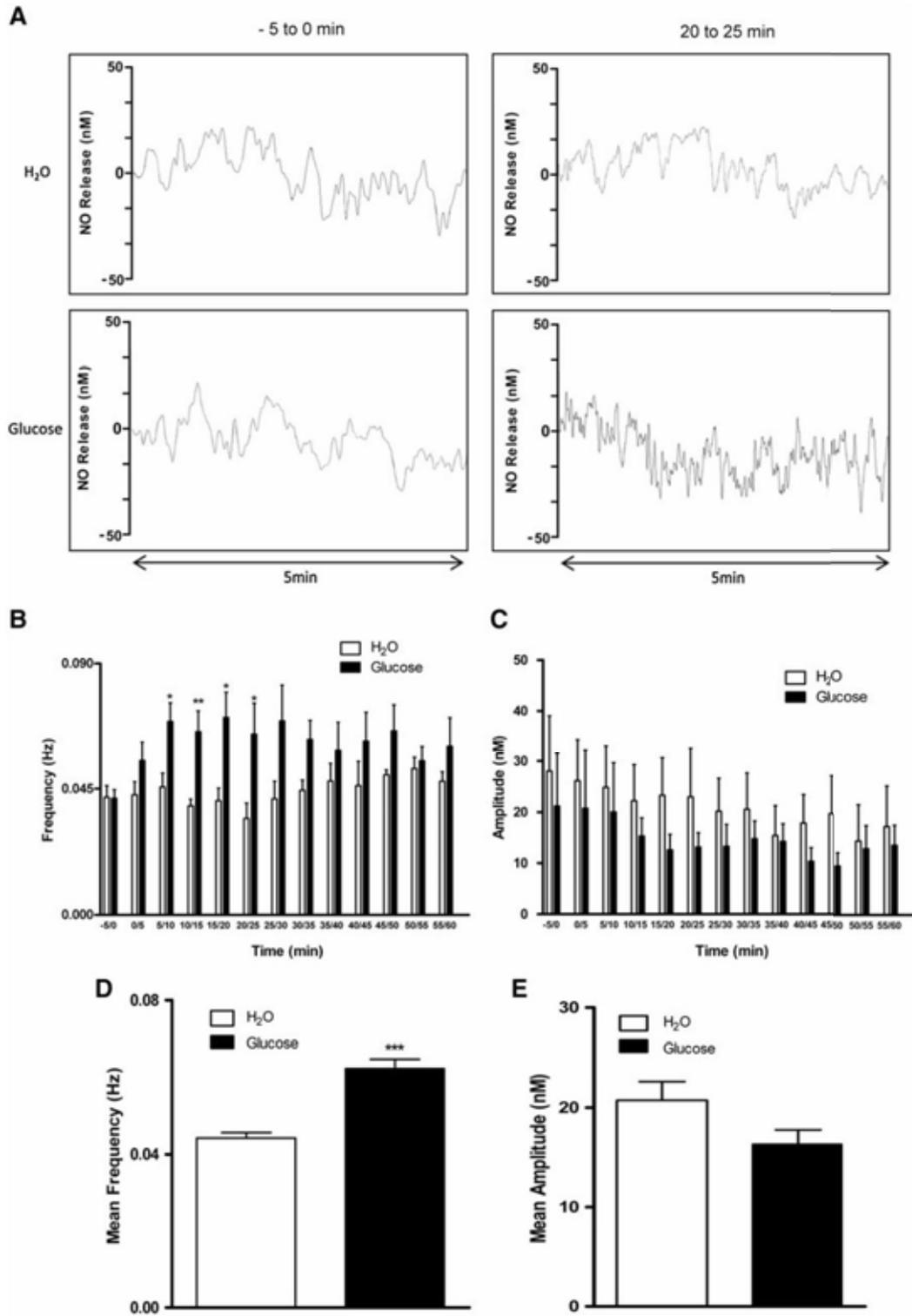
¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Toulouse, France.

²Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil, Toulouse, France.

³Université catholique de Louvain, Louvain Drug Research Institute, LDRI, Metabolism and Nutrition group research, Brussels, Belgium.

⁴Université catholique de Louvain, Louvain Drug Research Institute, LDRI, Bioanalysis and Pharmacology of Bioactive Lipids laboratory, Brussels, Belgium.

*These authors contributed equally to this work.



we previously demonstrated that intracerebroventricular insulin increases the hypothalamic activity of AMPK (27), an upstream enzyme of NOS activity that contributes to increased glucose uptake in muscles (10, 22). Fourth, intestinal glucose sensors modulate peripheral glucose utilization in muscles via a hypothalamic GLP-1 pathway (18), which may control hypothalamic NO release (1). Thus, we can speculate that hypothalamic NO could be identified as a target for enteric glucose detection.

The first objective of the study was to investigate the potential modification of hypothalamic NO release in response to enteric glucose detection in lean and obese diabetic (*db/db*) mice. Then, we evaluated inflammation or ER stress markers or both in the gut and brain of *db/db* mice in our experimental model. Our work provides new potential targets, including gut ER stress and inflammation, for the treatment of type 2 diabetes and obesity.

Materials and Methods

Mice

C57Bl6/J mice and 6-week-old male *db/db* mice (C57BL/BKS *Lepr^{db}*) were obtained from Charles River Laboratory (Charles River, Bruxelles, Belgium). All use of animals was approved by and in accordance with the local ethics committee, and housing conditions were as specified by the National Institute of Medical Research (INSERM) and by the local ethical committee of the IFR-BMT or Belgian Law of November 14, 1993, on the protection of laboratory animals (agreement no. LA 1230314).

Mice were housed conventionally in a constant temperature (20–22°C) and humidity (50–60%) animal room and with a 12/12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) and free access to food (control diet, A04; Villemoisson sur Orge, France) and water. All injections and experiments were performed in 13- to 15-week-old males.

Surgical procedures

Under anesthesia (ketamine/xylazine, 100 and 10 mg/kg, i.p., respectively), a catheter was inserted into the stomach. In brief, a 4-mm laparotomy was performed on the left side of the abdomen, and the stomach was gently extracted. One centimeter of a Teflon catheter was inserted into the stomach and secured by surgical glue (Histoacryl; 3M Health Care, St. Paul, MN). The other extremity of the catheter was tunneled under the skin and exteriorized at the back of the neck (18). After a 1-week recovery period, hypothalamus amperometric measurements were performed in mice.

Real-time amperometric NO measurements

After 6 h of fasting, mice were anesthetized with ketamine/xylazine (100 and 10 mg/kg, i.p., respectively). A 1-cm midline incision was made across the top of the skull, and the animal was placed on a stereotaxic apparatus, as described previously (17). An NO-specific amperometric probe [ISO-NOPF100; diameter of 100 μ m and length of 5 mm; World Precision Instruments (WPI), Sarasota, FL] was implanted directly in the hypothalamus of the mice, and NO release was monitored. Three major hypothalamic regions implicated in the control of glucose homeostasis (arcuate nucleus, and the dorsomedial and ventromedial hypothalamus) were targeted by the probe (stereotaxic coordinates are chosen based on the length and the diameter of the probe: 1.3 mm posterior to the bregma, –0.3 mm lateral to the midline, and 5.0 mm below the surface of the skull). The concentration of NO gas in the tissue was measured in real time with the data-acquisition system LabTrax (WPI) connected to the free radical analyzer Apollo1000 (WPI). Data acquisition and analysis were performed with DataTrax2 software (WPI), as previously used (13). In brief, frequency and amplitude were calculated every 5 min during 60 min with DataTrax2 software. Brain coronal section slices, 35 μ m thick, were used to check the probe position after recording. Results are presented as mean \pm SEM. Calibration of the electrochemical sensor was performed by the use of different concentrations of a nitrosothiol donor *S*-nitroso-*N*-acetyl-*D,L*-penicillamine (Sigma), as previously described in detail (20). Typical amperometric graphs are represented in Fig. 1A and Fig. 2A, in which the hypothalamic baseline NO level is represented as an arbitrary value (0 nM). During amperometric measurement, animals were infused with a low rate of glucose (10 mg/kg/min) or water into the stomach (time 0). This rate represents one-half of the endogenous glucose production over a short period, which allows the stimulation of the enteric sensor without inducing systemic hyperglycemia (18). We previously reported that the injected volume of water or glucose (100 μ l/10 min) minimizes gastric distention; furthermore, we previously demonstrated that water is the vehicle of choice for glucose administration (18). As we demonstrated that intragastric perfusion of water did not modify *c-Fos* expression (a marker of neuronal activity) in the hypothalamus, as compared with NaCl (0.9%), all control groups were infused with water, as previously described in detail (18).

TBARS and NO products

The jejunum tissue oxidative stress level was evaluated by measuring lipid peroxidation and reactive compounds, such as malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE),

FIG. 1. Enteric glucose sensors stimulation increases hypothalamic NO release in lean control mice. (A) Typical graph of amperometric NO measurement obtained from *in vivo* hypothalamus of control mice perfused with water or glucose. NO is measured in real time by using a specific amperometric probe implanted directly in the hypothalamus of anesthetized mice. (B) Effect of intragastric glucose perfusion on NO-release frequency. Stimulation of enteric glucose sensors increases hypothalamic NO release in response to glucose (dark bar, $n = 7$) as compared with water (white bar, $n = 7$) in control mice. (C) Effect of intragastric glucose perfusion on NO-release frequency. Stimulation of enteric glucose sensors increases hypothalamic NO release in response to glucose as compared with water in control mice. (D) Effect of intragastric glucose perfusion on mean NO-release amplitude. No significant difference was observed concerning NO-release amplitude in the two groups. (E) Effect of intragastric glucose perfusion on mean NO-release amplitude. No significant difference was observed concerning NO-release amplitude in the two groups. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ are significantly different from lean mice according to the two-tailed Student *t* test analysis.

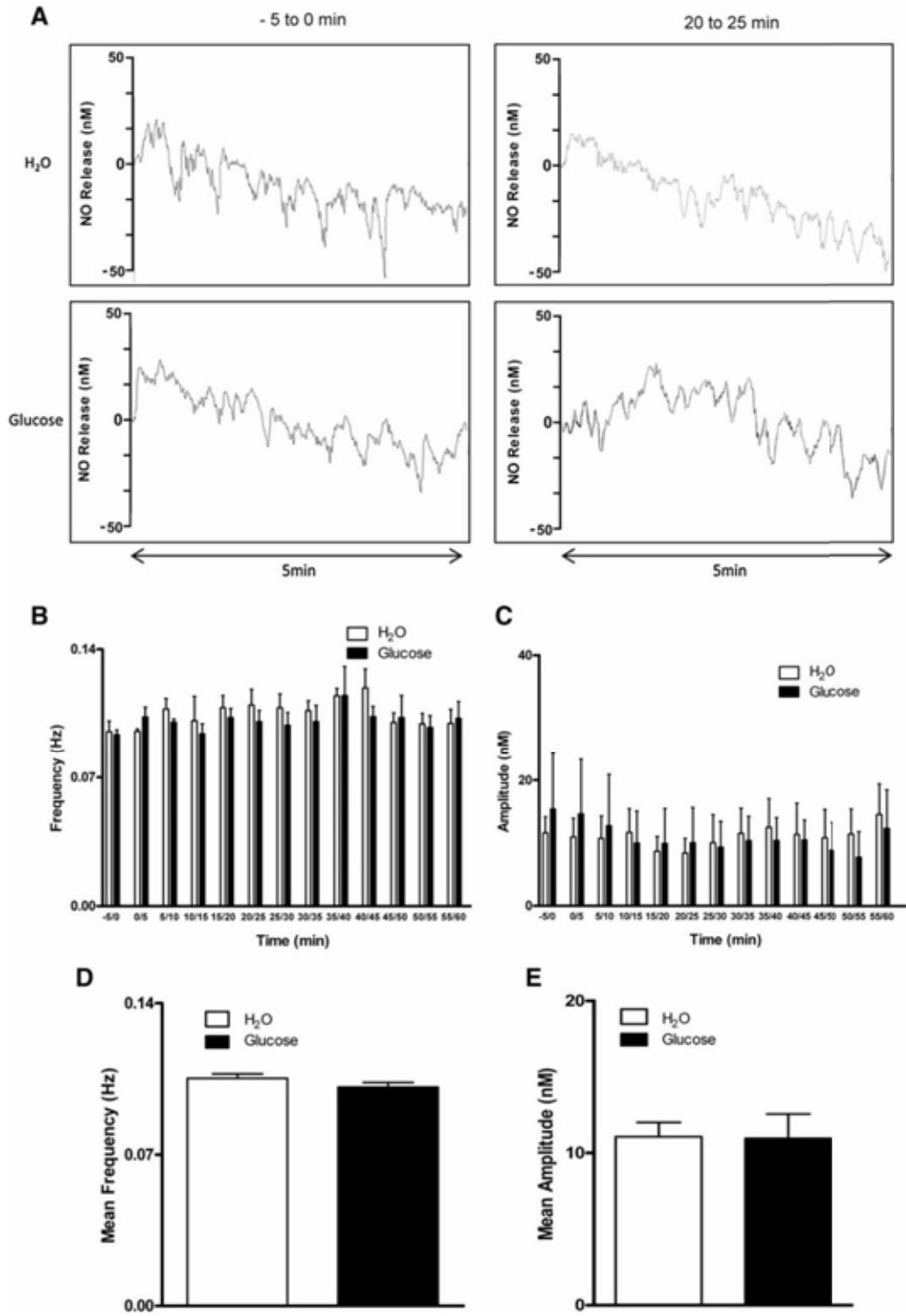


TABLE 1. PRIMER SEQUENCES FOR TARGETED MOUSE GENES

	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
IL-1	TCGCTCAGGGTCACAAGAAA	CATCAGAGGCAAGGAGGAAAAC
TNF α	TGGGACAGTGACCTGGACTGT	TTCGGAAAGCCATTGAGT
COX2	TGACCCCCAAGGCTCAAATAT	TGAACCCAGGTCCCTCGCTTA
NADPH oxidase	TTGGGTCAGCACTGGCTCTG	TGGCGGTGTGCAGTGTATC
iNOS	AGGTACTCAGCGTGCTCCAC	GCACCGAAGATATCTTCATG
CHOP	CCTAGCTTGGCTGACAGAGG	CTGCTCCTTCTCCTTCATGC
ATF4	GAGCTTCTGAACAGCGAAGTG	TGGCCACCTCCAGATAGTCATC
RPL-19	GAAGGTCAAAGGGAATGTGTCA	CCTGTCTGCCTTCAGCTTGT

natural by-products of lipid peroxidation, as previously described (33).

Jejunum nitrate and nitrite concentrations were measured by using a colorimetric assay kit according to the manufacturer instructions (Cayman, Tallinn, Estonia). In brief, 100 mg jejunum was homogenized in 1 ml PBS (pH 7.4) and centrifuged at 20,000 g for 30 min. Supernatant was filtered by using a 30-kDa molecular mass cut-off filter (Amicon ultra, centrifugal filters, 30 kDa; Millipore) at 4,500 g for 30 min. Nitrates were converted into nitrites by using nitrate reductase followed by the addition of the Griess Reagents, which convert nitrite into a colored end-product.

Dissection of hypothalamus and jejunum

Mice were anesthetized (ketamine/xylazine, IP, 100 and 10 mg/kg, respectively) after a 5-h period of fasting. Mice were killed by cervical dislocation. The jejunum was immediately removed and washed with PBS; the hypothalamus was harvested; both tissues were immersed in liquid nitrogen and stored at -80°C , for further analysis.

qPCR

Total RNA from tissues was prepared by using the TriPure reagent (Roche, Basel, Switzerland) as described (4, 5). cDNA was synthesized by using a reverse transcription kit (Promega, Madison, WI) from 1 μg of total RNA. Real-time polymerase chain reactions (PCRs) were performed with a StepOnePlus instrument, and software (Applied Biosystems, Foster City, CA) by using Mesa Fast qPCR (Eurogentec, Seraing, Belgium), as described (5, 21). RPL-19 RNA was chosen as an invariant standard. All tissues were run in duplicate in a single 96-well reaction plate (MicroAmp Optical; Applied Biosystems), and data were analyzed according to the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method. The identity and purity of the amplified product were checked through analysis of the melting curve carried out at the end of amplification. Primer sequences for the targeted mouse genes are presented in Table 1.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Differences between two groups were assessed by using the unpaired two-tailed Student's *t* test. Correlations were analyzed by using Pearson's correlation. Data were analyzed by using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results

Enteric glucose sensors stimulation induces hypothalamic NO release in wild-type mice

Hypothalamic NO is known to be involved in the control of glucose homeostasis. To determine whether enteric glucose sensors stimulation affects NO hypothalamic activity, we monitored the real-time hypothalamic NO release in response to intragastric glucose perfusion. As shown in Fig. 1A–E, the frequency of NO release is significantly increased during the measuring time frame from 5 to 25 min intragastric perfusion (Fig. 1B). Then, NO pulse frequencies return to basal values until the end of recording (60 min) (Fig. 1B). The amplitude of the NO pulse does not vary during the experiment (Fig. 1C). Intragastric glucose perfusion increases the mean frequency of NO release (~ 1.5 -fold; Fig. 1D) but not the mean amplitude (Fig. 1E) during the hour of the experiment. These result suggest that NO could be a major hypothalamic partner of enteric glucose sensors to modulate peripheral responses.

The brain–gut axis in *db/db* mice prevents the physiologic hypothalamic NO release in response to enteric glucose sensors stimulation

Because we observed that diabetic mice present an altered c-Fos expression that is associated with impaired muscle glucose utilization (18), we measured the effect of enteric glucose sensors stimulation on hypothalamic NO release in *db/db* mice (Fig. 2A–E). Stimulation of enteric glucose sensors

FIG. 2. Enteric glucose sensors stimulation does not modify hypothalamic NO release in *db/db* mice. (A) Typical graph of amperometric NO measurement obtained from *in vivo* hypothalamus of *db/db* mice perfused with water or glucose. NO is measured in real time by using a specific amperometric probe implanted directly in the hypothalamus of anesthetized mice. (B) Effect of intragastric glucose perfusion on NO-release frequency. No significant difference was observed concerning NO-release frequency between water (white bar, $n = 4$) and glucose (dark bar, $n = 4$) perfused mice. (C) Effect of intragastric glucose perfusion on NO-release amplitude. No significant difference was observed concerning NO-release amplitude between groups. (D) Effect of intragastric glucose perfusion on mean NO-release frequency. No significant difference was observed concerning NO-release frequency between water- and glucose-perfused mice. (E) Effect of intragastric glucose perfusion on mean NO-release amplitude. No significant difference was observed concerning NO-release amplitude between groups.

in *db/db* mice fails to increase hypothalamic NO release (Fig. 2A). Basal NO frequency (mean = 0.105 ± 0.002 Hz; Fig. 2B and D) appears to be more elevated than that in control mice. Converse to that in lean control mice, no significant variation is observed after glucose perfusion in either amplitude or frequency of NO release in *db/db* mice (Fig. 2B–E). These data suggest that the brain–gut axis is disturbed in obese genetically modified mice, and hypothalamic NO release seems to be deeply impaired.

Obese and diabetic mice exhibited intestinal oxidative and inflammatory stress

To assess whether the altered gut-to-brain axis could be associated with increased metabolic stresses, we investigated several markers of ROS/RNS, inflammation, and ER stress in the jejunum. We found that obese and diabetic mice exhibited sevenfold higher intestinal iNOS mRNA levels and a 40% increase of interleukin (IL)-1 β mRNA expression (Fig. 3A and B). ER stress markers were significantly increased in *db/db* mice with a twofold increase for CHOP and 60% higher ATF4 mRNA concentration (Fig. 4A and B). NADPH oxidase and COX2 were not significantly different between groups (Fig. 3C and D). In addition, ROS and RNS quantification revealed a trend to a higher oxidative stress measured by lipid peroxidation TBARS (lean, 11.20 ± 1.36 ; *db/db*, 15.10 ± 1.29

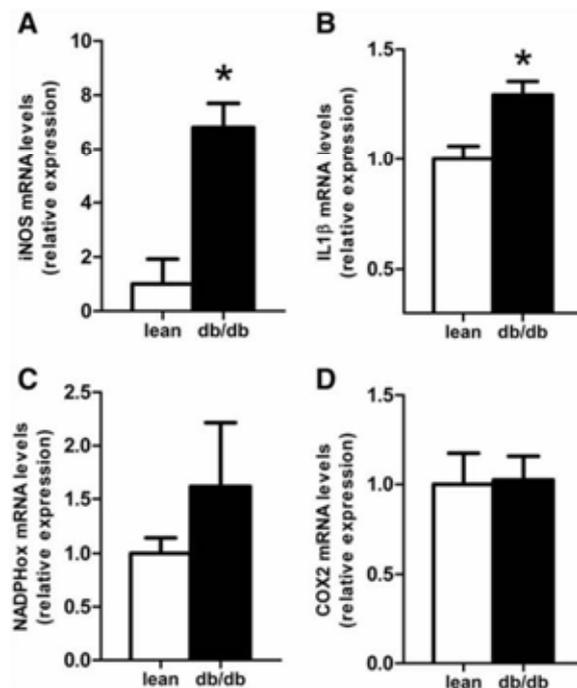


FIG. 3. Increased oxidative and inflammatory stress in the jejunum of obese and diabetic mice. Jejunum oxidative stress markers: (A) iNOS, (C) NADPHox, and (D) COX2 mRNA concentrations, and inflammation marker: (B) IL-1 mRNA concentrations in *db/db* mice (*db/db*, $n = 6$) or lean control mice (lean, $n = 6$). Data are expressed as mean \pm SEM. *Significantly different ($p < 0.05$) from lean mice according to the two-tailed Student *t* test analysis.

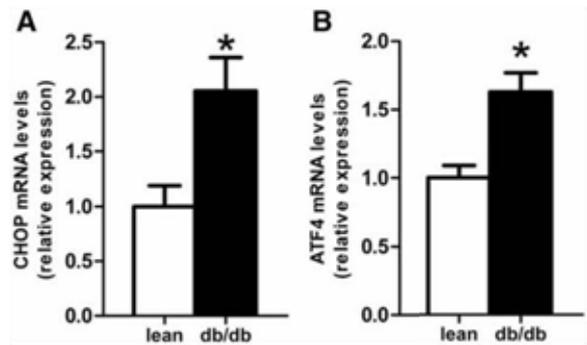


FIG. 4. Higher intestinal endoplasmic reticulum stress markers in obese and diabetic mice. Jejunum reticulum endoplasmic stress markers: (A) CHOP, (B) ATF4 mRNA concentrations in *db/db* mice (*db/db*, $n = 5$) or lean control mice (lean, $n = 6$). Data are expressed as mean \pm SEM. *Significantly different ($p < 0.05$) from lean mice according to the two-tailed Student *t* test analysis.

pmol/mg of proteins; $p = 0.06$) and NO-derived products ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) (lean, 2.046 ± 0.30 ; *db/db*, 4.284 ± 1.25 pmol/mg of proteins; $p = 0.07$). Altogether, these data suggest that obese and diabetic mice could develop increased intestinal metabolic and cellular stresses.

Obese and diabetic mice exhibited hypothalamus inflammation and minor ROS/RNS stress

To ascertain whether the development of ER, ROS, or RNS stress found in the gut would also be involved in the alteration of intestinal to brain glucose detection, we measured metabolic stress markers in the hypothalamus. Strikingly, we did not find any changes in the ROS/RNS and ER stress markers (Fig. 5A–D), except for a 10% increase in CHOP mRNA, whereas inflammatory markers were significantly increased, as shown by the 50% and twofold higher IL-1 β and tumor necrosis factor (TNF)- α , respectively (Fig. 6A and B).

Therefore, we propose that the major alteration of glucose detection occurs first in the peripheral tissues (*i.e.*, in the gut), thus affecting the gut-to-brain axis. However, we cannot rule out that the hypothalamic inflammatory/ER stress process could also be part of this phenomenon.

Discussion

The present study was designed (a) to investigate *in vivo* the role of intestinal glucose sensing in hypothalamic NO secretion; and (b) to study the link between peripheral and central markers of metabolic stresses and the glucose-induced hypothalamic NO release. To achieve this, we set up a novel method to measure *in vivo* and in real-time conditions hypothalamic NO production after intragastric glucose administration. This original procedure has the advantage of being the only way to measure NO in real time. This gaseous neurotransmitter has a very short half-life (~ 5 s) and is usually studied by using indirect detection.

With our technique, we found that in physiologic conditions, intragastric administration of a low dose of glucose profoundly changes hypothalamic NO production and release, with specific modulation of the NO-release frequency.

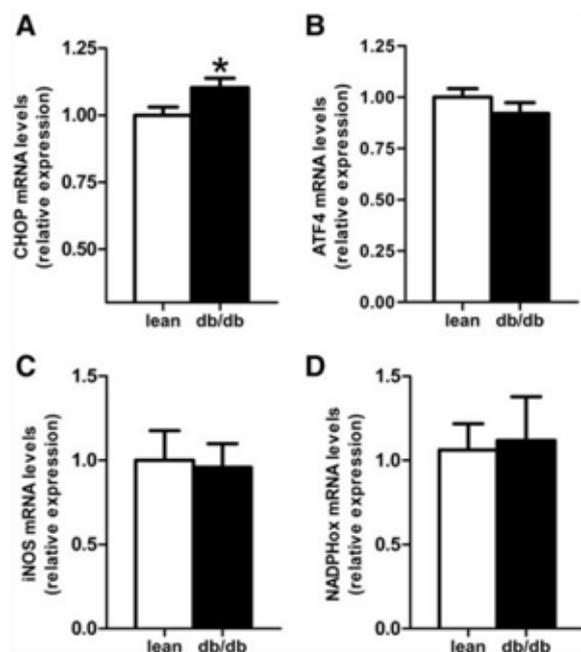


FIG. 5. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress markers in the hypothalamus of obese and diabetic mice. Hypothalamus ER stress markers: (A) CHOP, (B) ATF4 mRNA concentrations, and oxidative markers: (C) iNOS and (D) NADPHox mRNA concentrations in *db/db* mice (*db/db*, *n* = 6) or lean control mice (lean, *n* = 6). Data are expressed as mean \pm SEM. *Significantly different ($p < 0.05$) from lean mice according to the two-tailed Student *t* test analysis.

These findings support the link between intestinal glucose detection and specific brain activity devoted to physiologic response to a meal. Among the hypotheses that could explain the disruption in glucose homeostasis control in obesity and type 2 diabetes, an alteration of the gut-to-brain axis has been proposed (8). Here, we demonstrate *in vivo* that obese and diabetic mice are unable to respond to intestinal glucose administration, as shown by the disrupted glucose-induced hypothalamic NO secretion. These data strongly suggest the existence of a disrupted intestinal glucose sensing or central nervous system integration of the glucose-dependent signals arriving from the gut, or both. Further to explore this question, we investigated inflammatory, endoplasmic reticulum, and reactive oxygen-dependent stresses in the intestine of obese and diabetic mice. In accordance with our hypothesis, we found that *db/db* mice exhibit an increase in oxidative (iNOS), inflammation (IL- β), and endoplasmic reticulum (CHOP, ATF4) markers in the gut. Strikingly, these markers were only slightly affected in the hypothalamus of the same animals. To date, the specific role of the gut versus the brain in glucose detection and metabolic responses is poorly defined. Several studies have suggested that high-fat feeding induces an increase in brain cytokine levels, resulting in central inflammation (28), and stimulates apoptosis of hypothalamic neurons (24). Moreover, hypothalamic NO and reactive oxygen species have been shown to participate to the physiologic control of glucose homeostasis (2, 7, 13). Several recent reports

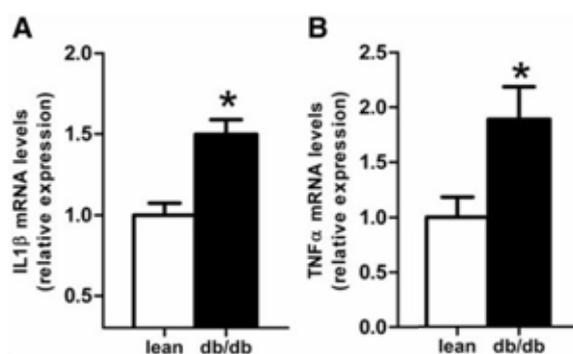


FIG. 6. Increased inflammatory stress in the hypothalamus of obese and diabetic mice. Hypothalamus inflammation marker: (A) TNF- α and (B) IL-1 β mRNA concentrations in *db/db* mice (*db/db*, *n* = 6) or lean control mice (lean, *n* = 6). Data are expressed as mean \pm SEM. *Significantly different ($p < 0.05$) from lean mice according to the two-tailed Student *t* test analysis.

have shown the involvement of redox signaling in the control of glucose homeostasis. For instance, Colombani *et al.* (7) showed that impaired hypothalamic regulation of glucose sensing is specifically associated with mitochondrial dysfunction, leading to abnormal redox signaling (7). Moreover, the same group proposed that hypothalamic redox signaling could be involved in the molecular impairment of brain glucose sensing and might explain some features of the metabolic defects in obese rodents (7). Finally, Powell *et al.* (30) demonstrated that chronic high-glucose levels, those found during diabetes, increase iNOS promoter activity in intestinal epithelial cells, a phenomenon tightly linked with inflammatory cytokines and oxidative stress. Therefore, it is noteworthy that the chronic hyperglycemia found during diabetes triggers inflammatory and oxidative stress in the gastrointestinal tract, leading to the alteration of glucose detection and the gut-to-brain axis.

In the present study, we found a slightly increase in hypothalamic oxidative stress associated with obesity and diabetes. However, we found that the intestinal glucose-induced hypothalamic NO response was strongly affected in obese and diabetic conditions. We postulate that the development of intestinal cellular stress participates in the alteration of the brain NO-dependent glucose sensing. Moreover, basal hypothalamic NO release frequency is higher in *db/db* mice than in controls (Fig. 1B vs. Fig. 2B). This result reinforces the importance of a frequency-encoding system of NO release to maintain an adapted brain response. Altered basal NO release observed in *db/db* mice characterizes deep changes of hypothalamus activity, which may be influenced by peripheral signals, including hormones and afferent nerves. NO, which is a molecule with pleiotropic effects in the brain, could be the target of numerous factors. Depending on the brain region and NO concentration, NO can both stimulate and inhibit the release of a particular transmitter (12). Low doses of NO are generally associated with beneficial effects in the brain, including neurotransmitters release and neuronal survival (14). However, in pathophysiologic conditions, high levels of NO increase cell damage, as observed in neurologic disorders such as Parkinson and Alzheimer diseases (14). In our *db/db*

model, we can speculate that overproduction of NO can be due to nNOS activation after persistent stimulation of excitatory amino acid receptors mediating glutamate toxicity or to iNOS induction by diverse stimuli, such as endotoxin or cytokines, or both (6). In accordance with this hypothesis, we observed in this study that IL-1 β and TNF- α mRNA expressions are increased in the hypothalamus of *db/db* mice in association with altered NO basal release. Hence, hypothalamic NO could be one of the molecular actors that control neuronal activity. A clear link has been established between c-Fos expression (a marker of neuronal activity) and NO, because this gas is able to modulate neuronal activity in discrete nuclei of the hypothalamus (29). Moreover, we previously demonstrated that stimulation of enteric glucose sensors modifies c-Fos expression in the hypothalamus (18).

Thus, among the tissues involved in the development of whole-body metabolic stresses found during obesity and type 2 diabetes, our present and previous studies support the key role of the gut in the control of glucose homeostasis (3–5). Regardless of the triggering factors (inflammatory, ER stress, ROS/RNS) involved in such altered metabolism, the gut-to-brain axis remains an attractive target to dissect the mechanisms contributing to the control of glucose homeostasis in physiologic and pathologic conditions (18, 19).

In conclusion, we report here for the first time the *in vivo* measurement of hypothalamic NO production after peripheral glucose administration. In addition, we found that intestinal ROS/RNS, inflammation, and ER stress could be associated with the disruption of the detection of peripheral glucose involved in the gut-to-brain axis. Therefore, we propose that, in addition to the well-characterized metabolic disturbance found in liver, muscles, and adipose tissues, the gut should be part of the picture, as this organ is responsible for glucose detection and sends signals to the central nervous system and peripheral organs to respond physiologically to the entrance of glucose into the organism. Finally, intestinal inflammatory, oxidative, and ER stresses observed during obesity and type 2 diabetes are putative therapeutic targets.

Acknowledgments

The skillful help of O. Guillemot-Legrès is acknowledged. PDC is a research associate of the FRS-FNRS (Fonds de la recherche scientifique, Belgique). PDC is supported by grants from SFD (Société francophone du diabète). NMD and PDC are supported by FSR (Fonds spéciaux de recherches) and FRS-FNRS grants. CK is supported by grants from SFN (Société Française de Nutrition).

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Cabou C, Campistron G, Marsollier N, Leloup C, Cruciani-Guglielmacci C, Penicaud L, Drucker DJ, Magnan C, and Burcelin R. Brain glucagon-like peptide-1 regulates arterial blood flow, heart rate, and insulin sensitivity. *Diabetes* 57: 2577–2587, 2008.
- Cabou C, Cani PD, Campistron G, Knauf C, Mathieu C, Sartori C, Amar J, Scherrer U, and Burcelin R. Central insulin regulates heart rate and arterial blood flow: an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism altered during diabetes. *Diabetes* 56: 2872–2877, 2007.
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmee E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrieres J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, and Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1761–1772, 2007.
- Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, and Burcelin R. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57: 1470–1481, 2008.
- Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, Geurts L, Naslain D, Neyrinck A, Lambert DM, Muccioli GG, and Delzenne NM. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58: 1091–1103, 2009.
- Chabrier PE, Demerle-Pallardy C, and Auguet M. Nitric oxide synthases: targets for therapeutic strategies in neurological diseases. *Cell Mol Life Sci* 55: 1029–1035, 1999.
- Colombani AL, Carneiro L, Benani A, Galinier A, Jaillard T, Duparc T, Offer G, Lorisignol A, Magnan C, Casteilla L, Penicaud L, and Leloup C. Enhanced hypothalamic glucose sensing in obesity: alteration of redox signaling. *Diabetes* 58: 2189–2197, 2009.
- Das UN. Obesity: Genes, brain, gut, and environment. *Nutrition* 26: 459–473, 2010.
- Dietrich MO and Horvath TL. Feeding signals and brain circuitry. *Eur J Neurosci* 30: 1688–1696, 2009.
- Dray C, Knauf C, Daviaud D, Waget A, Boucher J, Buleon M, Cani PD, Attane C, Guigne C, Carpenne C, Burcelin R, Castan-Laurell I, and Valet P. Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 8: 437–445, 2008.
- Eizirik DL, Cardozo AK, and Cnop M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev* 29: 42–61, 2008.
- Feil R and Kleppisch T. NO/cGMP-dependent modulation of synaptic transmission. *Handb Exp Pharmacol* 84: 529–560, 2008.
- Fioramonti X, Marsollier N, Song Z, Fakira KA, Patel RM, Brown S, Duparc T, Pica-Mendez A, Sanders NM, Knauf C, Valet P, McCrimmon RJ, Beuve A, Magnan C, and Routh VH. Ventromedial hypothalamic nitric oxide production is necessary for hypoglycemia detection and counterregulation. *Diabetes* 59: 519–528, 2010.
- Guix FX, Uribealago I, Coma M, and Munoz FJ. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol* 76: 126–152, 2005.
- Han MS, Chung KW, Cheon HG, Rhee SD, Yoon CH, Lee MK, Kim KW, and Lee MS. Imatinib mesylate reduces endoplasmic reticulum stress and induces remission of diabetes in *db/db* mice. *Diabetes* 58: 329–336, 2009.
- Hotamisligil GS. Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes. *Int J Obes (Lond)* 32 (suppl 7): S52–S54, 2008.
- Knauf C, Cani PD, Ait-Belgnaoui A, Benani A, Dray C, Cabou C, Colom A, Uldry M, Rastrelli S, Sabatier E, Godet N, Waget A, Penicaud L, Valet P, and Burcelin R. Brain glucagon-like peptide 1 signaling controls the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and reduces energy expenditure. *Endocrinology* 149: 4768–4777, 2008.

18. Knauf C, Cani PD, Kim DH, Iglesias MA, Chabo C, Waget A, Colom A, Rastrelli S, Delzenne NM, Drucker DJ, Seeley RJ, and Burcelin R. Role of central nervous system glucagon-like peptide-1 receptors in enteric glucose sensing. *Diabetes* 57: 2603–2612, 2008.
19. Knauf C, Cani PD, Perrin C, Iglesias MA, Maury JF, Bernard E, Benhamed F, Gremeaux T, Drucker DJ, Kahn CR, Girard J, Tanti JF, Delzenne NM, Postic C, and Burcelin R. Brain glucagon-like peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage. *J Clin Invest* 115: 3554–3563, 2005.
20. Knauf C, Prevot V, Stefano GB, Mortreux G, Beauvillain JC, and Croix D. Evidence for a spontaneous nitric oxide release from the rat median eminence: influence on gonadotropin-releasing hormone release. *Endocrinology* 142: 2343–2350, 2001.
21. Knauf C, Rieusset J, Foretz M, Cani PD, Uldry M, Hosokawa M, Martinez E, Bringart M, Waget A, Kersten S, Desvergne B, Gremlich S, Wahli W, Seydoux J, Delzenne NM, Thorens B, and Burcelin R. Peroxisome proliferator-activated receptor- α -null mice have increased white adipose tissue glucose utilization, GLUT4, and fat mass: role in liver and brain. *Endocrinology* 147: 4067–4078, 2006.
22. Li J, Hu X, Selvakumar P, Russell RR 3rd, Cushman SW, Holman GD, and Young LH. Role of the nitric oxide pathway in AMPK-mediated glucose uptake and GLUT4 translocation in heart muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E834–E841, 2004.
23. Martyn JA, Kaneki M, and Yasuhara S. Obesity-induced insulin resistance and hyperglycemia: etiologic factors and molecular mechanisms. *Anesthesiology* 109: 137–148, 2008.
24. Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, Pauli JR, Romanatto T, Carvalheira JB, Oliveira AL, Saad MJ, and Velloso LA. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One* 4: e5045, 2009.
25. Obici S. Minireview: molecular targets for obesity therapy in the brain. *Endocrinology* 150: 2512–2517, 2009.
26. Park SY, Shin HK, Lee JH, Kim CD, Lee WS, Rhim BY, and Hong KW. Cilostazol ameliorates metabolic abnormalities with suppression of proinflammatory markers in a db/db mouse model of type 2 diabetes via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcription. *J Pharmacol Exp Ther* 329: 571–579, 2009.
27. Perrin C, Knauf C, and Burcelin R. Intracerebroventricular infusion of glucose, insulin, and the adenosine monophosphate-activated kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside, controls muscle glycogen synthesis. *Endocrinology* 145: 4025–4033, 2004.
28. Pistell PJ, Morrison CD, Gupta S, Knight AG, Keller JN, Ingram DK, and Bruce-Keller AJ. Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *J Neuroimmunol* 219: 25–32.
29. Popeski N and Woodside B. Effect of nitric oxide synthase inhibition on fos expression in the hypothalamus of female rats following central oxytocin and systemic urethane administration. *J Neuroendocrinol* 13: 596–607, 2001.
30. Powell LA, Warpeha KM, Xu W, Walker B, and Trimble ER. High glucose decreases intracellular glutathione concentrations and upregulates inducible nitric oxide synthase gene expression in intestinal epithelial cells. *J Mol Endocrinol* 33: 797–803, 2004.
31. Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X, and Li X. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab* 9: 327–338, 2009.
32. Shankar R, Zhu J, Ladd B, Henry D, Shen H, and Baron A. Central nervous system nitric oxide synthase activity regulates insulin secretion and insulin action. *J Clin Invest* 102: 1403–1412, 1998.
33. Sohet FM, Neyrinck AM, Dewulf EM, Bindels LB, Portois L, Malaisse WJ, Carpentier YA, Cani PD, and Delzenne NM. Lipid peroxidation is not a prerequisite for the development of obesity and diabetes in high-fat-fed mice. *Br J Nutr* 102: 462–469, 2009.
34. Song D, Yao R, and Pang CC. Altered vasodilator role of nitric oxide synthase in the pancreas, heart and brain of rats with spontaneous type 2 diabetes. *Eur J Pharmacol* 591: 177–181, 2008.
35. Yamada T, Oka Y, and Katagiri H. Inter-organ metabolic communication involved in energy homeostasis: potential therapeutic targets for obesity and metabolic syndrome. *Pharmacol Ther* 117: 188–198, 2008.
36. Ye R, Jung DY, Jun JY, Li J, Luo S, Ko HJ, Kim JK, and Lee AS. Grp78 heterozygosity promotes adaptive unfolded protein response and attenuates diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 59: 6–16.

Address correspondence to:
 Claude Knauf
 I2MR, IFR BMT, BP 84225
 31432 Toulouse Cedex 4
 France

E-mail: claud.knauf@inserm.fr

Date of first submission to ARS Central, May 26, 2010; date of acceptance, June 27, 2010.

Abbreviations Used

4-HNE = 4-hydroxynonenal
 ATF4 = activating transcription factor 4
 CHOP = CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein
 COX 2 = cyclooxygenase 2
 ER = endoplasmic reticulum
 GLP-1 = glucagon-like peptide-1
 IL-1 = interleukin-1
 iNOS = inducible nitric oxide synthase
 LPS = lipopolysaccharide
 MDA = malondialdehyde
 NADPH = nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
 NO = nitric oxide
 NOS = nitric oxide synthase
 RNS = reactive nitrogen species
 ROS = reactive oxygen species
 RPL19 = 60S ribosomal protein L19
 TBARS = thiobarbituric acid-reactive substances
 TNF- α = tumor necrosis factor alpha

3) Discussion et perspectives

Ce travail présente pour la première fois l'observation *in vivo* de la modification de la production hypothalamique de NO en réponse à la détection intestinale de glucose chez des souris saines, ainsi que son altération chez des souris génétiquement obèses *Db/Db*. Ce modèle animal présente en effet plusieurs altérations pouvant modifier la détection du glucose, tant au niveau central⁵⁰⁶ qu'au niveau intestinal⁴⁶⁴. Par ailleurs, l'article présenté ici renforce également l'importance de l'axe intestin/cerveau dans la régulation de l'homéostasie glucidique. Nos résultats suggèrent en effet une altération du fonctionnement de cet axe en condition d'obésité, phénomène qui a été proposé comme pouvant participer à l'apparition du diabète de type II⁵⁰⁷. Toutefois, il reste encore à déterminer de façon claire si cette altération résulte d'un seul dysfonctionnement de la détection du glucose au niveau intestinal, si elle est le fruit d'une mauvaise intégration des signaux envoyés par l'intestin au niveau de l'hypothalamus ou si ces 2 dysfonctionnements coexistent.

Les données obtenues par la mesure de l'expression de marqueurs du stress du réticulum endoplasmique tels que CHOP et ATF4 et la mesure du niveau de peroxydation lipidique comme marqueur du stress oxydatif au niveau de l'intestin et de l'hypothalamus tendent à penser qu'il s'agirait plutôt d'une altération localisée au niveau intestinal. En effet, l'expression de ces marqueurs est augmentée de façon bien plus importante au niveau de l'intestin qu'au niveau de l'hypothalamus. De plus, l'expression de ces derniers est connue comme étant capable de perturber la régulation du métabolisme glucidique. En effet, Kaser *et al*²⁷⁰ ont rapporté en 2008 que l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique au niveau de l'intestin suffisait à déclencher une réponse inflammatoire, qui est corrélée à l'établissement de l'insulinorésistance chez la souris⁵⁰⁸. Concernant l'augmentation des marqueurs du stress oxydatif, bien que celle-ci puisse en partie résulter de l'inflammation déclenchée par la réponse UPR mise en place lors d'un stress du réticulum endoplasmique⁵⁰⁹, certaines études ont montré au niveau intestinal qu'un stress oxydatif pouvait parfois précéder l'établissement de la réponse inflammatoire⁵¹⁰. Par ailleurs, il a

récemment été montré qu'une augmentation de la peroxydation lipidique au niveau du jéjunum perturbe l'homéostasie glucidique en diminuant la tolérance au glucose⁵¹¹. Dans cette étude, les auteurs mettent notamment en évidence une diminution de l'activation afférente du nerf vague en réponse à une injection intra-gastrique de glucose lorsque la peroxydation est importante. Ces données confortent donc l'idée qu'un dysfonctionnement intestinal suffit à perturber l'axe intestin/cerveau et à induire de fait des altérations de la régulation de l'homéostasie glucidique.

Toutefois, nous avons également retrouvé une légère inflammation hypothalamique dans notre modèle animal génétiquement obèse. Bien que celle-ci soit beaucoup moins marquée qu'au niveau intestinal, nous ne pouvons donc pas exclure de façon certaine une participation de l'hypothalamus à la dérégulation de la détection intestinale du glucose mise en évidence dans ce travail. Plusieurs études ont d'ailleurs déjà rapporté qu'une inflammation uniquement localisée au niveau hypothalamique suffisait à perturber des paramètres importants tels que la prise alimentaire et la sensibilité hypothalamique à l'action de l'insuline et de la leptine^{294,295}. Notre travail montre également une altération de la production de NO hypothalamique dans notre modèle *Db/Db*. D'une part, la fréquence de production basale est augmentée chez les animaux obèses, et, d'autre part, n'est pas modifiée en réponse à la détection de glucose au niveau intestinal contrairement à ce qui est observé chez des animaux sains. Ce phénomène pourrait être lié à une activation constante de l'axe intestin/cerveau par l'intestin en raison des altérations moléculaires qui le touchent, menant alors à une production constante de NO au niveau hypothalamique. Toutefois, il est aussi possible d'imaginer que l'inflammation hypothalamique observée suffit à activer une réponse immunitaire impliquant la production de NO. Dans ce cadre, un candidat potentiel est l'enzyme iNOS. Cette synthase est présente au niveau central⁵¹² et est induite en réponse à différents facteurs tels que des cytokines inflammatoires⁵¹³. La production de NO consécutive à son activation hypothalamique pourrait alors expliquer la production basale plus élevée et masquer une augmentation physiologiquement induite par la détection de glucose intestinal.

Ainsi, la suite de ce travail devra s'attacher à déterminer plus finement l'importance de chacune de ces altérations. Dans ce but, l'inhibition du stress du réticulum endoplasmique *via* l'utilisation d'agents pharmacologiques tels que l'acide tauroursodeoxycholique⁵¹⁴ chez notre modèle *Db/Db* et la mesure de la libération hypothalamique de NO en réponse à la stimulation des glucosenseurs intestinaux pourra être d'une aide précieuse pour mesurer l'implication de ce phénomène. De la même façon, l'administration de molécules antioxydantes^{305,515} ou la surexpression d'enzymes antioxydantes^{516,517,518} à l'aide de modèles transgéniques ou d'adénovirus dans le même modèle permettra de diminuer, voire de supprimer, le stress oxydatif et de conclure sur l'importance de son rôle. Toutefois, ces manipulations ne permettront pas de conclure sur l'origine principale de l'altération de ce mécanisme. Pour discriminer la part des altérations intestinales de celle des altérations hypothalamiques, il faudrait pouvoir déclencher *in vivo* et de manière tissu-spécifique une réponse UPR ou un stress oxydatif. A ce jour, aucune étude n'a encore utilisé un tel protocole et la mise au point de celui-ci permettrait une importante avancée dans la compréhension des mécanismes responsables des perturbations de l'axe intestin/cerveau. Une possibilité éventuelle serait de réaliser une perfusion intragastrique chronique de faible taux de tunicamycine, agent inducteur de stress du réticulum endoplasmique, à l'aide de minipompes osmotiques. L'évaluation et la validation de ce protocole seront très prochainement commencées au sein du laboratoire.

IV. Conclusion générale

Les pathologies métaboliques et cardiovasculaires qui résultent du surpoids et de l'obésité sont responsables, selon l'OMS, de près de la moitié des décès enregistrés au niveau mondial. La forte augmentation de la prévalence de ces pathologies durant les dernières années et les prévisions alarmantes pour les décennies à venir en font de nos jours un problème mondial de santé publique.

Les autorités sanitaires ont notamment commencé à s'interroger sur les raisons qui ont permis cette progression épidémiologique. D'une part, les changements technologiques, économiques et sociologiques survenus au cours des derniers siècles ont entraîné une sédentarité croissante des populations et la réduction concomitante de la dépense énergétique. D'autre part, ces bouleversements ont également été associés à un changement qualitatif et quantitatif des modes d'alimentation, résultant en une plus grande densité énergétique et une augmentation de la taille des portions alimentaires⁵¹⁹. Toutefois, ces données ne semblent pas pouvoir expliquer, à elles seules, une telle progression de ce phénomène. Il est notamment de plus en plus démontré une composante génétique dans la prise de poids. En effet, plus d'une cinquantaine de gènes différents ont été rapportés comme étant directement associés à des phénotypes d'obésité, et plusieurs gènes de prédisposition à l'obésité ont également été identifiés^{520,521}.

L'obésité et le surpoids sont donc des perturbations multifactorielles de l'homéostasie énergétique. La compréhension parfaite des mécanismes participant à cette régulation est donc fondamentale afin de proposer des traitements préventifs et/ou thérapeutiques. Certains traitements existent actuellement mais restent pour certains extrêmement invasifs et, de manière plus générale, contraignants pour les personnes qui en bénéficient. De plus, ces traitements occultent totalement l'origine multifactorielle de la prise de poids et des pathologies qui en découlent. Un premier exemple type est la chirurgie bariatrique, qui consiste à restreindre l'absorption des aliments afin de diminuer l'apport calorique pour obtenir une perte de poids corporel. Cela passe par des opérations chirurgicales définitives et très lourdes visant à réduire le volume ou la vitesse de vidange de l'estomac, ou encore à dériver le tube digestif afin de

modifier le circuit alimentaire. Les travaux évoqués et présentés dans ce manuscrit ont mis en évidence une participation importante de l'intestin à la régulation de l'homéostasie énergétique et l'on peut se demander, malgré les résultats spectaculaires de ce type de chirurgie (perte de 40 à 75% de l'excès de poids corporel en fonction de la procédure et amélioration très rapide du diabète), si le fait d'isoler ou de diminuer cet organe ne risque pas de mener à de nouvelles perturbations physiologiques. Dans ce sens, plusieurs études ont montré une modification profonde du profil d'expression de plusieurs acteurs de la régulation de l'homéostasie énergétique suite à une opération bariatrique. En effet, après une telle chirurgie, les taux de ghréline sont diminués et l'on observe également une augmentation des taux d'hormones gastrointestinales comme le GLP-1 et la CCK^{522,523,524}. De plus, d'autres travaux ont rapporté une profonde modification de la flore intestinale suite à cette chirurgie⁵²⁵, et une étude récente a suggéré que cette importante modification du microbiote génère un environnement cytotoxique au niveau intestinal⁵²⁶. Les conséquences à long terme de l'ensemble de ces changements restent encore inconnues. Une autre alternative de traitement est la mise en place de mesures hygiéno-diététiques. Il s'agit d'une approche non pharmacologique comprenant principalement des changements d'habitudes alimentaires et la pratique régulière d'une activité physique. Une étude clinique américaine a permis d'évaluer l'efficacité de ces mesures et a montré que l'incidence du diabète était réduite de 58% chez les patients appliquant ces mesures⁵²⁷. Ce résultat montre donc que ces règles hygiéno-diététiques peuvent apporter de bons résultats. Toutefois, dans un grand nombre de cas, le fait que celles-ci s'avèrent souvent difficiles à mettre en place, et surtout à être maintenues sur le long terme les rend souvent insuffisantes.

Face à ces difficultés, les laboratoires pharmaceutiques tentent de développer des molécules anti-obésité et/ou anti-diabétiques dont la facilité d'utilisation et l'efficacité pourraient augmenter les chances de réussite du traitement. Certaines de ces molécules sont actuellement présentes dans l'éventail thérapeutique mais présentent encore plusieurs défauts. En effet, ces molécules ne prennent toujours pas en compte les multiples causes pouvant être responsables de l'obésité, et certaines d'entre elles sont responsables

d'effets indésirables tels que des troubles gastro-intestinaux, des prises de poids ou une augmentation des risques de maladies cardiovasculaires pouvant perturber le confort du patient et l'amenant à stopper son traitement. De façon plus grave, d'autres effets secondaires (apparition de cancers, états dépressifs menant au suicide,...) ont amené plusieurs de ces molécules, dont l'exemple le plus marquant est le Rimonabant, à être retirées du marché^{528,529}. Ces effets secondaires indésirables, indépendants des effets recherchés sur le métabolisme des patients et provenant des effets de la molécule sur d'autres régulations physiologiques, illustrent parfaitement l'importance de l'étude des communications inter-organes ainsi que la complexité de la régulation de l'homéostasie énergétique.

Cette complexité réside notamment dans la finesse et la diversité des mécanismes impliqués. Alors que le pancréas fût un temps considéré comme l'organe responsable de cette régulation, l'implication de plusieurs autres organes ainsi que leur communication est régulièrement mise en évidence depuis plusieurs années. L'élaboration d'un traitement thérapeutique visant à prévenir ou rétablir les altérations observées lors des pathologies métaboliques sans effet secondaire indésirable passe absolument par la compréhension la plus précise possible de l'ensemble de ces communications.

Le travail présenté dans ce manuscrit contribue à cette nécessité et apporte de nouvelles connaissances sur ces communications inter-organes dans le cadre de la régulation de l'homéostasie glucidique. Nous avons plus particulièrement axé nos recherches sur la mise en évidence et la compréhension des communications établies par le tissu adipeux et l'intestin avec l'hypothalamus, structure cérébrale essentielle au bon déroulement de l'homéostasie énergétique (et sur laquelle les potentiels effets secondaires de molécules pharmacologiques sont trop souvent inenvisagés). L'ensemble de ces travaux nous a également permis de renforcer l'implication du NO dans cette régulation tout en apportant des éléments nouveaux dans la compréhension des dysfonctionnements observés en condition d'obésité. Toutefois, de nombreux mécanismes restent encore à comprendre, justifiant donc de nouvelles études. Ces dernières devront être axées aussi bien sur les communications établies

par les organes périphériques entre eux que sur les communications établies par ces autres organes avec l'hypothalamus.

V. Annexes

Durant ces 3 années de doctorat, nous avons eu l'opportunité de participer à plusieurs autres travaux portant sur l'implication de l'hypothalamus dans le cadre de la régulation de l'homéostasie glucidique au travers de plusieurs collaborations scientifiques. Les publications résultant de ces collaborations sont présentées en annexes.

Le premier article présenté est un article de Colombani *et al*³⁰⁵, paru dans la revue *Diabetes* en 2009. Cette étude met en évidence l'implication d'une altération de la signalisation rédox-sensible dans l'hypersensibilité cérébrale au glucose observée chez le rat Zucker obèse.

Le deuxième article présente une étude menée par Fioramonti *et al*⁵³⁰ publiée également dans la revue *Diabetes* en 2010. Ce travail met notamment en évidence un rôle du NO hypothalamique dans la détection et la résolution de l'hypoglycémie cérébrale.

La dernière publication est une revue de Castan-Laurell *et al*⁵³¹ résumant l'état des connaissances actuelles sur les relations entre l'apeline, le diabète de type II et l'obésité. Les résultats de nos travaux concernant l'implication de l'apeline centrale dans la régulation de l'homéostasie glucidique y sont donc largement évoqués. Cette revue est parue en 2011 dans *Endocrine*.

Enhanced Hypothalamic Glucose Sensing in Obesity: Alteration of Redox Signaling

Anne-Laure Colombani,¹ Lionel Carneiro,¹ Alexandre Benani,¹ Anne Galinier,¹ Tristan Jaillard,¹ Thibaut Duparc,¹ Géraldine Offer,¹ Anne Lorsignol,¹ Christophe Magnan,² Louis Casteilla,¹ Luc Pénicaud,¹ and Corinne Leloup¹

OBJECTIVE—Recent data demonstrated that glucose sensing in different tissues is initiated by an intracellular redox signaling pathway in physiological conditions. However, the relevance of such a mechanism in metabolic disease is not known. The aim of the present study was to determine whether brain glucose hypersensitivity present in obese Zucker rats is related to an alteration in redox signaling.

RESEARCH DESIGN AND METHODS—Brain glucose sensing alteration was investigated in vivo through the evaluation of electrical activity in arcuate nucleus, changes in reactive oxygen species levels, and hypothalamic glucose-induced insulin secretion. In basal conditions, modifications of redox state and mitochondrial functions were assessed through oxidized glutathione, glutathione peroxidase, manganese superoxide dismutase, aconitase activities, and mitochondrial respiration.

RESULTS—Hypothalamic hypersensitivity to glucose was characterized by enhanced electrical activity of the arcuate nucleus and increased insulin secretion at a low glucose concentration, which does not produce such an effect in normal rats. It was associated with 1) increased reactive oxygen species levels in response to this low glucose load, 2) constitutive oxidized environment coupled with lower antioxidant enzyme activity at both the cellular and mitochondrial level, and 3) overexpression of several mitochondrial subunits of the respiratory chain coupled with a global dysfunction in mitochondrial activity. Moreover, pharmacological restoration of the glutathione hypothalamic redox state by reduced glutathione infusion in the third ventricle fully reversed the cerebral hypersensitivity to glucose.

CONCLUSIONS—The data demonstrated that obese Zucker rats' impaired hypothalamic regulation in terms of glucose sensing is linked to an abnormal redox signaling, which originates from mitochondria dysfunction. *Diabetes* 58:2189–2197, 2009

It is well established that the brain has a critical role in regulating the energy needs of the body (1). Both carbohydrate and lipid stores are monitored by the brain using metabolic, hormonal, and neural signals from the periphery (2,3). These signals enter the brain and trigger neuroendocrine and autonomic responses that maintain energy homeostasis (4,5). Among the metabolic signals, glucose has long been identified and the physiological relevance of hypothalamic glucose-responsive neurons has been directly demonstrated (6). The molecular mechanisms underlying the glucose responsiveness of neurons in the hypothalamus exhibit β -cell analogy involving GLUT2, glucokinase, and K_{ATP} channels (7–10). Recently, a novel signaling pathway involving mitochondrial reactive oxygen species (mROS) was identified (11–13). Both pancreatic and hypothalamic studies pointed to mROS as a necessary signal to initiate the response to “glucose sensing” (e.g., insulin secretion). These studies suggest that a finely controlled mROS production depending on mitochondrial activity might be considered as a master physiological messenger in metabolite-sensitive cells.

Obesity is a major health problem in Western societies coupled with a high risk of developing insulin resistance. Rodent experimental models of obesity display impaired metabolic and hormonal brain sensing (14). Recent work demonstrated that the alteration of the hypothalamic glucose-sensing mechanism was sufficient to induce dramatic effects on energy balance correlated to mitochondrial abnormalities (6,15). Zucker rats exhibit a strong presence of obesity and an insulin resistance with dramatic autonomic disturbances, that is, modification of the sympathovagal balance (16,17). This model is also characterized by cerebral hypersensitivity to glucose, which initiates an abnormal vagus-induced insulin secretion (18,19). In this study, we set out to determine the role of redox signaling in hypothalamic hypersensitivity to glucose in this model of obesity. In addition, hypothalamic electrical activity has been characterized and shown to be correlated to aberrant mROS levels, redox state, and mitochondrial activity. Finally, restoration of the redox state fully reversed the cerebral hypersensitivity to glucose.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Genetically obese (*fa/fa*) and lean (*Fa/?*) male Zucker rats (7 weeks old; Charles River) were housed in a controlled environment (12-h light/dark cycle, lights on at 7:00 A.M., 22°C) and fed ad libitum (Harlan, Gannat, France). Surgeries and experiments were performed under pentobarbital anesthesia (50 mg/kg, Centravet, Dinan, France) except where noted. All procedures involving rats were in accordance with the European Communities Council

From the ¹Métabolisme, Plasticité et Mitochondrie, Unité Mixte de Recherche 5241, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paul Sabatier, Toulouse, France; and the ²Physiopathologie de la Nutrition, Unité Mixte de Recherche 7050, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Denis Diderot, Paris, France.

Corresponding author: Corinne Leloup, leloup@cict.fr.

Received 25 January 2009 and accepted 22 June 2009.

Published ahead of print at <http://diabetes.diabetesjournals.org> on 6 July 2009.

DOI: 10.2337/db09-0110.

© 2009 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

diabetes.diabetesjournals.org

DIABETES, VOL. 58, OCTOBER 2009 2189

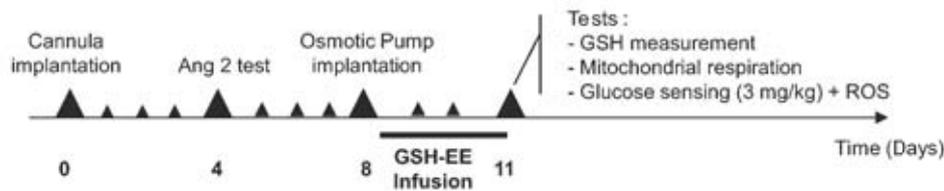


FIG. 1. Schematic representation of experimental procedure for reduced glutathione infusion (GSH-EE, reduced glutathione ethyl ester).

Directive (86/609/EEC) and reviewed by a local committee. All experiments were carried out after a period of 3 h fasting beginning at time of lights on. **Intracarotid injection of glucose toward the brain.** A catheter was inserted into the carotid artery and pushed on 5 mm in the cranial direction. A bolus of 3 or 9 mg/kg glucose in 100 μ l of adapted saline concentration was injected toward the brain in 30 s. Saline and glucose in saline solutions were equiosmolar (300 mOsm).

Neuronal activity recordings. Multiunit recordings within arcuate were made using a monopolar platinum electrode (Phymep, Paris, France) as previously described (20). Rats were placed in a stereotaxic apparatus (David Kopf), and arcuate nucleus was targeted according to coordinates obtained from Paxinos stereotaxic atlas: -3.1 mm posterior to bregma, -8.7 mm under the brain surface, and 0.4 mm from the midline. Action potentials were displayed and saved on a computer after initial amplification through a low-noise amplifier (BIO amplifier, AD Instrument, Rabat, France). Data were digitized with a PowerLab/4sp digitizer. Signals were amplified 10^5 and filtered at low and high frequency cutoffs of 100 and 1,000 Hz and monitored with the Chart 4 computer program. Baseline unit activity was recorded for 10 min before infusion of a compound. Multiunit recordings were made in response to a 100 μ l intracarotid ipsilateral injection of either saline or glucose.

Osmotic pump implantation. Cannula (Plastics one, Phymep) was targeted to the third ventricle (2.6 mm posterior to the bregma and 10.0 mm below the dura). Four days later, only rats with dipeptidic effects (angiotensin II, 60 pmol, 3 μ l; Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) were used for intracerebroventricular infusions. Four days later, the osmotic minipump (1 μ l/h, 3 days, model 1003D; Alzet, Charles River, St. Germain sur l'Arbresle, France) filled either with PBS-HEPES (5 mmol/l) or with glutathione (1 mol/l) (21) (Sigma-Aldrich) was implanted under isoflurane gas anesthesia. Experiments were performed 3 days later (Fig. 1).

Mitochondrial extraction. Animals were killed by cervical dislocation. Brains were removed and immediately immersed in ice-cold PBS-HEPES (5 mmol/l). Dissected tissues were immersed for 15 min in a buffer A (10 mmol/l HEPES, 10 mmol/l KCl, 240 mmol/l sucrose, protease inhibitor cocktail tablet [complete Mini; Roche, Meylan, France]) and homogenized with a dounce homogenizer (7.5 μ l/10 mg tissues of buffer A). The homogenate was resuspended in 125 μ l/10 mg tissues of buffer A and centrifuged (1,000 \times g, 10 min, 4°C). The supernatant was centrifuged (12,000 \times g, 10 min, 4°C). The remaining mitochondrial pellet was resuspended either in 8.2 μ l/10 mg tissues of buffer B (10 mmol/l HEPES, 420 mmol/l NaCl, 0.5 mmol/l Dithiothreitol, and protease inhibitor cocktail tablet) for Western blot analysis or in 16.5 μ l/10 mg tissues of Mitomed R05 solution (0.5 mmol/l EGTA, 60 mmol/l K-Lactobionate, 20 mmol/l Taurine, 10 mmol/l KH_2PO_4 , 3 mmol/l MgCl_2 , 110 mmol/l sucrose, 1 g/l free fatty acid BSA, 20 mmol/l HEPES, and pH = 7.1) for O_2 consumption measurement.

Immunoblotting analysis of respiratory chain complexes. Mitochondrial proteins (10 μ g) were separated on SDS-PAGE 15% for OXPHOS immunolabeling, using a cocktail of antibodies that recognizes respiratory chain complexes. After transfer onto a Hybond membrane (Amersham, GE Healthcare, Ramonville, France), blocking was performed for 1 h at room temperature in 5% nonfat milk prepared in Tris-buffered saline with tween 0.2%. Membranes were probed with 1/500 of mouse anti-OXPHOS (Mitosciences, Euromedex, Souffelweyersheim, France) overnight at 4°C. Specific bands of OXPHOS were detected using a goat anti-mouse peroxidase-conjugated secondary antibody (Amersham) and exposed to autoradiographic films. Immunolabeled bands were quantified from densitometry analysis.

O_2 consumption measurement on mitochondria. Oxygen consumption was measured using a respirometer (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) as previously described (22). Measurements were taken with stirring (750 rpm) in 2 ml of Mitomed R05 at 30°C. The medium was equilibrated with air for 30 min, and mitochondria (200 μ g) were transferred into the respirometer's glass chambers. Mitochondrial respiration was stimulated by the successive addition of substrates 1, 5, and 20 mmol/l glutamate to

achieve the apparent state 2. Then, 0.1 mmol/l ADP was added to achieve the apparent state 3 respirations. Next, 5 μ mol/l carboxy-atractylate (CAtr) was added to block ATP synthesis and achieve the apparent state 4 respiration. Finally, 1 μ mol/l potassium cyanide (KCN) was added to obtain the nonmitochondrial O_2 consumption. Mitochondrial states 2, 3, and 4 were calculated by subtracting the nonmitochondrial O_2 consumption from apparent states. The respiratory control ratio (RCR) was the state 3-to-state 4 ratio. Uncoupled respiration was assessed using glutamate (20 mmol/l), CAtr (5 μ mol/l), and palmitate (300 μ mol/l) stimulation. Carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP, 0.4 μ mol/l), a chemical uncoupler, was used to measure the maximal respiration. Oxygen consumption was calculated using DataGraph software. Media were prepared according to the guide provided by Oroboros Instruments. Technical sheets are available on the company Web site at <http://www.orooboros.at/>.

ROS level measurement. One minute after glucose injection, rats were decapitated, brains quickly removed, and hypothalamus and thalamus dissected on ice-cooled glass plate. Brain areas were immediately frozen in nitrogen liquid and stored at -80°C . ROS were assessed with the 2,7-dichlorofluorescein diacetate probe (23) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and quantified in a fluorescent plate reader at 535 nm under excitation at 490 nm using a microplate reader (Victor Wallace, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France).

Aconitase activity measurement. Maximum aconitase activity measurement was performed using a protocol already described (24). The photochrome was measured at 525 nm using the UVIKON Spectrophotometer 922.

Enzymatic and nonenzymatic antioxidant. Tissue pieces were homogenized in a lysis saline solution (3 mmol/l EDTA, 150 mmol/l KCl, and pH = 7.4). Homogenates (50 μ l) mixed with 450 μ l of 5% metaphosphoric acid were then centrifuged (1,500 \times g, 10 min, 4°C). Final supernatant was used for glutathione and antioxidant enzyme assays. Glutathione assay was performed by reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) as previously described (25). Total glutathione (GSx) was the sum of reduced glutathione (GSH) and twofold oxidized glutathione (GSSG) concentrations ($[\text{GSx}] = [2 \times \text{GSSG}] + [\text{GSH}]$). We then calculated the redox state of glutathione as $(\text{GSSG}/\text{GSx}) \times 100$. Superoxide dismutase (SOD) activity (manganese superoxide dismutase [MnSOD] and Cu/Zn SOD) was assayed using the inhibition of pyrogallol autoxidation (26). One enzymatic unit of SOD activity was defined as the amount of enzyme that inhibited pyrogallol autoxidation by 50%. Glutathione peroxidase (GPx) activity was measured using *t*-butylhydroperoxide as substrate (27). One enzymatic unit of GPx activity corresponds to the oxidation of 1 mmol of NADPH/min.

Mitochondrial quantification. Citrate synthase assay was measured according to the procedure of Srere (28): one enzymatic unit of citrate synthase was equal to the reduction of 1 mmol of 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid per min.

Cytochrome oxidase activity. Fresh hypothalamus were homogenized in cold buffer (0.25 mol/l sucrose, 5 mmol/l TES, and pH = 7.2) and cytochrome oxidase activity measured as previously described (29).

Protein assay. Concentration of samples was determined using the DC protein assay kit (Biorad, Marnes la Coquette, France) according to the manufacturer's instructions.

Plasma glucose and insulin concentrations. Plasma was isolated from the blood collected at the rat-tail blood vessels. Glucose and insulin were determined using a glucose analyzer (One Touch II) and an ultrasensitive ELISA kit (Eurobio, Paris, France), respectively.

Statistical analysis. Results are presented as means \pm SE. Comparisons between groups were carried out for each parameter using Prism 4.0 software (GraphPad Software). A two-way ANOVA was applied first to detect interactions between genotype and treatment. When genotype did not produce any significant effect, one-way ANOVA was then applied; otherwise, groups were analyzed independently using Student's or Mann-Whitney *U* tests when appropriate. After one-way ANOVA, multiple comparisons of means were further computed with Newman-Keuls test. Both Bartlett's and Shapiro Wilk's tests were also applied to check equality in variance and normality of distribution, respectively. For some parameters, nonparametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U* tests were used when appropriate, that is,

TABLE 1
Characteristics of Zucker rats

	Body (g)	Insulinemia ($\mu\text{U/ml}$)	Glycemia (mM)
Lean	221.50 \pm 5.64	26.05 \pm 3.26	5.75 \pm 0.15
Obese	258.17 \pm 7.23***	142.70 \pm 2.68	5.96 \pm 0.07

Basal values of body weight, insulinemia, and glycemia are expressed as means \pm SE (7-week-old rats). Significant differences according to the unpaired Student's *t* test ($n = 7$) compared with lean littermates. *** $P < 0.001$.

heterogeneity of variances. For single comparison, that is, lean versus obese, nonpaired Student's *t* test was applied. Significant difference was noted *, **, or *** on the graphic representation when P value was < 0.05 , 0.01 , and 0.001 , respectively.

RESULTS

Seven-week-old obese Zucker rats were hyperinsulinemic (142.70 ± 2.68 vs. 26.05 ± 3.26 $\mu\text{U/ml}$) but normoglycemic (5.96 ± 0.07 vs. 5.75 ± 0.15 mmol/l) (Table 1).

Obese rats exhibit brain hypersensitivity to glucose. We confirmed the cerebral hypersensitivity exhibited by obese rats in response to glucose. Thus, 9 mg/kg glucose injection into the carotid artery toward the brain caused a rapid and transient increase of plasma insulin (50 $\mu\text{U/ml}$) 1 min after the carotid injection in lean and obese rats (Fig. 2A) (18,30). When a similar test was performed with a lower dose of glucose (3 mg/kg), insulin secretion did not occur in lean rats. By contrast, in obese Zucker rats, this lower dose of glucose was sufficient to produce a rapid

and transient increase in plasma insulin concentration. Amplitude and delay of this 3 mg/kg glucose-stimulated insulin secretion were similar to those observed with a glucose dose of 9 mg/kg in lean rats ($P = 0.5737$) (Fig. 2A). These results demonstrate that obese animals exhibit brain glucose hypersensitivity. This intracarotid glucose injection did not raise systemic glucose levels at any time during the test (Fig. 2B). Therefore, the insulin response is only because of cerebral glucose sensing and cannot result from peripheral effects.

Stimulation of multicellular hypothalamic electrical activity at the low glucose dose in obese rats. We previously showed that the activation of extracellular hypothalamic activity in arcuate nucleus in response to glucose was required to initiate insulin secretion in normal rats (12). Here, we explored the effect of 3 mg/kg glucose on extracellular arcuate nucleus electrical activity in both phenotypes. Basal glycemia at the time of recording was 5.91 ± 0.33 , 6.05 ± 0.22 , 5.89 ± 0.26 , and 5.90 ± 0.59 mmol/l for lean and obese NaCl-injected rats and lean and obese 3 mg/kg glucose-injected rats, respectively. In lean rats, 3 mg/kg glucose induced a slight increase in arcuate electrical activity compared with saline injection (33%, $P < 0.01$). It also induced a significant increase in electrical events in obese animals when compared with saline injection (71%, $P < 0.001$) (Fig. 3) that differ significantly from the ones observed in lean rats injected with glucose ($P < 0.01$). Moreover, in contrast to obese rats, 3 mg/kg glucose-induced electrical activity was not associated with insulin secretion in lean rats.

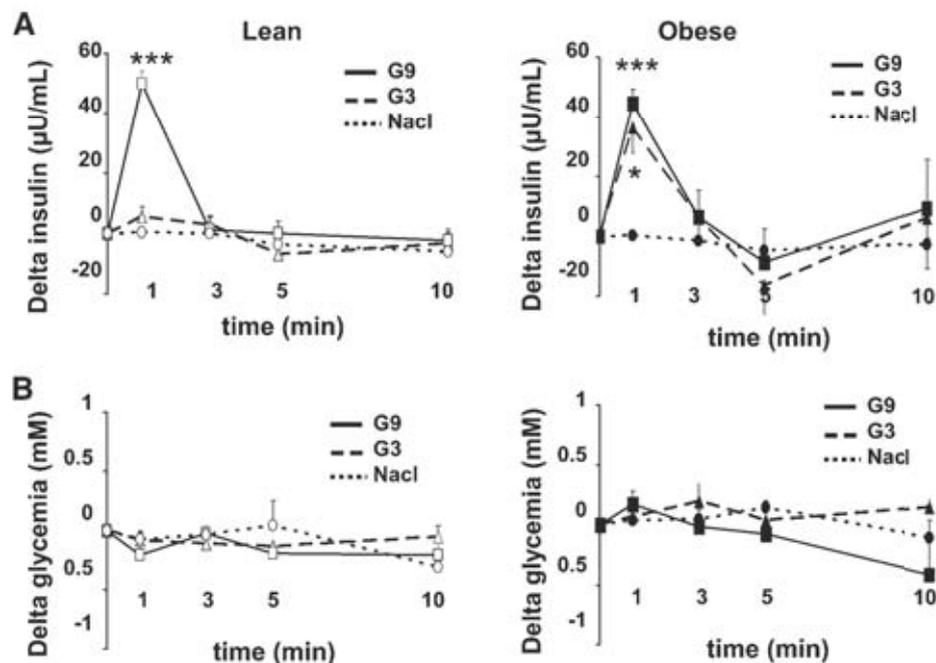


FIG. 2. Hypothalamic hypersensitivity to glucose in the obese Zucker rat. *A*: Insulin secretion in response to glucose. Plasma insulin in obese and lean rats in response to saline (dotted line) or 3 mg/kg (G3, dash line) or 9 mg/kg (G9, black line) glucose injection toward the brain. Results are expressed as means \pm SE (Δ from basal insulinemia at $t = 0$). Asterisk indicates significant differences according to independent statistical analysis using Mann-Whitney *U* test at $t = 1$ min, $n = 6-9$ per genotype (* $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$). *B*: No change in glycemia during the glucose-sensing test. Glycemia in response to saline (dotted line) or 3 mg/kg (G3, dash line) or 9 mg/kg (G9, black line) glucose injection toward the brain. Results are expressed as means \pm SE (Δ from basal glycemia at $t = 0$). No significant differences were detected using two-way ANOVA analysis at $t = 1$ min ($n = 6-9$ per genotype).

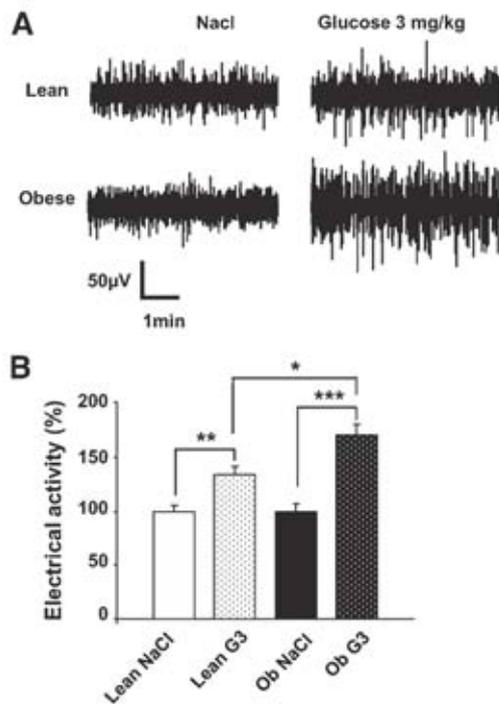


FIG. 3. Increased hypothalamic electrical activity in response to the low glucose dose. **A:** Multiunit sample recordings of arcuate nucleus neuronal activity in lean and obese Zucker rats after the carotid injection of saline (NaCl) or 3 mg/kg glucose (G3). **B:** Quantification of multiunit activity recorded in arcuate nucleus. Data are expressed as means \pm SE corresponding to the percentage of the number of spikes measured in lean rats injected with saline. The bar graph depicts the electrical activity during the first minute after carotid injection of saline (NaCl) or 3 mg/kg glucose (G3) in lean (white bar) and in obese (Ob) rats (black bar). Asterisks indicate significant differences according to the unpaired Student's *t* test ($n = 6$ per genotype) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.0001$).

Obese rats exhibit hypothalamic ROS production in response to the low glucose load. We measured ROS levels after saline or glucose injection. For this purpose, rats were injected through the carotid artery toward the brain with either the low dose of glucose or saline and killed 1 min after the injection (when insulin secretion occurs). ROS levels were assessed in both hypothalamus and thalamus. Interestingly, the basal constitutive ROS level, that is, assessed after saline intracarotid injection, was similar in both genotypes (Fig. 4). Glucose stimulation did not induce a significant change in hypothalamic ROS levels in lean rats. However, ROS levels were significantly increased (37%, $P < 0.05$) in obese rats injected with 3 mg/kg glucose when compared either with obese animals injected with saline or with lean rats injected with the same glucose load ($P < 0.05$, Fig. 4). Thus, low glucose stimulation mediates an increase in ROS levels only in obese rats. No such increase in ROS levels was found in thalamus, suggesting a regional specificity for this response (Fig. S1A, available in an online appendix at <http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/content/full/db09-0110/DC1>).

Abnormal ROS signaling is correlated to an alteration in the hypothalamic redox state. ROS level results from the balance between ROS production and

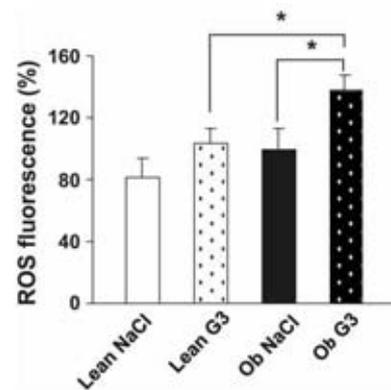


FIG. 4. Hypothalamic ROS production of obese rats in response to the low glucose load. ROS production in the hypothalamus in response to saline (NaCl) or to 3 mg/kg glucose (G3) injection toward the brain measured in lean (white bar) and in obese (Ob) rats (black bar). ROS level assessed in hypothalamic area by oxidation of dichlorofluorescein diacetate probe 1 min after intracarotid injection. Data are expressed as means \pm SE (percentage of the ROS fluorescence observed in obese rats injected with saline). Asterisk indicates significant differences according to the post hoc Newman-Keuls test ($n = 8-11$ per genotype) (* $P < 0.05$).

detoxification. We measured enzymatic and nonenzymatic antioxidants in basal conditions (i.e., without glucose stimulation). The glutathione redox state, defined as GSSG-to-GSx ratio, as it is the major antioxidant that scavenges ROS, was oxidized twofold ($P < 0.001$) more in the hypothalamus of obese rats (Fig. 5A). Glutathione peroxidase activity was found to be significantly lower in the hypothalamus of obese rats (266.0 ± 28.7 vs. 166.0 ± 21.5 ; $P < 0.01$ in lean vs. obese rats) (Fig. 5B). Glutathione peroxidase activity did not vary in the thalamus (Fig. S1B). The mitochondrial MnSOD activity was also decreased in obese rats (0.0102 ± 0.0009 vs. 0.0065 ± 0.0008 enzymatic unit per milligrams proteins; $P < 0.01$ in lean vs. obese rats) whereas extramitochondrial CuZnSOD was not statistically different between the two genotypes (Fig. 5C and D). This strongly suggests a mitochondrial defect in antioxidant enzyme activity in the hypothalamus of obese rats. This is reinforced by the activity of aconitase, an enzyme of the Krebs's cycle sensitive to mROS and thus revealing the intramitochondrial redox state (31). This activity was significantly decreased (-39% ; $P < 0.001$) in the hypothalamus of obese Zucker rats (Fig. 5E). Altogether, these results demonstrate that the hypothalamic redox state is lower in obese rats than in lean rats, regardless of the intracellular compartment studied.

Hypothalamic mitochondria exhibit increased activity in response to substrates. We explored the cytochrome c oxidase activity (cytochrome oxidase [COX], complex IV), which reflects the oxidative potential of the mitochondrial respiratory chain. COX activity was significantly increased (51%; $P < 0.01$) in the hypothalamus of obese Zucker rats (Fig. 6A). To get further insight into the hypothalamic mitochondrial function, oxygen consumption by the electron transport chain was explored on isolated mitochondria (Fig. 6B). We performed titrations with glutamate (1, 5, and 20 mmol/l) to determine substrate-driven respiration. We highlighted a greater increase in the O_2 flux in response to glutamate in obese rats compared with lean ones. This increase was significant for each dose of glutamate (O_2 flux in lean vs. obese rats: 1 mmol/l,

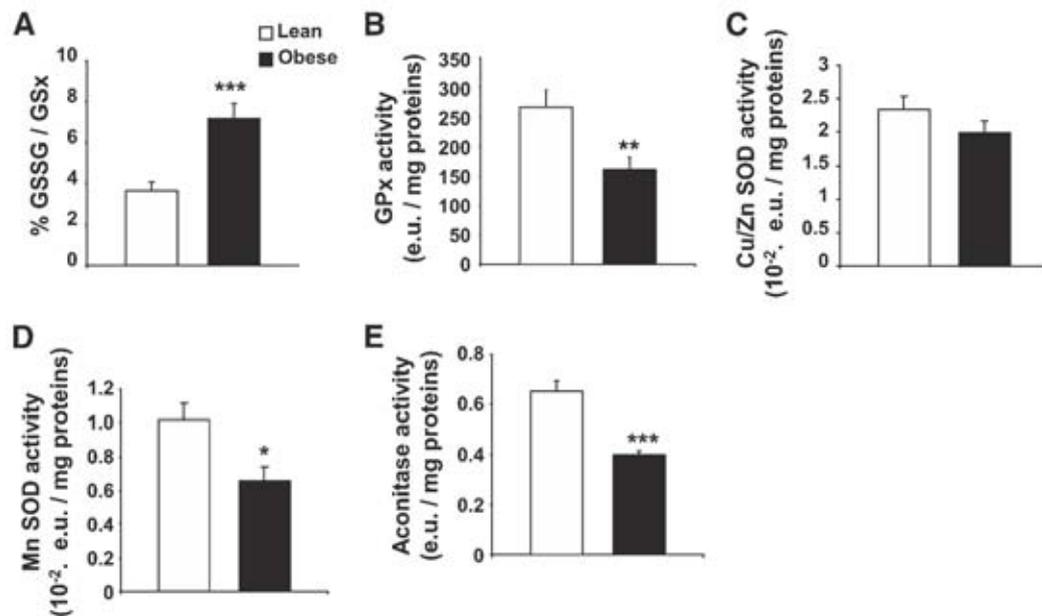


FIG. 5. Increased ROS production is linked to abnormal hypothalamic redox state. **A:** Obese rats display an abnormal hypothalamic glutathione redox state. GSH and GSSG levels measured by HPLC in hypothalamic homogenates of lean (white bar) and obese rats (black bar). The redox state of glutathione was calculated as the (GSSG/GSx) \times 100. Asterisk indicates a significant difference according to the unpaired Student's *t* test ($n = 6$ per genotype) ($***P < 0.001$). **B:** Obese rats present a decrease in glutathione peroxidase activity. GPx activity measured in the hypothalamus of lean (white bar) and obese (black bar) rats (enzymatic units [e.u.]). Asterisk indicates a significant difference according to the unpaired Student's *t* test ($n = 6$ per genotype) ($**P < 0.01$). **C:** Obese rats present no difference in extramitochondrial Cu/Zn SOD activity. SOD activity measured in the hypothalamus of lean (white bar) and obese (black bar) rats (enzymatic units). No differences according to the unpaired Student's *t* test ($n = 6$ per genotype) were present. **D:** Obese rats present a decrease in mitochondrial MnSOD activity. Mitochondrial MnSOD activity measured in the hypothalamus of lean (white bar) and obese (black bar) rats (enzymatic units). Asterisk indicates a significant difference according to the unpaired Student's *t* test ($n = 6$ per genotype) ($*P < 0.05$). **E:** Obese rats show a decreased activity of the ROS-sensitive mitochondrial aconitase. Maximal aconitase activity measured in the hypothalamus of lean (white bar) and obese (black bar) rats (enzymatic units). Asterisk indicates a significant difference according to the unpaired Student's *t* test ($n = 6$ per genotype) ($***P < 0.001$).

2.54 ± 1.03 vs. 6.34 ± 0.56 pmol/[s \times mg], $P < 0.05$; 5 nmol/l, 4.70 ± 1.54 vs. 11.63 ± 2.30 pmol/[s \times mg], $P < 0.05$; and 20 mmol/l, 7.81 ± 1.38 vs. 20.23 ± 5.57 pmol/[s \times mg], $P < 0.05$), revealing a hypersensitivity to this substrate at the level of the respiratory chain. State 3 (substrates/ADP-driven) respiration was assessed with saturating ADP concentration. The O_2 flux 13.25 ± 2.43 pmol/(s \times mg) versus 28.67 ± 5.69 pmol/(s \times mg) in lean and obese rats, respectively, was increased in obese rats ($P < 0.05$). CAt_r, an ATP-ADP exchange inhibitor, was then added to obtain the ADP-independent resting state 4, whereas respiration is only driven by substrates. State 4 was significantly enhanced in obese rats. Finally, the RCR (RCR = state 3/state 4) in lean rats (1.50 ± 0.52) was not significantly different from obese rats (1.50 ± 0.19). The total respiratory capacity induced by CCCP was significantly increased in obese rats (36.43 ± 1.00 pmol/[s \times mg]) compared with lean ones (28.80 ± 2.44 pmol/[s \times mg]), $P < 0.05$ (Fig. 6C). Next, we examined uncoupling respiration. Stimulation of uncoupling proteins with $300 \mu\text{mol/l}$ palmitate (Palm) did not reveal differences between lean (25.39 ± 2.17 pmol/[s \times mg]) and obese (27.83 ± 3.86 pmol/[s \times mg]) rats (Fig. 6D). This result reveals no difference in uncoupling respiration. In conclusion, these results indicate an increase in hypothalamic mitochondria activity at the complex I and IV, as revealed with glutamate assay and COX activity measurement. The increase in total respiratory capacity further supports

these data. No difference was found regarding these parameters in the thalamus (Fig. S1C–E).

Expression of the five complexes of the respiratory chain was examined. Both nuclear (30 kDa subunit of complex II, core protein 2 subunit of complex III, and the α subunit of complex V) and mitochondrial (ND6 subunit of complex I and subunit 1 of complex IV) complexes encoded were quantified at the protein level by Western blotting (Fig. 6E). The expression of complexes I, II, III, and IV (COX) was increased in hypothalamic mitochondria from obese rats (177, 153, 128, and 159%). Complex V expression (105%) was unchanged (Fig. 6F). These results indicate an increased quantity of most complexes of the electron transport chain in the mitochondria of obese rats.

These differences were not caused by a change in mitochondrial number because citrate synthase activity was identical in both genotypes (Fig. 6G).

Restoration of hypothalamic redox state normalizes the response to glucose load in obese rats. We decided to normalize the glutathione redox state in obese rats to test whether this could explain impaired ROS production stimulated by the low glucose load (3 mg/kg). Therefore, reduced glutathione (GSH) was intracerebroventricularly infused over 3 days using an osmotic minipump. Well-being of the animals (weight gain and food intake) was preserved during the infusion (Fig. S2A and B). HPLC analysis revealed that the GSH chronic intracerebroventricular infusion was efficient to restore GSH redox state

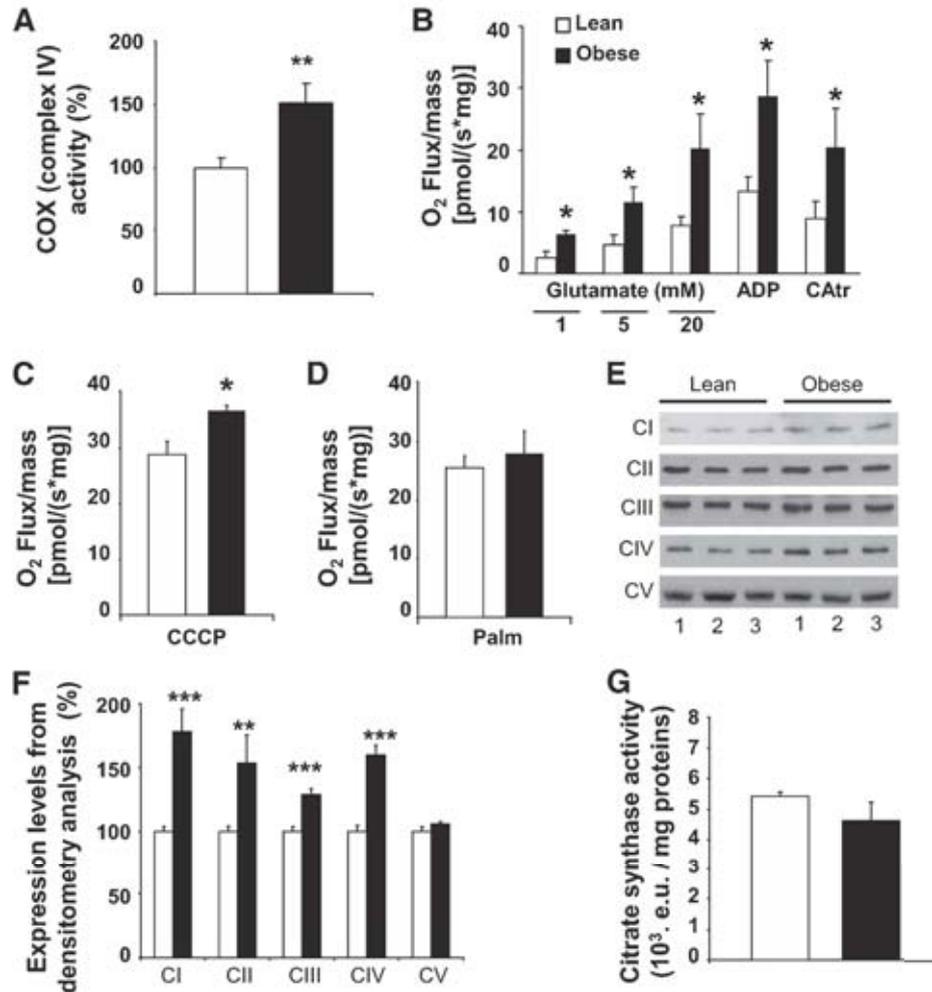


FIG. 6. Functional study of hypothalamic mitochondria. **A:** Obese rats exhibit an increased oxidative potential of the respiratory chain. Maximal cytochrome c oxidase activity in hypothalamic homogenates in basal conditions was significantly increased in obese rats. Data are expressed as means \pm SE corresponding to the percentage of COX activity in lean rats. Asterisk indicates significant difference according to the unpaired Student's *t* test ($n = 9-10$ per genotype) ($^{**}P < 0.01$). **B:** Obese rats' mitochondria display a hypersensitivity to glutamate. Pharmacological settings for oxygraphic analysis on isolated hypothalamic mitochondria: glutamate titration (1, 5, and 20 mmol/l) to achieve the nonphosphorylating respiration; saturating ADP concentration to achieve state 3 respiration; full inhibition of ATP-synthase by CAtr gives state 4 respiration. Single comparisons were performed using the unpaired Student's *t* test to compare lean vs. obese rats. Asterisk indicates significant difference ($^{*}P < 0.05$). **C:** Obese rats' mitochondria exhibit an enhanced maximal respiration capacity. Maximal respiration induced by CCCP (0.4 μ mol/l). Asterisk indicates significant difference according to the Mann-Whitney *U* test ($n = 6-8$ per genotype) ($^{*}P < 0.05$). **D:** Obese rats' mitochondria exhibit no uncoupling respiration. Uncoupling protein activation induced by palmitate (Palm) (300 μ mol/l). No differences according to the unpaired Student's *t* test ($n = 6$ per genotype) were present. **E and F:** Overexpression of respiratory chain complexes I to IV in the hypothalamic mitochondria of obese rats. Western blot performed on isolated hypothalamic mitochondria. Immunoblots were quantified by densitometry analysis. Asterisk indicates significant differences according to the Mann-Whitney *U* test ($n = 6-8$ per genotype) ($^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$). **G:** No difference in mitochondrial content. Mitochondrial content assessed by citrate synthase activity in the hypothalamus of lean (white bar) and obese (black bar) rats (enzymatic units [e.u.]). No differences according to the unpaired Student's *t* test ($n = 6$ per genotype) were present.

within the hypothalami of obese rats (Fig. 7A). In contrast, it did not reverse mitochondrial function as measured on glutamate titration by oxygraphy (Fig. 7B). ROS levels and pancreatic insulin secretion were measured after the intracarotid 3 mg/kg glucose injection in glutathione-infused obese rats. Obese glutathione-infused rats did not have any more exacerbated ROS levels in response to the low glucose load and exhibited ROS levels similar to those of normal rats (Fig. 7C). Regarding the insulin response, it showed a full restoration of their sensitivity to glucose

because their insulin peak was completely abolished in response to 3 mg/kg glucose. This result indicates a master role of mROS levels in response to glucose, at least for the nervous control of insulin secretion (Fig. 7D).

DISCUSSION

It has recently been demonstrated that glucose sensing was triggered by an intracellular redox signaling pathway in physiological conditions in the pancreas as well as in

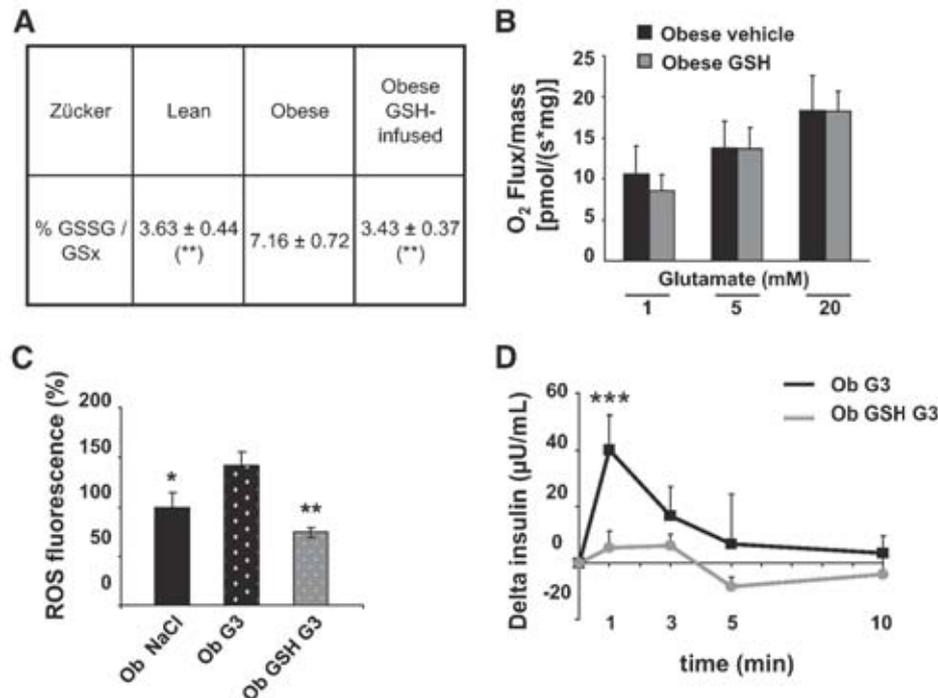


FIG. 7. Hypothalamic redox state after 3 days of intracerebroventricular GSH infusion in obese rats normalizes the response to the low glucose load. **A:** Normalization of the hypothalamic redox state. GSH and GSSG levels measured by HPLC in hypothalamic homogenates. The redox state of glutathione was calculated as (GSSG/GSx) \times 100. Results are expressed as means \pm SE of the glutathione redox state. Asterisk indicates significant difference according to the unpaired Student's *t* test ($n = 5-6$ per genotype) (** $P < 0.01$) compared with the obese group. **B:** No change in hypothalamic mitochondrial hypersensitivity to glutamate in obese glutathione restored rats. Glutamate titration (1, 5, and 20 mmol/l) in obese GSH-restored rats (gray bar) did not differ from the vehicle-treated obese rats (black bar). No significant differences present according to the repeated-measures ANOVA analysis ($n = 4-6$) ($P_{ANOVA} = 0.1576$). **C:** Normalization of hypothalamic ROS production. ROS production measured in obese rats after vehicle intracerebroventricular infusion and saline carotid injection (Ob NaCl, black bar [$n = 2$]), vehicle intracerebroventricular infusion and 3 mg/kg glucose carotid injection (Ob G3, dotted black bar [$n = 2$]), or GSH intracerebroventricular infusion and 3 mg/kg glucose carotid injection (Ob GSH G3, dotted gray bar [$n = 7$]). ROS levels were assessed on hypothalamic homogenates with the dichlorofluorescein diacetate probe 1 min after carotid injection. Data are expressed as means \pm SE of the percentage of ROS fluorescence of the obese rats receiving the vehicle intracerebroventricular and saline carotid injection. Asterisk indicates significant differences according to the Newman-Keuls test ($n = 5-6$ per genotype) compared with the obese G3 group (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$). **D:** Normalization of insulin secretion. Plasma insulin assessed in obese rats in response to 3 mg/kg glucose injection toward the brain (black) and in obese GSH-infused rats in response to 3 mg/kg glucose (gray). Results are expressed as means \pm SE corresponding to Δ from basal insulinemia at $t = 0$. Asterisk indicates significant differences according to independent statistical analysis using Mann-Whitney *U* test at $t = 1$ min ($n = 5-6$ per genotype) (** $P < 0.001$).

the hypothalamus (11,12). However, the relevance of such a mechanism in metabolic disease is not known. We hypothesized that an alteration in redox signaling in the brain could participate in metabolic diseases. To test this hypothesis, we explored redox signaling in the Zucker rat. These rats are obese, insulin-resistant, and dyslipidemic but normoglycemic. One original feature of this model is its hypothalamic hypersensitivity to glucose (18). We specifically aimed to understand whether this hypersensitivity to glucose present in obese Zucker rats could be related to an alteration in redox signaling. For the first time, we revealed that this hypersensitivity was associated, within the hypothalamus, with 1) an increased ROS level in response to the low glucose load, 2) a constitutive oxidized environment at both the cellular and mitochondrial level, and 3) an overexpression of several mitochondrial subunits of the respiratory chain, coupled with a global dysfunction in the mitochondrial activity. Moreover, pharmacological restoration of the hypothalamic redox state fully reversed the altered cerebral hypersensitivity to glucose. Altogether, these data suggest that this impaired

metabolic regulation in the obese Zucker rat is linked to an abnormal redox signaling that originates from mitochondrial dysfunction.

In normal animals, hypothalamic glucose sensing promotes an increase in hypothalamic electrical activity and rapid and transient vagal-mediated insulin secretion (12,19). Moreover, we previously demonstrated that a key step in these events requires redox signaling because they were abolished when mROS were quenched (12). The hypersensitivity to glucose of obese Zucker rats has been demonstrated as an abnormal insulin response occurring after a low glucose load (3 vs. 9 mg/kg) that is inefficient in lean littermates (18). We confirmed this data regarding the peripheral insulin release and reinforced the notion of cerebral hypersensitivity to glucose in obese rats as assessed by the hypothalamic glucose-stimulated electrical activity. Indeed, we brought to light an increased level in the whole multicellular electrical activity in the arcuate nucleus of obese rats in response to 3 mg/kg glucose. Contrary to lean rats, this enhanced glucose-stimulated electrical activity was associated with the insulin response

in obese rats. This suggests that the electrical activity of the arcuate nucleus in response to 3 mg/kg glucose was high enough to promote insulin secretion in obese rats. Electrical activity was recorded under pentobarbital anesthesia that has depressive effects on nervous activity (32), thus suggesting a much greater effect on vigil rats. The multicellular recordings do not allow a distinction between direct versus presynaptic effects. However, numerous arcuate glucose-sensitive neurons have the ability to directly detect a change in glucose concentration (33). This cerebral hypersensitivity to glucose may explain the elevated parasympathetic tone that consequently contributes to the development of hyperinsulinemia in the obese Zucker rat (17,34).

In obese rats, there was a significant increase in ROS levels within the hypothalamus under low glucose stimulation at the time when plasma insulin increases. ROS concentration results from the balance between production and scavenging. The latter depends on the intracellular redox state (35,36). Glutathione redox (oxidized-to-total form ratio) constitutes an accurate indicator of the cellular redox state because glutathione is in large amount in cells (1–5 mmol/l) and considered as the major ROS detoxifying system (37). It has a pivotal and synergetic role with many other antioxidants by reducing pro-oxidant forms (36). In the hypothalamus of obese rats, glutathione was oxidized twofold more in basal conditions. Decreased GPx activity in the hypothalamus from obese rats further confirmed that basal redox state was deeply modified in this area. To gain insight into the oxidative environment in the mitochondria, we evaluated MnSOD and aconitase activity. MnSOD and aconitase, an enzyme involved in the Krebs cycle and sensitive to ROS, are exclusively located in the mitochondria (31). Their activities were decreased in the hypothalamus of the obese Zucker rat. In contrast, Cu/ZnSOD located in the cytosol did not vary. Altogether, these data reveal a constitutive oxidative environment in the hypothalamus of obese Zucker rats regardless of the intracellular compartment (cytosol or mitochondria). These results are in line with numerous studies showing a drop in the antioxidant defenses such as reduced glutathione, α -tocopherol, and catalase in several tissues of obese Zucker rats (38,39). Finally, the more oxidized cellular environment within the hypothalamus of obese rats could partly explain why an increased ROS level in response to the low glucose load is not buffered as in lean rats.

ROS are produced by electron leakage during mitochondrial metabolism, and the rate of their formation is enhanced as the mitochondrial metabolism increases (40–42). We explored the mitochondrial function in the hypothalamus of Zucker rats. First, the oxidative ability of the respiratory chain as determined by the cytochrome c oxidase activity, the total respiratory function as assessed with saturating substrate, and the chemical uncoupling were all significantly increased in the hypothalamus of obese rats. Second, the apparent affinity of the mitochondrial respiration for substrate was higher in obese rats as assessed by glutamate titration. Third, altered expression of mitochondrial complexes (I to IV) was increased in obese rats. These results are consistent with previous studies showing an increased oxidative capacity in the muscle of such rats, associated with an increasing number of functional units in the mitochondrial respiratory chain (43,44). No change in mitochondrial number was observed in the hypothalamus of obese rats as revealed by citrate synthase activity assay. Furthermore, it may be stressed

that all these alterations are specific to the hypothalamus because no change was observed in the thalamus. Taken together with the absence of complex V modifications, the alterations seen between complexes I to IV may result in an enhancement in respiratory chain constraints (45). As an improved mitochondrial metabolism promotes ROS production under stimulation, this could represent the molecular basis of the abnormal increased ROS levels within the hypothalamus of obese rats in response to a low glucose load, in concert with the higher oxidized environment. One can speculate that the excessive mitochondrial ROS production might be a primary and causal link with the overoxidation of the redox state.

Recent observations from our laboratory and others (12,15,46) argue that ROS are part of hypothalamic activity control for the regulation of energy homeostasis. To date, ROS have been proposed as messengers in brain glucose and lipid sensing (12,46). For example, fasting abolished increased ROS in brain lipid sensing by increasing hypothalamic mitochondrial uncoupling (46); ghrelin signals are ROS-dependently integrated in NPY/AgRP neurons (15). Moreover, this latest study suggests that ROS signaling takes place in the neuronal population, although other cell types remain to be explored.

Here we show for the first time that dysfunction in hypothalamic redox signaling could be the molecular basis for impaired brain glucose sensing and might explain some features of the metabolic defects in obese rats such as hyperinsulinism. This has been strengthened by the experiment using a pharmacological approach (GSH treatment) that normalized the glutathione redox state. Indeed, such normalization reversed the increased ROS level as well as peripheral insulin secretion in response to a low glucose load (3 mg/kg). These findings highlight the necessity for a fine and balanced level of ROS dependent on the mitochondrial metabolism and the redox environment, which is required to trigger the appropriate redox signaling in response to glucose.

In summary, we demonstrated that the cerebral hypersensitivity to glucose in obese rats results from both impaired redox signaling and increased mitochondrial respiratory chain activity that lead to excessive ROS levels. One can postulate that these increased ROS levels activate redox signaling involving ROS-sensitive voltage-dependent channels (47,48). Changes in channel conformation will then modulate electrical activity that in turn triggers vagal-mediated insulin secretion. To determine whether hypothalamic mitochondrial dysfunction is of primary importance in the etiology of the hyperinsulinism in obesity, long-term treatment aiming to normalize redox state would provide interesting clues.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Agence Nationale pour la Recherche (Nutrisens 05-PNRA-004) and from the Programme National de Recherche sur le Diabète (PNRD-0602).

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

We fully acknowledge Jésus Garcia for his help in statistical analysis and the expertise of the Zootechnic Platform of the IFR31 Institute, I2MR, especially Christine Fourreau.

REFERENCES

- Levin BE. Metabolic sensing neurons and the control of energy homeostasis. *Physiol Behav* 2006;89:486–489
- Sandoval D, Cota D, Seeley RJ. The integrative role of CNS fuel-sensing mechanisms in energy balance and glucose regulation. *Annu Rev Physiol* 2008;70:513–535
- Goldstone AP. The hypothalamus, hormones, and hunger: alterations in human obesity and illness. *Prog Brain Res* 2006;153:57–73
- Schwartz MW, Porte D, Jr. Diabetes, obesity, and the brain. *Science* 2005;307:375–379
- Penicaud L, Leloup C, Fioramonti X, Lorsignol A, Benani A. Brain glucose sensing: a subtle mechanism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006;9:458–462
- Parton LE, Ye CP, Coppari R, Euriore PJ, Choi B, Zhang CY, Xu C, Vianna CR, Balthasar N, Lee CE, Elmquist JK, Cowley MA, Lowell BB. Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 2007;449:228–232
- Yang XJ, Kow LM, Funahashi T, Mobbs CV. Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic β -cell mechanisms. *Diabetes* 1999;48:1763–1772
- Kang L, Routh VH, Kuzhikandathil EV, Gaspers LD, Levin BE. Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons. *Diabetes* 2004;53:549–559
- Leloup C, Arduison M, Lepetit N, Cartier N, Marfaing-Jallat P, Ferre P, Penicaud L. Glucose transporter 2 (GLUT2): expression in specific brain nuclei. *Brain Res* 1994;638:221–226
- Leloup C, Oroscio M, Serradas P, Nicolaidis S, Penicaud L. Specific inhibition of GLUT2 in arcuate nucleus by antisense oligonucleotides suppresses nervous control of insulin secretion. *Brain Res Mol Brain Res* 1998;57:275–280
- Pi J, Bai Y, Zhang Q, Wong V, Flooring LM, Daniel K, Reece JM, Deeney JT, Andersen ME, Corkey BE, Collins S. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 2007;56:1783–1791
- Leloup C, Magnan C, Benani A, Bonnet E, Alquier T, Offer G, Carriere A, Periquet A, Fernandez Y, Ktorza A, Casteilla L, Penicaud L. Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing. *Diabetes* 2006;55:2084–2090
- Leloup C, Tourrel-Cuzin C, Magnan C, Karaca M, Castel J, Carneiro L, Colombani AL, Ktorza A, Casteilla L, Penicaud L. Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 2009;58:673–681
- Levin BE, Magnan C, Migrenne S, Chua SC, Jr, Dunn-Meynell AA. F-DIO obesity-prone rat is insulin resistant before obesity onset. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;289:R704–R711
- Andrews ZB, Liu ZW, Wallingford N, Erion DM, Borok E, Friedman JM, Tschop MH, Shanabrough M, Cline G, Shulman GI, Coppola A, Gao XB, Horvath TL, Diano S. UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* 2008;454:846–851
- York DA, Marchington D, Holt SJ, Allans J. Regulation of sympathetic activity in lean and obese Zucker (*fa/fa*) rats. *Am J Physiol* 1985;249:E299–E305
- Penicaud L, Cousin B, Leloup C, Atef N, Casteilla L, Ktorza A. Changes in autonomic nervous system activity and consecutive hyperinsulinemia: respective roles in the development of obesity in rodents. *Diabetes Metab* 1996;22:15–24
- Alquier T, Leloup C, Atef N, Fioramonti X, Lorsignol A, Penicaud L. Cerebral insulin increases brain response to glucose. *J Neuroendocrinol* 2003;15:75–79
- Atef N, Ktorza A, Penicaud L. CNS involvement in the glucose induced increase of islet blood flow in obese Zucker rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995;19:103–107
- Wang R, Cruciani-Guglielmacci C, Migrenne S, Magnan C, Cotero VE, Routh VH. Effects of oleic acid on distinct populations of neurons in the hypothalamic arcuate nucleus are dependent on extracellular glucose levels. *J Neurophysiol* 2005;95:1491–1498
- Anderson MF, Nilsson M, Eriksson PS, Sims NR. Glutathione monoethyl ester provides neuroprotection in a rat model of stroke. *Neurosci Lett* 2004;354:163–165
- Benani A, Barquissau V, Carneiro L, Salin B, Colombani AL, Leloup C, Casteilla L, Rigoulet M, Penicaud L. Method for functional study of mitochondria in rat hypothalamus. *J Neurosci Methods* 2009;178:301–307
- Szabados E, Fischer GM, Toth K, Csete B, Nemeti B, Trombitas K, Habon T, Andrei D, Sumegi B. Role of reactive oxygen species and poly-ADP-ribose polymerase in the development of AZT-induced cardiomyopathy in rat. *Free Radic Biol Med* 1999;26:309–317
- Zheng W, Ren S, Graziano JH. Manganese inhibits mitochondrial aconitase: a mechanism of manganese neurotoxicity. *Brain Res* 1998;799:334–342
- Gallnier A, Carriere A, Fernandez Y, Caspar-Bauguil S, Periquet B, Periquet A, Penicaud L, Casteilla L. Site specific changes of redox metabolism in adipose tissue of obese Zucker rats. *FEBS Lett* 2006;580:6301–6308
- Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 1974;47:469–474
- Gunzler WA, Kremers H, Flohe L. An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9.) in blood. *Z Klin Chem Klin Biochem* 1974;12:444–448
- Faloua GR, Srere PA. Escherichia coli citrate synthase. Purification and the effect of potassium on some properties. *Biochemistry* 1969;8:4497–4503
- Prunet-Marcassus B, Moulin K, Carmona MC, Villarroya F, Penicaud L, Casteilla L. Inverse distribution of uncoupling proteins expression and oxidative capacity in mature adipocytes and stromal-vascular fractions of rat white and brown adipose tissues. *FEBS Lett* 1999;464:184–188
- Guilloid-Maximin E, Lorsignol A, Alquier T, Penicaud L. Acute intracarotid glucose injection towards the brain induces specific c-fos activation in hypothalamic nuclei: involvement of astrocytes in cerebral glucose-sensing in rats. *J Neuroendocrinol* 2004;16:464–471
- Tretter L, Adam-Vizi V. α -ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005;360:2335–2345
- Kitahara S, Yamashita M, Ikemoto Y. Effects of penobarbital on purinergic P2X receptors of rat dorsal root ganglion neurons. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81:1085–1091
- Fioramonti X, Lorsignol A, Taupignon A, Penicaud L. A new ATP-sensitive K^+ channel-independent mechanism is involved in glucose-excited neurons of mouse arcuate nucleus. *Diabetes* 2004;53:2767–2775
- Rohner-Jeanrenaud F, Hochstrasser AC, Jeanrenaud B. Hyperinsulinemia of preobese and obese *fa/fa* rats is partly vagus nerve mediated. *Am J Physiol* 1983;244:E317–E322
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:44–84
- Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1287–1312
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 2004;134:489–492
- Soltys K, Dikdan G, Koneru B. Oxidative stress in fatty livers of obese Zucker rats: rapid amelioration and improved tolerance to warm ischemia with tocopherol. *Hepatology* 2001;34:13–18
- Poirier B, Lannaud-Bournoville M, Conti M, Bazin R, Michel O, Bariety J, Chevalier J, Myara L. Oxidative stress occurs in absence of hyperglycemia and inflammation in the onset of kidney lesions in normotensive obese rats. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:467–476
- Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005;54:1615–1625
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000;404:787–790
- Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Brownlee M. Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes* 2001;50:1491–1494
- Turner N, Bruce CR, Beale SM, Hoehn KL, So T, Rolph MS, Cooney GJ. Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents. *Diabetes* 2007;56:2085–2092
- Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chansaume E, Chauvin MA, Morio B, Vidal H, Rieusset J. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulina-resistant mice. *J Clin Invest* 2008;118:789–800
- Adam-Vizi V, Chinopoulos C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:639–645
- Benani A, Troy S, Carmona MC, Fioramonti X, Lorsignol A, Leloup C, Casteilla L, Penicaud L. Role of mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: redox regulation of food intake. *Diabetes* 2007;56:152–160
- Hudasek K, Brown ST, Fearon IM. H_2O_2 regulates recombinant Ca^{2+} channel α -1C subunits but does not mediate their sensitivity to acute hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:135–141
- Avshalumov MV, Chen BT, Koos T, Tepper JM, Rice ME. Endogenous hydrogen peroxide regulates the excitability of midbrain dopamine neurons via ATP-sensitive potassium channels. *J Neurosci* 2005;25:4222–4231

Ventromedial Hypothalamic Nitric Oxide Production Is Necessary for Hypoglycemia Detection and Counterregulation

Xavier Fioramonti,¹ Nicolas Marsollier,² Zhentao Song,¹ Kurt A. Fakira,¹ Reema M. Patel,¹ Stacey Brown,³ Thibaut Duparc,⁴ Arnaldo Pica-Mendez,¹ Nicole M. Sanders,⁵ Claude Knauf,⁴ Philippe Valet,⁴ Rory J. McCrimmon,⁴ Annie Beuve,¹ Christophe Magnan,² and Vanessa H. Routh¹

OBJECTIVE—The response of ventromedial hypothalamic (VMH) glucose-inhibited neurons to decreased glucose is impaired under conditions where the counterregulatory response (CRR) to hypoglycemia is impaired (e.g., recurrent hypoglycemia). This suggests a role for glucose-inhibited neurons in the CRR. We recently showed that decreased glucose increases nitric oxide (NO) production in cultured VMH glucose-inhibited neurons. These *in vitro* data led us to hypothesize that NO release from VMH glucose-inhibited neurons is critical for the CRR.

RESEARCH DESIGN AND METHODS—The CRR was evaluated in rats and mice in response to acute insulin-induced hypoglycemia and hypoglycemic clamps after modulation of brain NO signaling. The glucose sensitivity of ventromedial nucleus glucose-inhibited neurons was also assessed.

RESULTS—Hypoglycemia increased hypothalamic constitutive NO synthase (NOS) activity and neuronal NOS (nNOS) but not endothelial NOS (eNOS) phosphorylation in rats. Intracerebroventricular and VMH injection of the nonselective NOS inhibitor *N*^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) slowed the recovery to euglycemia after hypoglycemia. VMH L-NMMA injection also increased the glucose infusion rate (GIR) and decreased epinephrine secretion during hyperinsulinemic/hypoglycemic clamp in rats. The GIR required to maintain the hypoglycemic plateau was higher in nNOS knockout than wild-type or eNOS knockout mice. Finally, VMH glucose-inhibited neurons were virtually absent in nNOS knockout mice.

CONCLUSIONS—We conclude that VMH NO production is necessary for glucose sensing in glucose-inhibited neurons and full generation of the CRR to hypoglycemia. These data suggest that potentiating NO signaling may improve the defective CRR resulting from recurrent hypoglycemia in patients using intensive insulin therapy. *Diabetes* 59:519–528, 2010

Intensive insulin therapy significantly reduces the onset and progression of hyperglycemia-related complications in patients with type 1 and advanced type 2 diabetes. However, intensive insulin therapy also causes a clinically adverse effect: hypoglycemia (1). Powerful neuroendocrine and autonomic counterregulatory mechanisms protect the brain from hypoglycemia (2,3). These protective mechanisms, known as the counterregulatory response (CRR) to hypoglycemia, involve the release of hormones (e.g., glucagon, epinephrine) that restore euglycemia by stimulating hepatic glucose production and inhibiting peripheral glucose uptake (3). Although the physiology of the CRR is well understood, the underlying cellular mechanisms by which the brain senses hypoglycemia and initiates the CRR remain elusive.

During hypoglycemia, central and peripheral glucose sensors detect declining glucose levels (4). In the brain, the ventromedial hypothalamus, which includes the arcuate nucleus and the ventromedial nucleus (VMN), is important in the initiation of the CRR (5–7). This region contains specialized glucose-sensing neurons (GSNs). Ventromedial hypothalamic (VMH) GSN electrical activity is regulated by physiologically relevant changes in extracellular glucose levels (8–11). Glucose-excited neurons decrease, whereas glucose-inhibited neurons increase, their input resistance, membrane potential, and action potential frequency when extracellular glucose is reduced (10). Many studies suggest that VMH glucose-inhibited neurons play a critical role in the control of the CRR (4). For example, the response of VMH glucose-inhibited neurons to decreased glucose is impaired under conditions where the CRR is impaired (e.g., recurrent hypoglycemia) (12,13).

Nitric oxide (NO) is a gaseous messenger produced by NO synthase (NOS). Two classes of NOS have been identified in the brain: the inducible NOS (iNOS) and the constitutive NOS, which includes the neuronal NOS (nNOS) and endothelial NOS (eNOS) isoforms (14). Hypothalamic NO is involved in the regulation of food intake and glucose homeostasis (15–18). In support of this, we have recently shown that VMH glucose-inhibited neurons produce NO via nNOS in response to decreased extracellular glucose levels (19,20). Therefore, in this study, we test the hypothesis that NO production by VMH glucose-inhibited neurons is necessary for the CRR to hypoglycemia. We tested this hypothesis using a combination of *in vivo* and *in vitro* techniques in wild-type rats and mice as well as in transgenic nNOS and eNOS knockout mice.

From the ¹Department of Pharmacology and Physiology, New Jersey Medical School, Newark, New Jersey; the ²National Center for Scientific Research, University Paris Diderot, Paris, France; the ³Department of Internal Medicine, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut; the ⁴INSERM U858, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil, IFR150, Université Paul Sabatier, Toulouse, France; and the ⁵Division of Endocrinology/Metabolism, Veterans Affairs Puget Sound Health Care System, Seattle, Washington.

Corresponding author: Vanessa H. Routh, routhvh@umdnj.edu.

Received 20 March 2009 and accepted 8 November 2009. Published ahead of print at <http://diabetes.diabetesjournals.org> on 23 November 2009. DOI: 10.2337/db09-0421.

© 2010 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

All procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the University of Medicine and Dentistry of New Jersey. Adult male Sprague-Dawley rats were purchased from Charles River. Adult 5- to 8-week-old C57BL/6J wild-type, nNOS knockout (B6.129S4-Nos1^{tm1b}/J), and eNOS knockout (B6.129P2-Nos3^{tm1.1uc}/J) mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Animals were housed individually and maintained on a 12-h light/12-h dark schedule at 22–23°C with ad libitum access to food and water.

In vivo experiments

Surgical procedures. Rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg i.p.; Ovation) and mice, with ketamine/xylazine (80/8 mg/kg i.p.; Bioniche-Pharma/Lloyd Laboratories). Vascular catheters were surgically implanted in the left carotid and/or the right jugular vein in rats, and a vascular catheter was implanted in the right jugular vein in mice. The catheters were filled with heparin (10 units/ml) and flushed every other day. Additionally, rats received a stereotaxic implantation of microinjection cannula guide positioned 1-mm dorsal to the ventromedial hypothalamus or in the right lateral ventricle according to stereotaxic coordinates (VMH cannulation; from bregma: –2.5 mm anterior-posterior, –2.8 mm medial-lateral, and –8.5 mm dorsal-ventral, at an angle of 20°; intracerebroventricular [ICV] cannulation; from bregma: –1.0 mm anterior-posterior, –1.4 mm medial-lateral, and –4.0 mm dorsal-ventral). Animals were allowed 5–7 days to recover from surgery and were handled every day. Animals that did not recover to their presurgery body weights were excluded from the study. For probe placement, at the end of each experiment, cannula placement was verified by methyl-blue (Sigma) injection.

Experimental procedures. Animals undergoing hyperinsulinemic/hypoglycemic clamps were either fasted overnight (rats) or for 5 h (9:00 A.M. to 2:00 P.M.; mice). Two hours before the start of the study, catheters were externalized outside the cage to minimize investigator interaction and were connected to infusion pumps. Starting 30 min before insulin injection (see below), one group of rats was infused intracerebroventricularly (0.4 µl/min, 2 h), whereas another group was injected in the ventromedial hypothalamus (0.1 µl/min, 10 min) with one of the following compounds in artificial cerebrospinal fluid (aCSF; containing in mM: 135 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, pH = 7.4): N^ω-monomethyl-L-arginine (L-NMMA; 50 mmol/l in aCSF), IH-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-1 (ODQ; 0.1 mmol/l in aCSF containing 0.1% DMSO). The control for L-NMMA was injected with aCSF, whereas the control for ODQ was injected with DMSO (0.1% in aCSF).

Acute insulin infusion. Rats (100–150 g) were injected with an insulin bolus (1 unit/kg; regular human insulin; Eli-Lilly) through the jugular catheter 30 min after ICV or VMH infusion. Blood glucose was monitored every 15 min from –30 to 120 min after insulin infusion via tail prick.

Hyperinsulinemic/hypoglycemic clamp. Starting 30 min after VMH or ICV infusion, rats (300–350 g) or mice (7–8 weeks old) were injected through the jugular catheter with an insulin bolus (rats: 0.4 units/kg; mice: 1 unit/kg) to decrease glycemia to ~50 mg/dl within 30–40 min. This time course was used based on the results of Saberi et al. (21), suggesting that brain versus peripheral glucose sensors predominate in CRR initiation when blood glucose decreases rapidly. After this bolus, animals were perfused with insulin at 1.2 units · kg⁻¹ · h⁻¹ for 90 (rats) or 120 (mice) min. Glucose (20%) was co-perfused with insulin to maintain plasma glucose level of ~50 mg/dl. The concentration of blood glucose was measured every 10 min via tail prick. For clamps carried out in rats, arterial blood samples (500 µl) taken from the carotid catheter were collected at 0, 30, 60, and 90 min for subsequent measurement of plasma glucagon, epinephrine, and norepinephrine. Glucocorticoid levels were not measured because they are not an essential aspect of the recovery from an acute hypoglycemic challenge (for review, see [22]). For glucagon, 250 µl of blood was collected in chilled tubes containing EGTA (1.6 mg/ml; Sigma) and aprotinin (250 KIU/ml; Sigma). For catecholamines, blood was collected in chilled tubes containing reduced glutathione (1.2 mg/ml; Sigma) and EDTA (1.8 mg/ml; Sigma). After removal of plasma, erythrocytes from experimental rats were resuspended in an equivalent volume of sterile NaCl 0.9% and reinfused after each blood sampling to prevent volume depletion. For mice clamp, trunk blood was collected at the end of the clamp in chilled tubes containing reduced glutathione (1.2 mg/ml; Sigma) and EDTA (1.8 mg/ml; Sigma) for plasma epinephrine and norepinephrine measurement.

Plasma glucagon and catecholamine determination. Plasma glucagon concentrations were determined using commercially available radioimmunoassay kits (Linco Research). Plasma epinephrine and norepinephrine concentrations were analyzed by high-performance liquid chromatography using electrochemical detection (ESA Biosciences, Acton, MA).

Phosphorylated-NOS Western blot. Rats (100–150 g) were injected with saline or insulin (2 units/kg, s.c.) and killed 60 min after by an overdose of sodium pentobarbital (Euthasol, Virbac, Fort Worth, TX). The ventral hypo-

thalamus was quickly harvested, snap frozen, and stored at –80°C. Brain samples were lysed over ice in lysis buffer (150 mmol/l NaCl, 0.02% sodium azide, 10 mmol/l HEPES, 50 mmol/l NaF, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholic acid, 1% Nonidet P-40, 0.2 mmol/l phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 µg/ml pepstatin-A, 2 µg/ml leupeptin, and 2 µg/ml aprotinin). Cytosolic lysate supernatants were collected by centrifugation at 14,000g for 10 min at 4°C. Protein (15 µg) was electrophoresed and transferred to nitrocellulose membranes. Immunodetection with primary antibodies was performed for 12 h at 4°C: phosphorylated-nNOS (p-nNOS; nNOS-Ser 1717) 1:5,000 (Millipore), phosphorylated eNOS (eNOS-Ser 1177) 1:5,000, and nNOS and eNOS 1:2,500 (Cell Signaling). After washing, secondary antibody (donkey anti-rabbit; Jackson ImmunoResearch) was added at 1:1,000 for 1 h at room temperature. Signals are visualized using ECL kit (Thermo) and quantified using Scion Image. Results are presented as percentage of control after normalization to total nNOS/eNOS.

NOS activity. NOS activity was quantified using the radiodetection kit (Cayman) based on the biochemical conversion of [³H]-L-arginine to [³H]-L-citrulline by NOS. To distinguish Ca²⁺-dependent constitutive NOS activity (nNOS + eNOS), from Ca²⁺-independent iNOS activity, hypothalamic homogenates were prepared as above and divided into two sets of samples, one of which omitted calcium in the assay medium for measurement of iNOS activity.

In vitro experiments

Electrophysiology. Coronal brain slices (250 µm) from wild-type and nNOS knockout mice (5–7 weeks old) were prepared as previously described (8,23). Briefly, viable neurons were visualized under infrared differential-interference contrast microscopy (DM LFS microscope; Leica Microsystems). Current clamp recordings (standard whole-cell configuration) from VMH neurons were performed using a MultiClamp 700A (Axon Instruments) and analyzed using pCLAMP9 software. During recording, brain slices were perfused at 10 ml/min with normal oxygenated artificial cerebrospinal fluid containing (in mM): 126 NaCl, 1.9 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 2.4 CaCl₂, 2.5 glucose; 300–310 mOsm, pH 7.4). Borosilicate pipettes (3–5 MΩ; Sutter Instrument) were filled with an intracellular solution containing (in mM): 128 K-gluconate, 10 KCl, 4 KOH, 10 HEPES, 4 MgCl₂, 0.5 CaCl₂, 5 EGTA, and 2 Na₂ATP (pH 7.2; 290–300 mOsm). Membrane potential, action potential frequency, and input resistance in response to constant hyperpolarizing pulse (20 pA) were monitored as extracellular glucose level was changed from 2.5 to 0.1 mmol/l as described in figures.

Cellular imaging. VMH neurons were prepared using a protocol modified from Murphy et al. (24,25) (see supplementary data for detailed protocol, available in an online appendix at <http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/content/full/db00hyphen0421/DC1>). VMH neurons were perfused in a closed chamber at 0.6 ml/min with oxygenated extracellular solution containing (in mM): 132 NaCl, 5 KCl, 0.45 KH₂PO₄, 0.45 NaH₂PO₄, 1.2 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 0.4 MgSO₄, 5 HEPES, 2.5 glucose (pH 7.3; osmolarity adjusted to 300–310 mOsm) in the presence of 0.5% membrane potential dye (FLIPR-MPD; Molecular Devices, Sunnyvale, CA). After 10 min of equilibration, VMH neurons were perfused with the same extracellular solution containing 0.1 mmol/l glucose for 15 min followed by 15 min at 2.5 mmol/l glucose. Image acquisition and analysis were performed as previously described (24,25). Neurons were considered as glucose-inhibited neurons when their fluorescence intensity reversibly increased more than 25% in response to 0.1 mmol/l glucose. Data are expressed in percentage of glucose-inhibited neurons detected per dish.

Hypothalamic NO real-time measurement. Wild-type mice were killed by decapitation without anesthesia. The hypothalamus was quickly harvested and maintained in 200 µl Krebs-Ringer oxygenated solution containing 2.5 mmol/l glucose at 37°C. A NO-specific amperometric probe (ISO-NOPF100; World Precision Instruments [WPI], Sarasota, FL) was implanted directly in the tissue and NO release was monitored. The hypothalamus was exposed to the following sequence of glucose concentrations (15 min each): 2.5, 0.1, and 2.5 mmol/l. The concentration of NO gas in the tissue was measured in real time with the data acquisition system LabTrax (WPI) connected to the free radical analyzer Apollo1000 (WPI). Data acquisition and analysis were performed with DataTrax2 software (WPI). The NO-specific amperometric probe was calibrated as previously described (26).

Data analysis. All data are presented as mean ± SEM. Statistical analysis was performed using Graphpad Prism 4.0 by two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test, one-way ANOVA followed by Dunnett post hoc test, or unpaired *t* test as described in the figure legends. *P* < 0.05 indicates statistical significance.

RESULTS

Hypoglycemia activates ventral hypothalamic nNOS. We have previously shown that decreased glucose concentration increases NO production in cultured VMH glucose-

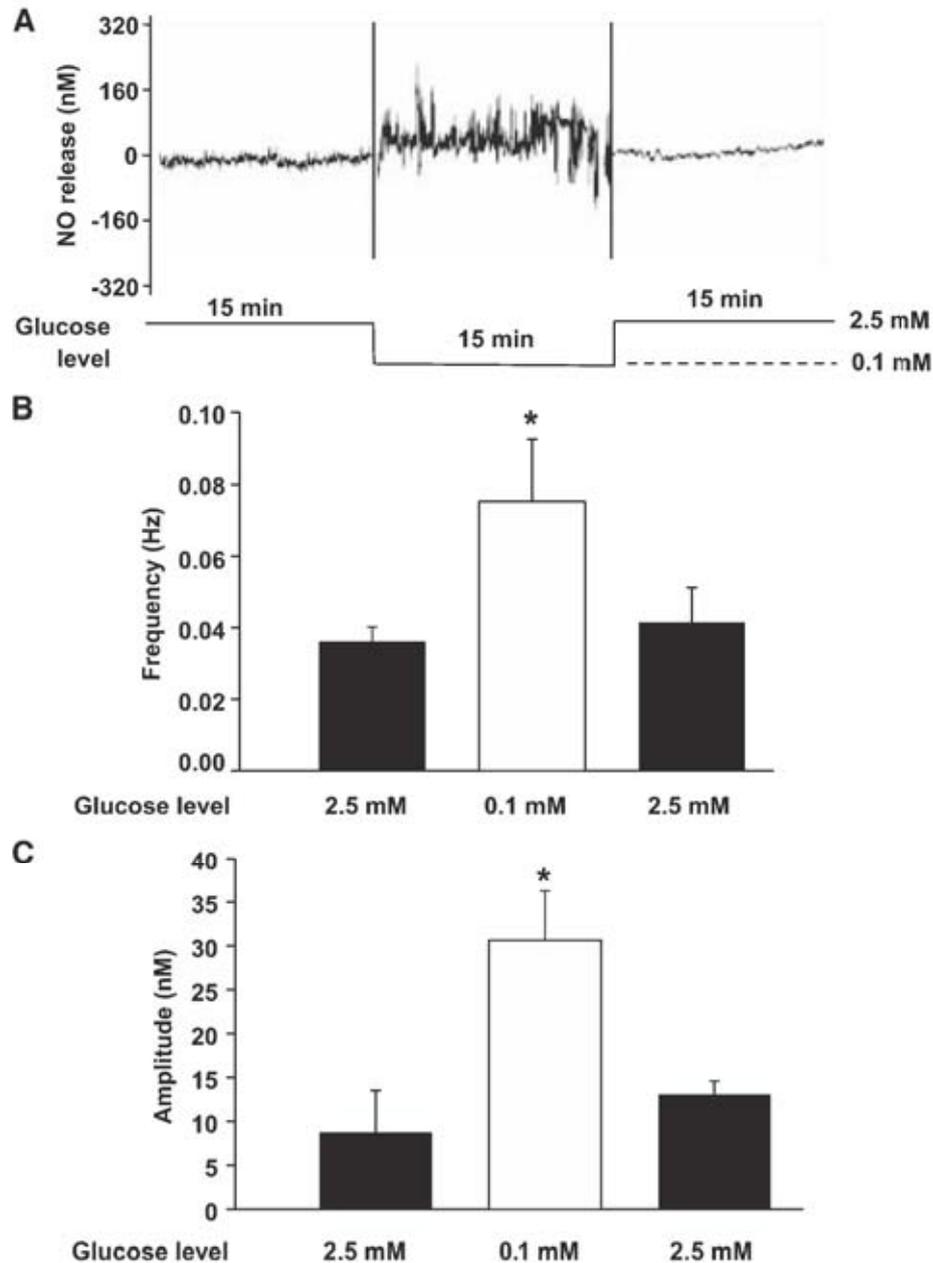


FIG. 1. Decreased glucose increases VMH NO release. *A*: Representative trace of ex vivo amperometric measurements of NO release from mouse hypothalamus in response to an extracellular glucose decrease from 2.5 to 0.1 mmol/l. *B*: Mean frequency and (*C*) mean amplitude of NO release calculated during the last 10-min recording for each glucose level ($n = 4$). * $P < 0.05$ vs. 2.5 mmol/l glucose (one-way ANOVA).

inhibited neurons in vitro using a membrane sensitive dye (20). To confirm that decreased glucose increases hypothalamic NO production, we performed amperometric measurement of NO release in hypothalamic chunks ex vivo using an NO-sensitive electrode. As shown in Figure 1, decreased glucose from 2.5 to 0.1 mmol/l significantly increases the amplitude (3.5-fold; $P < 0.05$) and frequency (2.1-fold; $P < 0.05$) of NO release. NO release returned to

baseline when extracellular solution was subsequently raised to 2.5 mmol/l glucose (Fig. 1).

To provide in vivo evidence that hypoglycemia increases hypothalamic NO production, constitutive (nNOS and eNOS) and inducible (iNOS) activity was determined in ventral hypothalamus from rats 60 min after insulin injection. Insulin-hypoglycemia significantly increased constitutive NOS activity by 1.45 ± 0.11 -fold. iNOS activity was

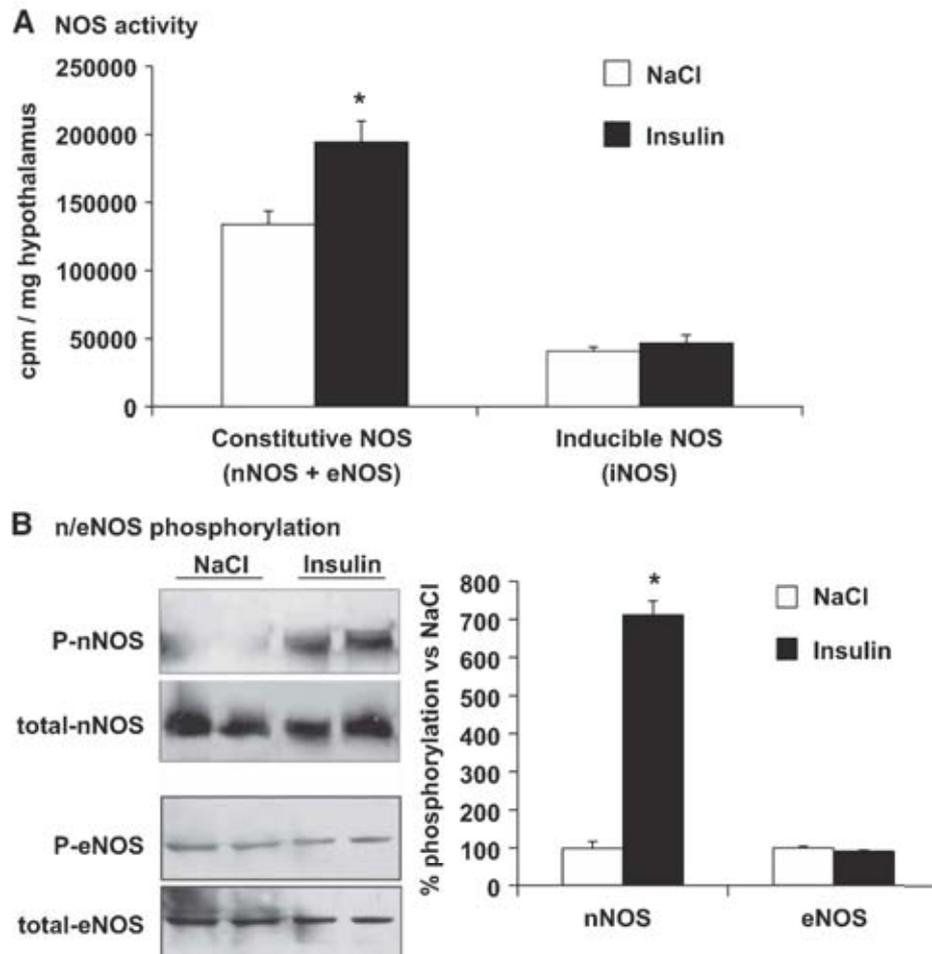


FIG. 2. Hypoglycemia increases ventral hypothalamic nNOS activity. *A:* Ventral hypothalamic constitutive (eNOS) or inducible (iNOS) NOS activity from rats injected subcutaneously with saline (control, $n = 6$) or insulin (2 units/kg; $n = 6$) 60 min after injection. *B:* Representative Western blot (*left panel*) of ventral hypothalamic total nNOS, phosphorylated nNOS (P-nNOS), total eNOS, and P-eNOS from control or insulin-treated rats injected subcutaneously with saline ($n = 5$) or insulin ($n = 5$) 60 min after injection. The *right panel* shows the quantification of the ratio between P-nNOS or P-eNOS and total nNOS or eNOS, respectively. Data are means \pm SEM and represented as percentage of saline where the control group was considered to be 100%. * $P < 0.05$ vs. control (unpaired t test).

not changed (Fig. 2A). Cortical constitutive NOS activity was not changed in insulin-induced hypoglycemia treated rats versus control (data not shown). To determine whether nNOS or eNOS is primarily responsible for hypoglycemia-induced hypothalamic NO production, Western blots against the phosphorylated nNOS and eNOS forms were performed. nNOS phosphorylation was significantly increased by 7.26 ± 0.36 -fold, whereas eNOS phosphorylation was not changed (Fig. 2B), suggesting that nNOS activation was responsible for increased VMH constitutive NOS activity during insulin-induced hypoglycemia. These data strongly suggest that insulin-induced hypoglycemia stimulates nNOS-derived VMH NO production.

Inhibition of VMH NO signaling impairs the CRR to hypoglycemia. We first evaluated the effect of brain NO on the counterregulatory response to acute insulin-induced hypoglycemia. As shown in Fig. 3, rats infused with the nonselective NOS inhibitor L-NMMA either intracere-

broventricularly or into the ventromedial hypothalamus showed significantly lower glycemia at 60 and 90 min after insulin injection compared with control. Many of the effects of NO are mediated by its receptor, soluble guanylyl cyclase (sGC) (14). Inhibition of VMH sGC with ODQ decreased the glycemia at 45, 60, 90, and 120 min after insulin injection (Fig. 3B).

To confirm that VMH NO production is involved in the CRR, we performed hyperinsulinemic/hypoglycemic clamps (5,6,21,27). During the hypoglycemic clamp, blood glucose was decreased to similar levels in control (52 ± 1.1 mg/dl) and treated (54 ± 1.0 mg/dl) animals (Fig. 4). Administration of the nonselective NOS inhibitor L-NMMA in the ventromedial hypothalamus significantly increased the glucose infusion rate (GIR) necessary to maintain the hypoglycemia plateau (Fig. 4). Changes in GIR were associated with significant decreases in epinephrine levels at 60 and 90 min in L-NMMA-treated animals (Fig. 4). Glucagon (Fig. 4) and norepinephrine (data not shown)

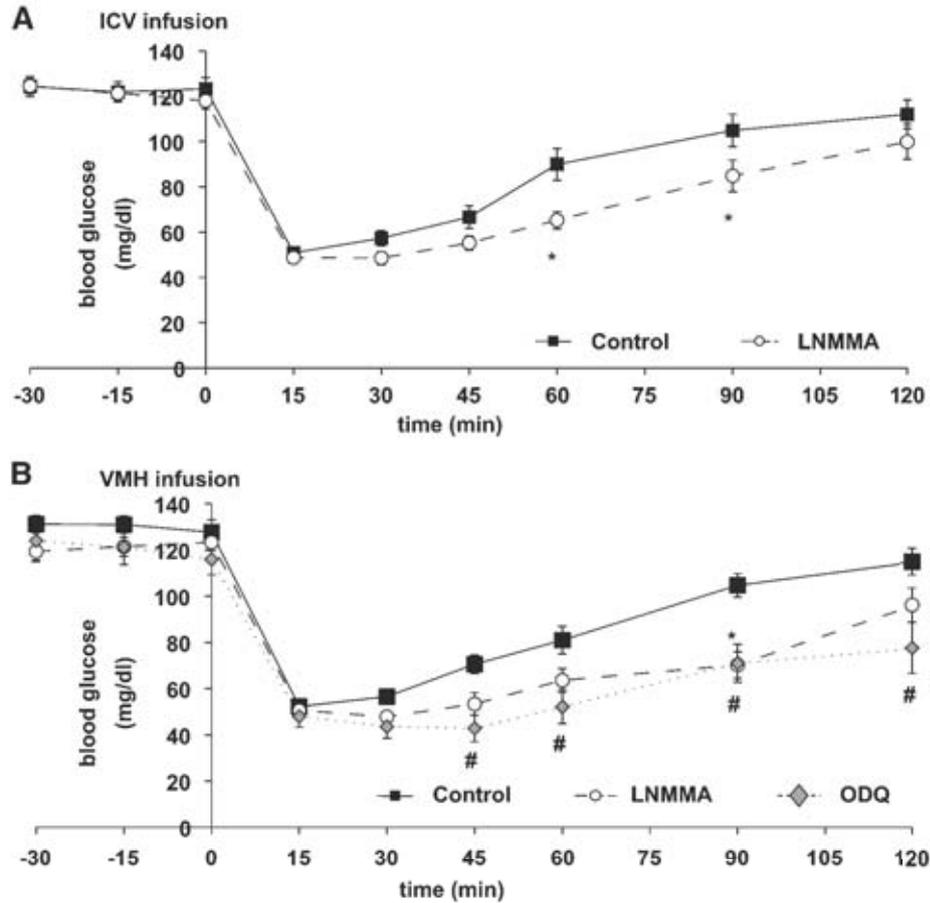


FIG. 3. VMH NO signaling is necessary for recovery to euglycemia after insulin-induced hypoglycemia. Blood glucose levels in response to insulin-induced hypoglycemia (1 unit/kg, i.v.) in rats receiving (A) ICV perfusion of aCSF (controls; $n = 14$) or L-NMMA (50 mmol/l; $n = 14$), or (B) unilateral VMH injection of aCSF ($n = 7$), L-NMMA (50 mmol/l, $n = 7$), or ODQ (0.1 mmol/l, $n = 5$). *, # $P < 0.05$ vs. control (two-way ANOVA).

levels were not significantly reduced. Taken together, these data show that the VMH NO-SGC signaling pathway is necessary for the full generation of the sympathoadrenal response to hypoglycemia.

VMH nNOS is involved in the CRR to hypoglycemia. To confirm that VMH nNOS derived-NO is involved in the CRR, we performed hyperinsulinemic/hypoglycemic clamps in wild-type, nNOS, and eNOS knockout mice. The GIR required to maintain the hypoglycemic plateau over the last 30 min was significantly higher in nNOS knockout and lower in eNOS knockout mice compared with wild type (wild type: $17.4 \pm 1.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; nNOS: $31.1 \pm 1.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; eNOS: $12.8 \pm 1.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; $P < 0.05$; Fig. 5B). At the end of the clamp, epinephrine levels were significantly reduced in the nNOS knockout compared with wild-type or eNOS knockout mice (Fig. 5C). There was no difference in plasma norepinephrine levels between groups (data not shown). Because the initial blood glucose level was lower in nNOS knockout than wild-type mice (nNOS knockout: $136 \pm 6.4 \text{ mg/dl}$ versus wild type: $179 \pm 7.5 \text{ mg/dl}$; $P < 0.05$), we measured plasma insulin and liver glycogen content in another group of mice after 5-h fast. Neither plasma insulin nor liver

glycogen concentration was different between nNOS knockout and wild-type mice (insulin: wild type: 0.58 ± 0.2 versus nNOS: $0.52 \pm 0.1 \text{ ng/ml}$; glycogen: wild type: 23.5 ± 2.8 versus nNOS: $24.7 \pm 5.3 \text{ mg/g}$ of liver; $n = 4$; $P > 0.05$). These data show that NO produced specifically by the nNOS isoform is necessary for the full generation of the CRR.

nNOS is necessary for glucose sensing by VMH glucose-inhibited neurons. Data from our laboratory and others suggest that VMH GSNs play a role in sensing hypoglycemia and initiating the CRR (9,13,27–32). Because we showed above that the CRR is impaired in nNOS knockout mice, we wanted to determine whether the glucose sensitivity of GSNs is also impaired. We used whole-cell current clamp recording techniques to measure the membrane potential, action potential frequency (APF), and input resistance of VMH neurons in response to decreased glucose levels from 2.5 to 0.1 mmol/l in wild-type and nNOS knockout mice. In wild-type mice, three neurons (3 of 36, 8%) were identified as glucose-excited neurons by a decrease in their membrane potential, APF, and input resistance in response to 2.5–0.1 mmol/l glucose decrease, whereas 11 neurons (11 of 36, 30%) increased

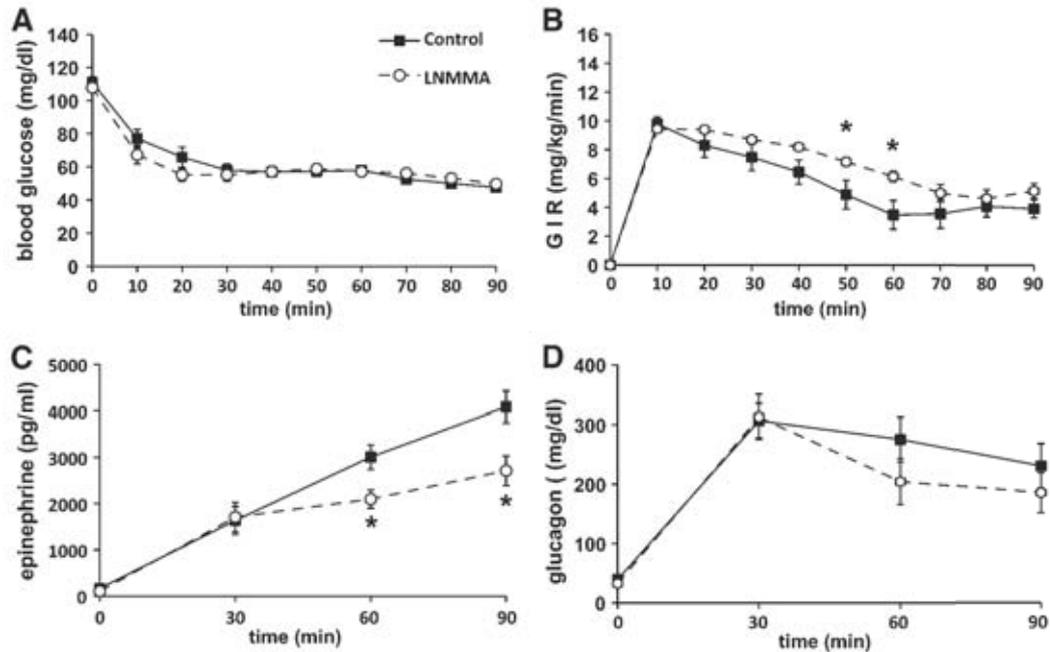


FIG. 4. VMH NOS inhibition impairs the CRR to hypoglycemia. Blood glucose level (A); GIR (B); plasma epinephrine (C), and glucagon levels (D) during hyperinsulinemic/hypoglycemic clamp ($1.2 \text{ units} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) of animals injected bilaterally in the ventromedial hypothalamus with aCSF (controls; $n = 8$) or L-NMMA (50 mmol/l; $n = 6$). * $P < 0.05$ vs. controls (two-way ANOVA).

membrane potential, APF, and input resistance in response to decreased glucose and were identified as glucose-inhibited neurons (Fig. 6A). In nNOS knockout mice, four neurons (4 of 25, 16%) were identified as glucose-excited neurons (Fig. 6B). In contrast, no glucose-inhibited neurons (0 of 25) were found in nNOS knockout mice VMN. Results are summarized in Fig. 6C. We confirmed these electrophysiology data using a membrane potential sensitive dye in cultured VMH neurons. Whereas $13.0 \pm 1.2\%$ of VMH neurons were glucose-inhibited neurons in wild-type mice (14 dishes; 1,352 neurons; 7 mice), only $2.4 \pm 0.6\%$ were glucose-inhibited neurons in nNOS knockout mice (12 dishes; 961 neurons; 3 mice; $P < 0.05$). These data suggest that VMH glucose-inhibited neuron glucose sensing is impaired in nNOS knockout mice.

DISCUSSION

This study confirms that decreased glucose increases VMH NO production in vivo. Moreover, this study supports our novel hypothesis that NO production is necessary for the full generation of the CRR and glucose sensing in VMH glucose-inhibited neurons. Pharmacological inhibition of VMH NO signaling decreases blood glucose recovery and impairs the CRR after hypoglycemia. Interestingly, the impaired CRR in mice lacking nNOS is associated with an almost complete loss of VMH glucose-inhibited neurons, consistent with our recently published data showing that NO production is required for glucose-inhibited neurons to sense glucose (24). We have previously shown that VMH glucose-inhibited neurons are less sensitive to decreased glucose under conditions where the CRR is also impaired. These data suggested a role for VMH glucose-inhibited neurons in the CRR (12,13,28,31,33). Our current data

strengthen the hypothesis that detection of hypoglycemia by VMH glucose-inhibited neurons is a necessary step in the full generation of the CRR.

We found previously, using in vitro cellular imaging, that among cultured VMH neurons only glucose-inhibited neurons produce NO in response to decreased glucose. nNOS, but not eNOS, mediates NO production in VMH glucose-inhibited neurons (20). In the present study, we confirm this finding by showing that decreased glucose increases VMH NO release using an NO-sensitive electrode. Moreover, insulin-induced hypoglycemia in vivo increases VMH NOS activity and nNOS phosphorylation. Because insulin increases nNOS-derived NO production in cultured VMH neurons (20), insulin injection may contribute to the increased VMH NO production during this clinically relevant form of hypoglycemia. These data strongly support our hypothesis that nNOS activation during insulin-induced hypoglycemia induces VMH NO production in vivo. Cabou et al. (16) recently suggested that cerebral insulin injection during euglycemia increases hypothalamic NO production through eNOS. Insulin-induced hypoglycemia did not increase eNOS activity in our study. Moreover, because Cabou et al. did not evaluate nNOS activity, they did not rule out a role for this NOS isoform in response to cerebral insulin injection. It is possible that prolonged hyperinsulinemia and/or recurrent episodes of insulin-induced hypoglycemia further increase VMH NO production through a combined increase in nNOS and eNOS activity.

What is the role of VMH NO production in energetic homeostasis during energy deficit? One putative function for VMH NO production is to increase cerebral blood flow, leading to increased local nutrient availability. Human and

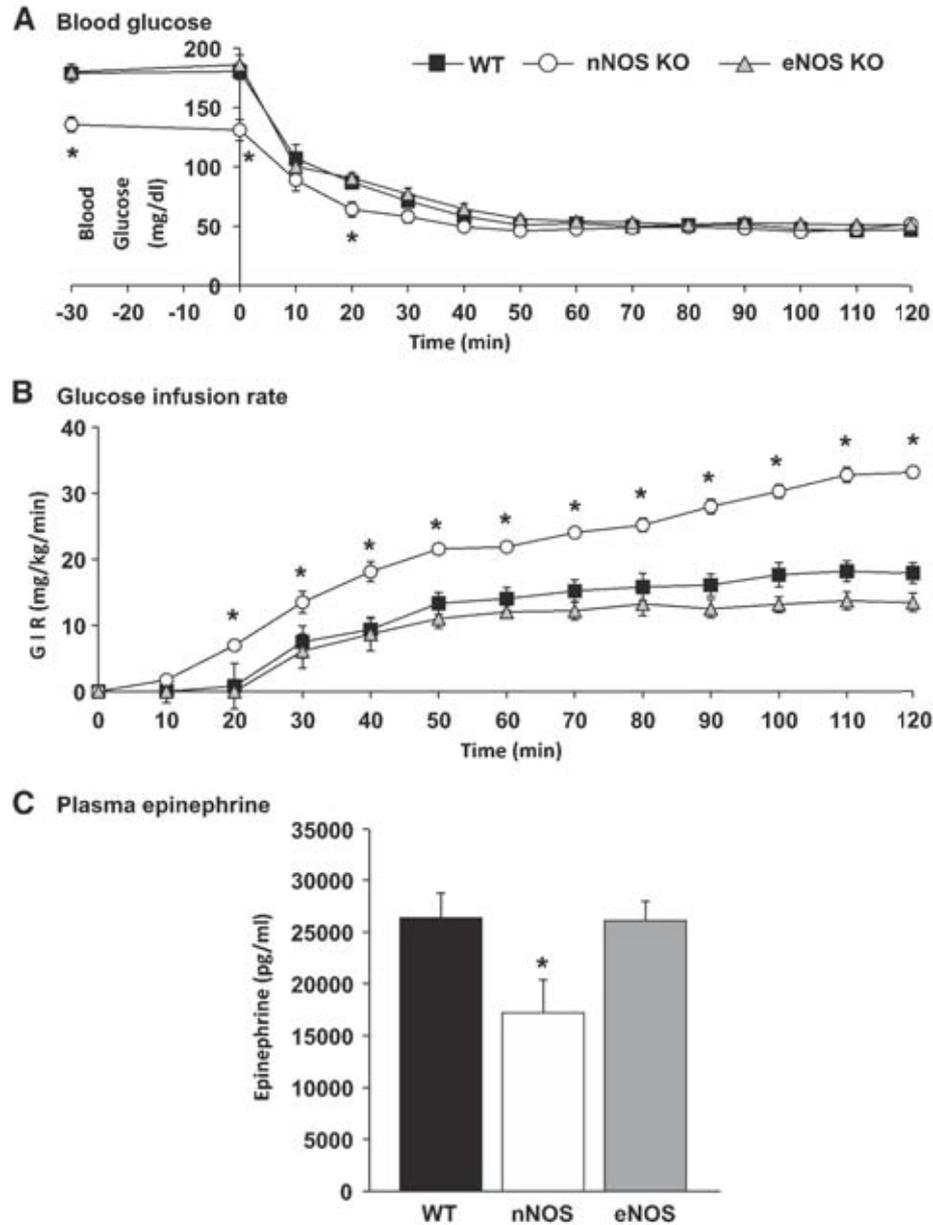


FIG. 5. nNOS is necessary for full initiation of the CRR. Blood glucose concentration (A), glucose infusion rate (B), and plasma epinephrine taken at the end of the clamp (C) of wild-type (WT) ($n = 14$), eNOS ($n = 6$), and nNOS ($n = 7$) knockout mice during hyperinsulinemic/hypoglycemic clamp ($1.2 \text{ units} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). * $P < 0.05$ vs. wild type (two-way ANOVA).

animal studies show that insulin-induced hypoglycemia is associated with increased cerebral blood flow in many brain areas including the hypothalamus (34–36). For example, Page et al. (37) recently showed that decreased blood glucose increased hypothalamic blood flow prior to the release of CRR hormones. One of the main physiological functions of NO is related to the vascular system. The role of eNOS-mediated NO production in peripheral vasorelaxation is well established (38). One of the unique

features of NO as a neurotransmitter is the ability to diffuse across cell membranes (14). Thus, although we did not see an increase in eNOS activity in our studies, NO produced in VMH glucose-inhibited neurons may diffuse to adjacent vascular smooth muscle cells lining cerebral vasculature and cause vasodilatation. However, we think that this is unlikely because Horinaka et al. (39) and Paulson (40) showed that increased cerebral blood flow in response to hypoglycemia was NO independent. These

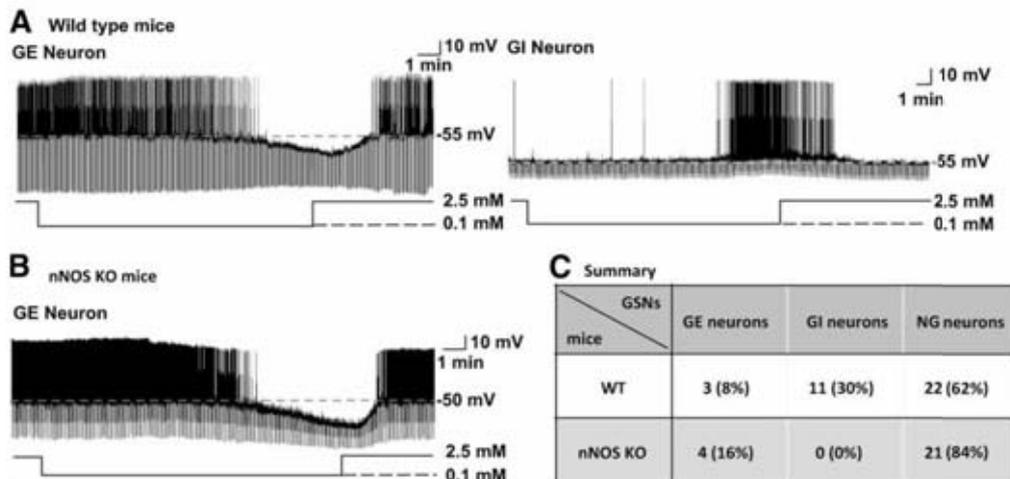


FIG. 6. nNOS is necessary for glucose sensing by VMH glucose-inhibited neurons. Representative whole-cell current-clamp recordings of VMH glucose-excited and glucose-inhibited neurons in brain slices from wild-type (WT) mice (A) or nNOS knockout mice (B). The dotted lines represent the resting membrane potential. Glucose concentration changes are schematically displayed below each recording. Downward deflections in whole-cell current-clamp recordings represent the membrane voltage responses to constant hyperpolarizing currents. (C) Table summarizing the number (and %) of VMH glucose-excited (GE), glucose-inhibited (GI), or nonglucose-sensitive (NG) neurons in wild-type or nNOS knockout mice.

data suggest that VMH nNOS-mediated NO production does not play a role in blood flow regulation. This is consistent with other studies that suggest a role for the β -adrenergic receptor and/or the ATP-sensitive K^+ channel (K_{ATP}) in hypoglycemia-induced increases in cerebral blood flow (41,42).

Another function of VMH NO production is through the CRR. We used two complementary approaches to show that VMH NO production is a physiologically required step in the full generation of the CRR. First, inhibition of VMH NO production slows down the recovery to euglycemia in response to acute insulin-induced hypoglycemia. Although this is the most physiological evaluation of the CRR, it is difficult to reliably compare the levels of counterregulatory hormones between treatments due to variation in the actual degree of hypoglycemia. Thus, we also used the "gold standard" technique for studying the CRR: hyperinsulinemic/hypoglycemic clamps. Here we found that VMH NOS inhibition increases the GIR and decreases epinephrine production during hypoglycemic clamps. Moreover, the GIR is significantly greater and epinephrine production lower in nNOS knockout versus wild-type mice. These data confirm our hypothesis that VMH NO plays an important role in the control of the CRR. However, it is also clear that the CRR was not completely abolished by either L-NMMA injection or in the nNOS knockout mice. These findings are consistent with parallel regulation of the CRR by other central or peripheral glucose sensors. Finally, both eNOS and nNOS knockout mice exhibit insulin resistance (18,43). In eNOS knockout mice, there was a decrease in the GIR to maintain the hypoglycemic plateau that may reflect insulin resistance (18,43). The milder insulin resistance in nNOS knockout mice probably did not affect the GIR due to the high insulin concentration used for the hypoglycemic clamp.

The next step was to explore the molecular and cellular mechanisms by which VMH NO production contributes to the CRR. Our previous studies suggested a role for VMH glucose-inhibited neurons in the generation of the CRR

because their response to decreased glucose is impaired when the CRR is impaired (12,13,28,31,33). We have recently shown that NO production via nNOS is necessary for VMH glucose-inhibited neurons to depolarize in response to decreased glucose (24). In the present study, VMH glucose-inhibited neurons were not detected in nNOS knockout mice in response to decreased extracellular glucose from 2.5 to 0.1 mmol/l. This glucose concentration decrease, although supraphysiologic, was necessary because we have previously shown that recurrent episodes of hypoglycemia decrease the response of VMH glucose-inhibited neurons to decreased glucose. In fact, after recurrent hypoglycemia the response of VMH glucose-inhibited neurons to a glucose decrease from 2.5 to 0.5 mmol/l was almost undetectable; however their response to a glucose decrease from 2.5 to 0.1 mmol/l was intact (13). Thus, using a glucose decrease to 0.1 mmol/l suggests that functional VMH glucose-inhibited neurons are almost absent in nNOS knockout mice. The CRR was also impaired in nNOS knockout mice. These data reinforce our hypothesis that activation of VMH glucose-inhibited neurons in response to decreased glucose is critical for the full generation of the CRR. Restoration of VMH NO expression in nNOS knockout mice would lend further strength to this conclusion. However, the effects of NO are highly dependent on the localization of intracellular NO production, which, in turn, is highly dependent on intracellular NOS localization (14). Overexpressing nNOS or injecting NO donors into the ventromedial hypothalamus of nNOS knockout mice would not mimic physiological NO production and could lead to difficulties in data interpretation. Our data suggest also that the NO receptor sGC mediates the effect of VMH NO on the CRR. sGC is expressed in all VMH neurons including glucose-inhibited neurons (20). Cyclic guanosine monophosphate produced by sGC has been shown to modulate neuronal activity (17,44). Taken together, these data suggest that decreased glucose depolarizes VMH glucose-inhibited neurons through NO-sGC signaling and leads to full generation of the CRR.

On the other hand, our data suggest that VMH glucose-inhibited neurons are not the only mediator of the CRR because the CRR is still present, albeit impaired, in the absence of NO signaling. VMH glucose-excited neurons are normal in nNOS knockout mice. Moreover, Miki et al. (30) showed that the CRR was impaired and VMH glucose-excited neurons were absent in K_{ATP} -deficient mice. Therefore, it is likely that VMH glucose-inhibited and glucose-excited neurons as well as extrahypothalamic glucose sensors are needed for the full generation of the CRR. Interestingly, glucagon but not epinephrine secretion in response to hypoglycemia was impaired in the K_{ATP} -deficient mice (30). In contrast our data indicate that inhibition of VMH NO signaling impairs epinephrine but not glucagon or norepinephrine secretion in response to hypoglycemia. This suggests that different glucose sensors may control unique elements of the CRR.

In conclusion, the VMH NO-sGC signaling pathway is a key component in the generation of the CRR. Moreover, our data provide strong support for our hypothesis that VMH glucose-inhibited neurons play a crucial role in the central detection of hypoglycemia and generation of the CRR. These data also suggest that potentiating NO signaling may enhance epinephrine secretion and glucose recovery in diabetic patients exposed to recurrent hypoglycemia. The role of NO signaling in epinephrine secretion in response to hypoglycemia is extremely relevant for patients with type 1 diabetes who lack a glucagon response. Thus, the NO-sGC signaling pathway may offer new therapeutic targets to improve the treatment of patients with type 1 and advanced type 2 diabetes using intensive insulin therapy.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by the Juvenile Diabetes Research Foundation (X.F. and V.H.R.) and the National Institutes of Health (2R01-DK-55619 and 1R01-DK-64566) (V.H.R.). X.F. was also supported in part by the Philippe Foundation.

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

REFERENCES

1. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329:977-986
2. Amiel SA, Tamborlane WV, Simonson DC, Sherwin RS. Defective glucose counterregulation after strict glycemic control of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1987;316:1376-1383
3. Cryer PE. Glucose counterregulation in man. *Diabetes* 1981;30:261-264
4. Routh VH, Song Z, Liu X. The role of glucosensing neurons in the detection of hypoglycemia. *Diabetes Technol Ther* 2004;6:413-421
5. Borg MA, Sherwin RS, Borg WP, Tamborlane WV, Shulman GI. Local ventromedial hypothalamus glucose perfusion blocks counterregulation during systemic hypoglycemia in awake rats. *J Clin Invest* 1997;99:361-365
6. Borg WP, Daring MJ, Sherwin RS, Borg MA, Brines ML, Shulman GI. Ventromedial hypothalamic lesions in rats suppress counterregulatory responses to hypoglycemia. *J Clin Invest* 1994;93:1677-1682
7. Borg WP, Sherwin RS, Daring MJ, Borg MA, Shulman GI. Local ventromedial hypothalamus glucopenia triggers counterregulatory hormone release. *Diabetes* 1995;44:180-184
8. Fioramonti X, Conté S, Song Z, Routh VH, Lorsignol A, Pénicaud L. Characterization of glucosensing neuron subpopulations in the arcuate nucleus: integration in neuropeptide Y and pro-opio melanocortin networks? *Diabetes* 2007;56:1219-1227
9. Kang L, Routh VH, Kuzhikandathil EV, Gaspers LD, Levin BE. Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons. *Diabetes* 2004;53:549-559
10. Song Z, Levin BE, McArdle JJ, Baldos N, Routh VH. Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes* 2001;50:2673-2681
11. Wang R, Liu X, Hentges ST, Dunn-Meynell AA, Levin BE, Wang W, Routh VH. The regulation of glucose-excited neurons in the hypothalamic arcuate nucleus by glucose and feeding relevant peptides. *Diabetes* 2004;53:1959-1965
12. Powell AM, Sherwin RS, Shulman GI. Impaired hormonal responses to hypoglycemia in spontaneously diabetic and recurrently hypoglycemic rats: reversibility and stimulus specificity of the deficits. *J Clin Invest* 1993;92:2667-2674
13. Song Z, Routh VH. Recurrent hypoglycemia reduces the glucose sensitivity of glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus nucleus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;291:R1283-R1287
14. Guix FX, Urbesalago L, Coma M, Muñoz FJ. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol* 2005;76:126-152
15. Cabou C, Campistron G, Marsollier N, Leloup C, Cuciani-Guglielmaci C, Pénicaud L, Drucker DJ, Magnan C, Burelkin R. Brain glucagon-like peptide-1 regulates arterial blood flow, heart rate, and insulin sensitivity. *Diabetes* 2008;57:2577-2587
16. Cabou C, Cusi PD, Campistron G, Knauf C, Mathieu C, Sartori C, Amar J, Scherrer U, Burelkin R. Central insulin regulates heart rate and arterial blood flow: an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism altered during diabetes. *Diabetes* 2007;56:2872-2877
17. Riediger T, Giannini P, Erguven E, Lutz T. Nitric oxide directly inhibits ghrelin-activated neurons of the arcuate nucleus. *Brain Res* 2006;1125:37-45
18. Shankar RR, Wu Y, Shen HQ, Zhu JS, Baron AD. Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance. *Diabetes* 2000;49:684-687
19. Canabal DD, Potian JG, Duran RG, McArdle JJ, Routh VH. Hyperglycemia impairs glucose and insulin regulation of nitric oxide production in glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;293:R592-R600
20. Canabal DD, Song Z, Potian JG, Beuve A, McArdle JJ, Routh VH. Glucose, insulin, and leptin signaling pathways modulate nitric oxide synthesis in glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;292:R1418-R1428
21. Saberi M, Bohland M, Donovan CM. The locus for hypoglycemic detection shifts with the rate of fall in glycemia: the role of portal-superior mesenteric vein glucose sensing. *Diabetes* 2008;57:1380-1386
22. Cryer PE. Role of growth hormone in glucose counterregulation. *Horm Res* 1990;46:192-194
23. Fioramonti X, Lorsignol A, Taupignon A, Pénicaud L. A new ATP-sensitive K^+ channel-independent mechanism is involved in glucose-excited neurons of mouse arcuate nucleus. *Diabetes* 2004;53:2767-2775
24. Murphy BA, Fakira KA, Song Z, Beuve A, Routh VH. AMP-activated protein kinase and nitric oxide regulate the glucose sensitivity of ventromedial hypothalamic glucose-inhibited neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;297:C750-C758
25. Murphy BA, Fioramonti X, Jochowitz N, Fakira K, Gagen K, Conté S, Lorsignol A, Pénicaud L, Martin WJ, Routh VH. Fasting enhances the response of arcuate neuropeptide Y-glucose-inhibited neurons to decreased extracellular glucose. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;296:C746-C756
26. Knauf C, Prevot V, Stefano GB, Mortreux G, Beauvillain JC, Croix D. Evidence for a spontaneous nitric oxide release from the rat median eminence: influence on gonadotropin-releasing hormone release. *Endocrinology* 2001;142:2343-2350
27. McCrimmon RJ, Fan X, Cheng H, McNay E, Chan O, Shaw M, Ding Y, Zhu W, Sherwin RS. Activation of AMP-activated protein kinase within the ventromedial hypothalamus amplifies counterregulatory hormone responses in rats with defective counterregulation. *Diabetes* 2006;55:1755-1760
28. Borg MA, Tamborlane WV, Shulman GI, Sherwin RS. Local lactate perfusion of the ventromedial hypothalamus suppresses hypoglycemic counterregulation. *Diabetes* 2003;52:663-666
29. Kang L, Dunn-Meynell AA, Routh VH, Gaspers LD, Nagata Y, Nishimura T, Eiki J, Zhang BB, Levin BE. Glucokinase is a critical regulator of ventromedial hypothalamic neuronal glucosensing. *Diabetes* 2006;55:412-420
30. Miki T, Liss B, Minami K, Shiuchi T, Saraya A, Kashima Y, Horiuchi M, Ashcroft F, Minokoshi Y, Roeper J, Seino S. ATP-sensitive K^+ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nat Neurosci* 2001;4:507-512
31. Song Z, Routh VH. Differential effects of glucose and lactate on glucosens-

- ing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes* 2005;54:15–22
32. Levin BE, Becker TC, Elki J, Zhang BB, Dunn-Meynell AA. Ventromedial hypothalamic glucokinase is an important mediator of the counterregulatory response to insulin-induced hypoglycemia. *Diabetes* 2008;57:1371–1379
 33. McCrimmon RJ, Song Z, Cheng H, McNay EC, Weikart-Yeckel C, Fan X, Routh VH, Sherwin RS. Corticotrophin-releasing factor receptors within the ventromedial hypothalamus regulate hypoglycemia-induced hormonal counterregulation. *J Clin Invest* 2006;116:1723–1730
 34. Bryan RM, Jr, Eichler MY, Johnson TD, Woodward WT, Williams JL. Cerebral blood flow, plasma catecholamines, and electroencephalogram during hypoglycemia and recovery after glucose infusion. *J Neurosurg Anesthesiol* 1994;6:24–34
 35. Bryan RM, Jr, Hollinger BR, Keefer KA, Page RB. Regional cerebral and neural lobe blood flow during insulin-induced hypoglycemia in unanesthetized rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1987;7:96–102
 36. Kennan RP, Takahashi K, Pan C, Shamon H, Pan JW. Human cerebral blood flow and metabolism in acute insulin-induced hypoglycemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25:527–534
 37. Page KA, Arora J, Qiu M, Relwani R, Constable RT, Sherwin RS. Small decrements in systemic glucose provoke increases in hypothalamic blood flow prior to the release of counterregulatory hormones. *Diabetes* 2009;58:448–452
 38. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109–142
 39. Horinaka N, Artz N, Jehle J, Takahashi S, Kennedy C, Sokoloff L. Examination of potential mechanisms in the enhancement of cerebral blood flow by hypoglycemia and pharmacological doses of deoxyglucose. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997;17:54–63
 40. Paulson OB. Blood-brain barrier, brain metabolism and cerebral blood flow. *Eur Neuropsychopharmacol* 2002;12:495–501
 41. Hollinger BR, Bryan RM. Beta-receptor-mediated increase in cerebral blood flow during hypoglycemia. *Am J Physiol* 1987;253:H949–H955
 42. Horinaka N, Kuang TY, Pak H, Wang R, Jehle J, Kennedy C, Sokoloff L. Blockade of cerebral blood flow response to insulin-induced hypoglycemia by caffeine and glibenclamide in conscious rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997;17:1309–1318
 43. Duplain H, Burcelin R, Sartori C, Cook S, Egli M, Lepori M, Vollenweider P, Pedrazzini T, Nicod P, Thorens B, Scherrer U. Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2001;104:342–345
 44. Ahern GP, Klyachko VA, Jackson MB. cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. *Trends Neurosci* 2002;25:510–517

Apelin, diabetes, and obesity

Isabelle Castan-Laurell · Cédric Dray ·
Camille Attané · Thibaut Duparc · Claude Knauf ·
Philippe Valet

© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract Apelin is a peptide known as the ligand of the G-protein-coupled receptor APJ. Several active apelin forms exist such as apelin-36, apelin-17, apelin-13, and the pyroglutamated form of apelin-13. Apelin and APJ are expressed in the central nervous system, particularly in the hypothalamus and in many peripheral tissues. Apelin has been shown to be involved in the regulation of cardiovascular and fluid homeostasis, food intake, cell proliferation, and angiogenesis. In addition to be an ubiquitous peptide, apelin is also produced and secreted by adipocytes and thus considered as an adipokine. This has opened a new field of investigation establishing a link between apelin and metabolic disorders (obesity, type 2 diabetes, etc.) which is the focus of the present review. Several studies, but not all, have reported an increase of plasma apelin concentrations in humans and in animal models with different metabolic pathologies. Moreover, important roles for apelin both in glucose and lipid metabolism have been highlighted as well as the associated signaling pathways. Apelin appears as a beneficial adipokine with anti-obesity and anti-diabetic properties and thus as a promising therapeutic target in metabolic disorders.

Keywords Apelin · Insulin resistance · Obesity · Glucose metabolism · Lipid metabolism

I. Castan-Laurell (✉) · C. Dray · C. Attané · T. Duparc ·
C. Knauf · P. Valet
UMR 1048 INSERM, Institut des Maladies Métaboliques et
Cardiovasculaires (I2MC)/Université Paul Sabatier,
1 Ave J. Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France
e-mail: isabelle.castan@inserm.fr

Apelin and its receptor APJ

The APJ receptor is a G-protein-coupled receptor (GPCR) identified in 1993 in humans, displaying a close sequence homology to the angiotensin II receptor type 1 and thus named AGTRL1 [1]. The APJ gene was mapped to chromosome 11 and later sublocalized to the locus 11q12. Its transcripts were first detected in many regions of the brain but APJ is expressed in a wide range of tissues [2]. Once cloned, APJ murine homologue was shown to emerge during embryogenesis, especially in the primary blood vessels and the forming heart [3]. APJ has been shown to inhibit forskolin-induced cAMP accumulation in transfected CHO cells [2, 4] to induce the phosphorylation of ERK, Akt, or p70 S6 kinase [5–7].

In 1998, Tatemoto and coworkers purified from bovine stomach extracts a protein that binds to the “orphan” APJ receptor [8]. Based on peptide sequences, they cloned the corresponding bovine and human cDNA. The gene encodes a 77-amino-acid polypeptide that includes a secretory signal sequence. The ligand of the orphan receptor APJ consisted in the C-terminal part of this polypeptide and was called “apelin,” for *APJ Endogenous Ligand* [8]. The apelin gene has been localized on the X chromosome at Xq25-q26.3 by several mapping studies, including one reported by the group of O’Dowd who first discovered the APJ receptor [9].

Apelin gene is expressed in many peripheral tissues as well as in different brain areas (for review, see [10, 11]). Its product, namely preproapelin, was found to exist in tissues under a high molecular weight form consisting in a dimer owing to disulfide linkage [12, 13]. So far, three active forms of apelin, consisting of 13, 17, or 36 amino acids and the pyroglutamated apelin-13 (Pyr(1)-apelin-13) originating from a common 77-amino-acid pre-propeptide precursor,

have been described. The sequencing of the human, bovine, rat, and mouse preproapelin has shown that there is a high sequence homology among the four species and a perfect identity for the last 22 C-terminal amino acids [8, 9]. The predominant molecular forms of endogenous hypothalamic and plasma apelin in rats were found to be apelin-36, apelin-17, and apelin-13 [14, 15]. Pyr(1)-apelin-13 was found to be the predominant isoform in human cardiac tissue [16]. Due to a higher resistance to degradation, Pyr(1)-apelin-13 has been largely used to study in vivo or in vitro responses and is considered to be a physiologically relevant APJ ligand [10, 16]. The hydrophobic residues of apelin-13 play important roles in interactions with the APJ receptor [17]. Apelin-13 and apelin-36 differ in receptor binding affinity and in their ability to affect the intracellular trafficking of the apelin receptor [14, 18]. APJ, as a GPCR, could be internalized. This process involves recruitment of β -arrestins to GPCRs and leads to its desensitization [19]. Apelin-17 was found to be the most potent inducer of APJ internalization and the removal of a single amino-acid at the C-terminus abolished this process [4]. More recently, it has been shown that apelin-13-internalized receptor dissociated from β -arrestin1, rapidly recycled to the cell surface through a Rab-4 dependent process, while the apelin-36-internalized receptor remained associated with β -arrestin1 which may target the receptor for degradation in lysosome [20].

Given the broad range of physiological actions of apelin, APJ represents a new interesting target for pharmacological agent design. A mutation of the carboxyl-terminal phenylalanine in apelin-13 (F13A) revealed a loss of function since concomitant administration of F13A blocked the hypotensive effects of apelin-13, establishing F13A as a competitive antagonist for APJ [13]. Very recently, a novel APJ antagonist has been designed using a bivalent ligand approach [21]. One of the compounds, a cyclic peptide was shown to be a competitive antagonist of APJ and will open the investigation field for the development of further antagonists with good affinity and efficiency. A nonpeptidic agonist has also been identified using fluorescence resonance energy transfer (FRET) [22]. This agonist (E339-3D6) induced vasorelaxation of rat aorta and inhibited systemic vasopressin release in water-deprived mice [22]. Its potency did not differ from that of apelin-17 and thus E339-3D6 could represent a new generation of vasodilator and aquaretic agents.

Apelin bioavailability also deserves to be better defined, especially regarding the predominant isoforms circulating in plasma since numerous clinical studies have reported a very wide range of apelin plasma levels, in both healthy controls and in patients with different pathologies. Since standard immunoassays cannot specifically quantify each apelin peptide, liquid chromatography/tandem mass spectrometry has been adapted to quantify each plasma apelin

fragment [23]. Surprisingly, the main circulating isoforms of apelin were not detected [23]. These discrepancies between the peptides quantification by immunoassay and those detected by mass spectrometry raises a number of questions and provide evidence that the nature and the concentrations of the circulating immunoreactive apelin isoforms is a very important task.

Apelin can also be degraded by the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), a monocarboxypeptidase homologue to ACE [24]. ACE2 hydrolyses both apelin-13 and apelin-36 with high catalytic efficiency [24, 25]. Since different studies have shown that ACE2 is an essential regulator of heart function [26] and is involved in diabetes [27], it is of interest to study in parallel ACE2 regulation alongside with apelin action.

Apelin and APJ regulation during obesity and type 2 diabetes

Apelin in adipose tissue

Apelin has been detected in adipose tissue by Tatemoto et al. [28] and, later on, the work of Boucher et al. [29] has demonstrated that apelin was not only produced but also secreted by adipocytes. Apelin has been then considered as a new adipokine. In addition, there is a close relationship between apelin and insulin both in vivo and in vitro [29]. The expression of apelin in adipocytes is increased in various mouse models of obesity associated with hyperinsulinemia. During fasting and after re-feeding in mice, the pattern of apelin expression in adipocytes parallels the plasma levels of insulin. In the absence of insulin (streptozotocin-treated mice), apelin mRNAs in adipocytes are decreased. In cultured 3T3F442A adipocytes, insulin treatment results in increased expression and secretion of apelin [29].

Other factors regulate positively the expression of apelin in adipocytes [11]. TNF α , an inflammatory cytokine elevated during obesity-associated insulin resistance, increases apelin expression both in human and mouse adipocytes [30]. In the gastrointestinal tract, inflammation also increases apelin expression [31]. The role of apelin has not yet been fully elucidated but it could have anti-inflammatory properties [32]. Overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) coactivator-1 α (PGC1 α), a key regulator of cellular energy homeostasis in oxidative tissues, also induces apelin expression and secretion in human adipocyte [33]. Eicosapentaenoic acid (EPA), a polyunsaturated fatty acid (PUFA) from the omega-3 family, increased also basal and insulin-stimulated apelin secretion and gene expression in 3T3-L1

adipocytes [34]. Moreover, rats fed a cafeteria diet daily treated with oral administration of EPA ethyl ester had also a higher expression of apelin in adipose tissue [35]. Altogether, these data could be in line with the improvement of insulin sensitivity observed with PUFA treatment [36].

It has been shown that apelin expression increased during adipogenesis [29, 37] and more recently that blockade of the renin-angiotensin system (RAS) ameliorates apelin expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes [37]. Thus, through increased apelin production, RAS blockers could prevent excessive lipid accumulation and the generation of reactive oxygen species (ROS) in differentiating adipocytes [37]. Inhibition of ROS production by apelin has also been shown in other cell types [38, 39].

Obesity is related to an increase of hypoxia in adipose tissue and increased expression of the transcription factor hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) contribute to chronic inflammation during obesity [40]. Different studies have shown that hypoxia induced expression and secretion of apelin by both human and murine adipocytes [41–43]. Moreover, it has been demonstrated that induction of apelin under hypoxic conditions is mediated by direct HIF-1 binding to the apelin gene. Since apelin is involved in angiogenesis, which is essential for adipose tissue expansion, apelin has been proposed to contribute to the development of new vasculature in expanding fat depot [42, 43].

Curiously, negative modulators of apelin expression in adipocyte are not numerous, and only glucocorticoids (dexamethasone) have described to decrease apelin mRNA levels in 3T3-L1 cells [44].

APJ in adipose tissue

APJ is present in human and mouse adipose tissue, both in isolated adipocytes and in the stroma vascular fraction [45–48]. In contrast, data concerning APJ expression or regulation in adipocyte cell lines (3T3-L1 or 3T3F442A) are very few. With obesity, APJ expression, like apelin, is increased in human adipose tissue and this up-regulation could be reversed after diet-induced weight loss [45]. Interestingly, there is a close relationship between apelin and APJ expression in adipose tissue, and changes in insulin levels might be involved for both apelin and APJ regulations [45]. However, this regulation can be different according to the severity of insulin resistance. During fasting/refeeding transition, APJ expression is significantly increased in adipose tissue of HFD mice but not in highly insulin-resistant db/db mice. In a fed state, apelin and APJ expressions were increased in adipose tissue of HFD mice compared to control whereas in db/db mice, the level was similar to control mice [47]. In control and type 2 diabetic

subjects undergoing an euglycemic-hyperinsulinemic clamp, there was no significant difference in the basal state in apelin and APJ mRNA levels and, after insulin infusion, APJ and apelin expressions were increased only in control subjects. The effect of insulin was completely blunted in adipose tissue of type 2 diabetic patients. Therefore, these data underline the need for specific clinical and longitudinal studies in humans to better define the regulation of this system in metabolic diseases.

Plasma concentrations of apelin in obese and diabetic patients

The first report in humans of plasma apelin concentrations was shown in obese and hyperinsulinemic subjects [29, 30] where plasma apelin levels are increased. Different groups also found increased plasma apelin levels in morbidly obese subjects [49], in patients without a severe obesity but with impaired glucose tolerance or with type 2 diabetes [50]. In morbidly obese patients with or without diabetes, apelin levels were only higher in the morbidly obese diabetic subjects [51]. However, reduced plasma apelin levels were described in obese subjects with untreated type 2 diabetes, compared to non-diabetic subjects [52, 53]. These results could be consistent with the fact that after 14 weeks of anti-diabetic treatment (rosiglitazone and metformin), plasma apelin levels were increased and the glycemic profile improved [54]. In women with gestational diabetes, no significant differences in plasma apelin levels were observed compared to women with normal glucose tolerance [46]. All values obtained in the cited studies are reported in Table 1. Interestingly, in gestational diabetic lactating women, apelin was present in both colostrum and mature milk, apelin concentrations being higher in mature milk [55]. In the serum of the same patients, there was a trend to lower concentrations of apelin in women with gestational diabetes compared to lactating healthy women [55]. The role of apelin in milk and the regulation involved needs to be further investigated.

Plasma apelin concentrations were also measured in obese children. In pubertal obese children, apelin as well as adiponectin levels were lower compared to non-obese children [56]. However, when comparing plasma apelin concentration in obese girls (between 14 and 18 years old) and in girls with either anorexia nervosa or with no otherwise specified eating disorders, apelin concentrations were significantly higher in obese compared to healthy control but lower in patients with both eating disorders compared to healthy control [57]. Recently, no difference in apelin levels was found and no significant correlations between apelin and weight status, body fat, insulin

Table 1 Plasma apelin concentrations in adults obese and type 2 diabetic patients

Patients, <i>n</i> = number of case	Apelinemia (pg/ml)	BMI (kg/m ²)	Reference
Control, <i>n</i> = 8	170.6 ± 23.8	23.4 ± 0.6	Boucher et al. [29]
Obese, <i>n</i> = 9	250.9 ± 24.2	32.6 ± 0.4	
Control, <i>n</i> = 12	272 ± 20	20.7 ± 0.6	Castan-Laurell et al. [45]
Obese, <i>n</i> = 20	369 ± 25	32.2 ± 6.4	
Control, <i>n</i> = 12	174 ± 14	22 ± 2	Heinonen et al. [49, 60]
Morbidly obese, <i>n</i> = 25	736 ± 50	48 ± 1	
Control, <i>n</i> = 12	1120 ± 510	24.9 ± 3.1	Soriguer et al. [51]
Morbidly obese, <i>n</i> = 15	1070 ± 103	51.5 ± 7.3	
Obese and diabetic, <i>n</i> = 16	1870 ± 122	53.9 ± 7.5	
Control, <i>n</i> = 36	389 ± 17	23.0 ± 3.2	Li et al. [50]
Glucose intolerant, <i>n</i> = 26	459 ± 32	23.9 ± 3.4	
Diabetic, <i>n</i> = 30	498 ± 35	23.5 ± 2.4	
Control, <i>n</i> = 11	101.7 ± 3.6	23.0 ± 0.4	Dray et al. [47, 66]
Diabetic, <i>n</i> = 12	127.8 ± 11.6	31.0 ± 1.3	
Control, <i>n</i> = 40	750 ± 420	28.9 ± 3.3	Erdem et al. [52]
Untreated diabetic, <i>n</i> = 40	440 ± 380	29.9 ± 3.1	
Control, <i>n</i> = 101	1656.5 ^a	22.9 ^a	Telejko et al. [46]
Gestational diabetes, <i>n</i> = 101	1555.6 ^a	23.8 ^a	

^a Median value

resistance, and cardiovascular risk factors associated with obesity between 80 obese and 40 lean children [58]. In children with type 1 diabetes, plasma apelin levels were increased compared to non-diabetic subjects [59] suggesting that the lack of insulin in this situation has no impact on apelin levels.

Changes in apelin levels after weight loss or bariatric surgery in obese individuals were also investigated. Diet-induced weight loss decreases apelin levels in moderate obese women [45] but not significantly in patients with the metabolic syndrome [60] or in obese children [58]. Bariatric surgery resulted in a significant decrease in apelin levels only in morbidly obese patients exhibiting impaired fasting glucose or type 2 diabetes before surgery [51].

All together, these studies underline that obesity, per se, is probably not the main determinant of increased plasma apelin concentrations since circulating apelin levels are not necessarily significantly correlated to the body mass index (BMI) in all the published studies [46, 51, 55, 58]. However, plasma apelin or changes in plasma apelin concentrations were found to correlate significantly with serum triglycerides, glucose [51], TNF α [60], HOMA-IR, (Homeostasis Assessment Model of Insulin Resistance) [45, 50, 61], and HbA1c [47].

Finally, a polymorphism study performed in China on 3,700 subjects (1,892 patients with type II vs. 1,800 controls) described a strong association between a variant of the gene for apelin and plasma levels of fasting glucose in the Han population [62].

Effect of apelin on insulin secretion

The first evidence of an involvement of apelin on insulin secretion came from the study of Sorhede Winzell et al. showing that apelin inhibits insulin secretion stimulated by glucose *in vivo* in mice and *in vitro* in isolated islets of Langerhans [63]. Apelin-36 was used in this study and had no glucose-lowering effect by itself. More recently, apelin-13 was also shown to inhibit insulin secretion stimulated by high glucose concentrations (10 mM) or potentiated by GLP-1 in INS-1 cells [64]. The intracellular pathway activated by apelin involves a decrease of cAMP (or GLP-1-stimulated cAMP production) in the β -cells by a PI3-kinase-dependent activation of phosphodiesterase 3B rather than the inhibition of adenylyl cyclase. Interestingly, the dose-effect of apelin was biphasic, and maximal stimulation was reached at 100 nM [64, 65]. It could be speculated that in hyperinsulinemic obese subjects, the high levels of plasma apelin failed to decrease insulinemia.

Peripheral effects of apelin on energy metabolism

Glucose metabolism

Apelin effects in standard mice

Intravenous apelin administration at low concentration (200 pmol/kg) decreased blood glucose in mice and

improved glucose tolerance [66]. Furthermore, during an hyperinsulinemic-euglycemic clamp, when the hepatic glucose production is totally inhibited, apelin increases glucose utilization throughout the entire organism mainly due to a rise in glucose uptake by skeletal muscles and adipose tissues. In isolated skeletal muscle (soleus), apelin stimulates glucose transport and its effect is additive to that of insulin [66]. The associated signaling pathway involved was shown to be dependent of AMP-activated protein kinase (AMPK) and of endothelium NO synthase (eNOS) activation. AMPK is a key enzyme of energy metabolism activated during ATP depletion in cells. It is involved in various metabolic processes stimulating the production of energy such as glucose transport [67]. We demonstrated by both in vivo and in vitro experiments that AMPK was phosphorylated by apelin in soleus muscle and involved in apelin-stimulated glucose transport [66]. More recently, in cultured C2C12 myotubes, apelin-induced glucose uptake was also shown to be dependent of AMPK activation [68]. In addition, like insulin, apelin phosphorylates Akt and its activation is necessary for glucose transport both ex vivo in soleus muscle and in C2C12 myotubes. Moreover, the activation of Akt is AMPK dependent [66, 68].

Apelin was also shown to stimulate glucose transport in an AMPK-dependent manner in human adipose tissue [48]. Moreover, in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes (due to TNF α treatment for 24 h), insulin-stimulated glucose uptake was reduced by 47%, whereas apelin treatment

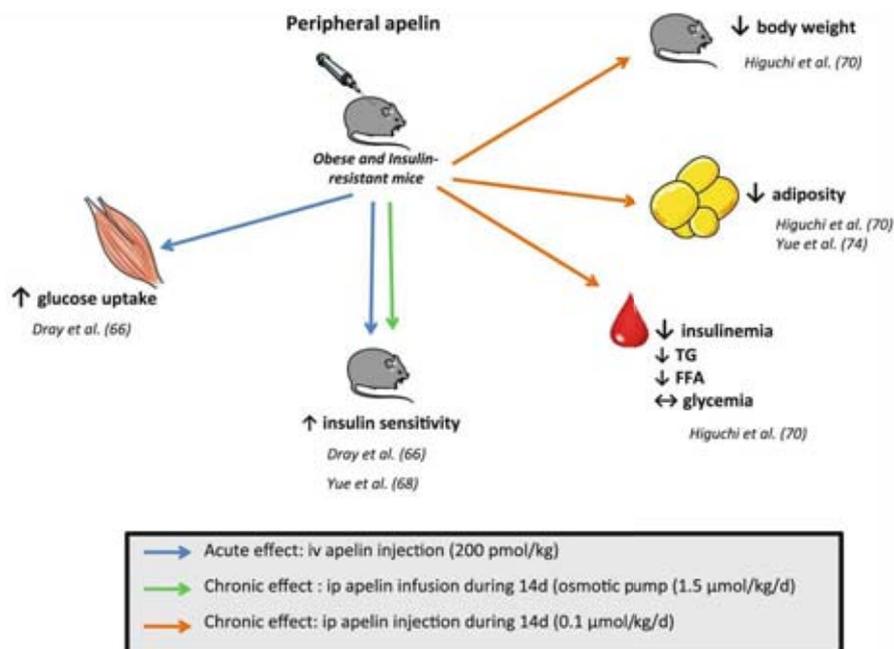
resulted in an increased glucose uptake through the PI3K/Akt pathway and improved insulin-stimulated glucose uptake [69].

Apelin effects in obese and insulin-resistant mice

Mice fed a high-fat diet (HFD) for several weeks become obese, hyperinsulinemic, and insulin resistant. Glucose tolerance is significantly improved in these mice receiving i.v. apelin bolus before oral glucose tolerance test (OGTT). In addition, the loss of insulin sensitivity observed during a euglycemic-hyperinsulinemic clamp in insulin-resistant mice was improved with an apelin perfusion during the clamp [66]. Thus, apelin acute treatment is still efficient in obese insulin-resistant mice and improves the altered glucose metabolism especially by increasing glucose uptake in skeletal muscle. Very recently, chronic apelin treatment in insulin-resistant mice was shown to improve insulin sensitivity [68]. The role of apelin in glucose homeostasis was also confirmed by the phenotype of apelin null mice that are hyperinsulinemic and insulin resistant. The loss of insulin sensitivity in apelin $-/-$ mice was exacerbated by a high fat/high sucrose diet [68].

Thus, apelin is positively involved in carbohydrate metabolism and displays beneficial properties such as glucose-lowering effects (Fig. 1). Although plasma apelin levels are elevated in obese insulin-resistant mice, exogenous apelin is still efficient and thus apelin resistance

Fig. 1 Metabolic effects of peripheral apelin after acute or chronic treatment in obese and insulin-resistant mice. Apelin has been administered either by intravenous injection (i.v.) during acute treatment or by daily intraperitoneal injection (i.p.) or via osmotic pump during chronic treatment. TG triglycerides, FFA fatty acids



unexpected. We hypothesized that the increased levels of apelin might constitute a compensatory mechanism to delay the onset of insulin resistance.

Lipid metabolism

Apelin effects in standard rodents

The first study that reported a role of apelin on lipid metabolism was related to chronic peripheral administration of apelin (during 2 weeks) in standard mice [70]. Daily i.p. apelin injection was shown to decrease the triglycerides content in adipose tissue and the weight of different fat depots and in chow-fed mice [70]. A decreased adiposity was also found in obese mice. Plasma triglycerides were also decreased in both normal and obese apelin-treated mice. The treatment did not affect average food intake but increase rectal temperature and O_2 consumption. An increased expression of mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1) was observed in brown adipose tissue (BAT) (Higuchi 2007). All together, the authors suggest that apelin increases energy expenditure through UCP1 activation. In addition to changes in BAT UCP1, apelin treatment also increased UCP3 expression in skeletal muscle but no metabolic effects were measured [70]. Since increase of UCP3 content in muscle could result in an increase of mitochondrial biogenesis, a recent study was conducted in rat in order to know whether chronic apelin treatment would lead to an increase in mitochondrial enzyme activity and protein content in skeletal muscle [71]. Accordingly, enzyme activities of β -HAD (involved in the mitochondrial oxidative capacities), citrate synthase (involved in the citric acid cycle), and cytochrome C oxidase (COX) (involved in the respiratory chain) were increased in response to apelin treatment in rat triceps. Surprisingly, the increase of mitochondrial markers was independent of increased PGC-1 α expression, identified as a key player in the regulation of mitochondrial biogenesis. However, PGC-1 β was up-regulated in triceps muscle. The role of PGC-1 β in muscle is less clear than the one of PGC-1 α but very recently, Wright et al. provide evidence, by overexpressing PGC-1 β in muscle of HFD rats, that it has a protective effect against lipid-induced insulin resistance [72]. Thus, apelin treatment during insulin resistance through PGC-1 β activation could improve mitochondrial oxidative capacities.

Apelin effects in obese and insulin-resistant mice

Chronic apelin treatment decreased adiposity and similar results were obtained in mice over-expressing apelin (apelin-transgenic (apelin-Tg) mice) fed a HFD. Apelin-Tg mice exhibited a resistance against diet-induced obesity,

increased oxygen consumption and body temperature without modification of food intake [73]. Interestingly, diet-induced obesity resistance of apelin-Tg mice was correlated with vascular formation in skeletal muscle due to an increase of angiopoietin-1 and its receptor Tie 2 [73]. These mice present also increased mitochondrial biogenesis in skeletal muscle but by a PGC-1 α -independent pathway. The involvement of PGC-1 β has not been studied.

In agreement with the phenotype of apelin-Tg mice, apelin $-/-$ (APKO mice) mice had increased abdominal adiposity and increased circulating FFA levels [74]. After reintroduction of exogenous apelin (apelin infusion during 2 weeks) in APKO mice, adiposity and fatty acids but also glycerol levels were decreased in apelin-treated APKO mice, suggesting a role of apelin in lipolysis regulation. In both isolated adipocytes and 3T3-L1 differentiated adipocytes, apelin was shown to inhibit isoproterenol- (β -adrenergic agonist) induced lipolysis [74] through a pathway involving Gq, Gi, and AMPK. However, in human adipose tissue explants or isolated adipocytes, apelin had no effect on basal or isoproterenol-stimulated lipolysis even though apelin was shown to activate AMPK in human adipose tissue [48].

A question to be addressed is the outcome of lipids. Modification in the lipid metabolism conducting to excess fatty acid accumulation in non-adipose tissues is a hallmark of metabolic diseases. Our group is presently investigating the oxidative capacities of skeletal muscles in response to apelin treatment since apelin activates AMPK in muscle [66]. Interestingly, chronic apelin treatment increases fatty acid β -oxidation in soleus muscle especially in HFD fed mice [75]. These data are in agreement with the fact that apelin treatment improves insulin sensitivity.

Central effects of apelin on energy metabolism

Both apelin and its receptor APJ have been detected throughout the central nervous system particularly in the hypothalamus. Apelin mRNAs are present in different nuclei including the paraventricular, arcuate, and supra-optic nuclei that are involved in the control of behavioral, endocrine processes, and energy homeostasis [76]. Apelin-positive nerve fibers in the hypothalamus imply the existence of apelinergic neurons and thus a dual action of apelin as a circulating peptide and a neurotransmitter. So far, it is not known whether peripheral plasma apelin can reach the hypothalamus and could modulate apelin levels in the hypothalamus. Higuchi et al. mentioned that apelin concentration in the hypothalamus is increased after apelin i.p. injection [70].

The effects of acute intracerebroventricular (i.c.v.) apelin administration on food intake and energy expenditure were mainly studied in rats and the results are

contradictory. Apelin i.c.v. was shown to decrease food intake in fed and fasted rats [77] and during nocturnally administration of apelin whereas during day-time apelin stimulates feeding [78]. Furthermore, no significant effect was reported on the accumulated 24 h food intake in rat [79]. More recently, Clark et al. showed that i.c.v. apelin injection decreased food and water intake and respiratory exchange ratio in control rats, but had no effect in high-fat fed rats [80]. Moreover, apelin induced a down-regulation of central APJ receptor only in HF-fed rats, suggesting that a decreased central response to apelin could induce obesity [80]. In addition, an increase of core body temperature and locomotor activity was also observed after central apelin injection [81]. In mice, only one study measured the same effects as well as food intake after a chronic 10 day i.c.v. infusion of apelin-13 (1 µg/day) into the third ventricle. Apelin treatment increased food intake (on day 3 to 7), locomotor activity especially during the nocturnal period when feeding occurs and body temperature only during the period of activity [82]. Moreover, these mice had increased adiposity [82].

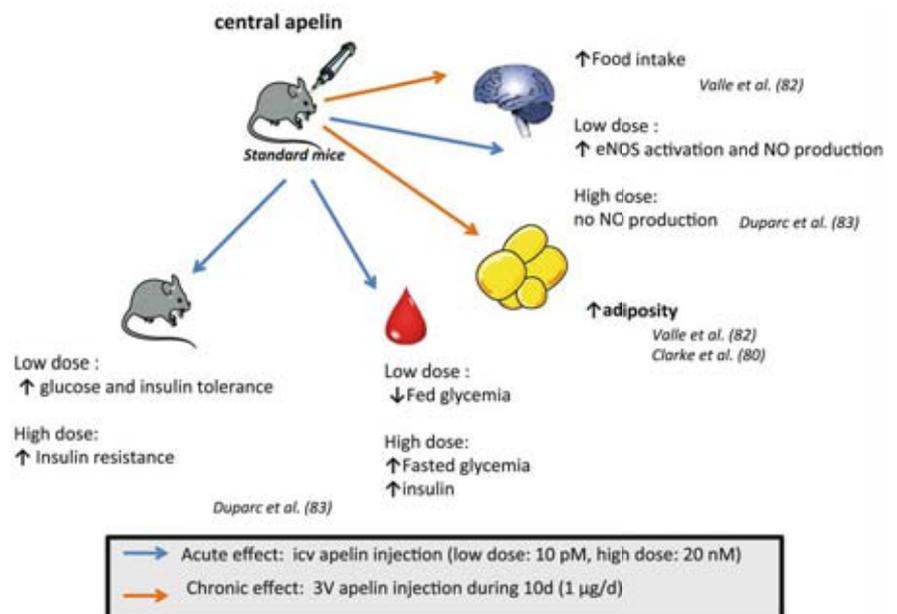
The role of central apelin on glucose metabolism has been recently studied in our group. Acute i.c.v. apelin has differential effect depending of the injected dose and the nutritional status [83]. Acute low-dose of i.c.v. apelin injection decreased peripheral fed glycemia, increased glucose and insulin tolerance in mice via a NO signaling pathway. All these beneficial actions of i.c.v. apelin on glucose homeostasis were blunted in HFD obese/diabetic mice. As the opposite, acute high-dose of i.c.v. apelin

injection provoked fasted hyperglycemia/hyperinsulinemia and decreased insulin sensitivity in normal mice. These effects are summarized in Fig. 2. Moreover, acute high-dose of i.c.v. apelin injection in HFD mice increased fasted hyperglycemia. Thus, elevated levels of central apelin might impair glucose homeostasis since obese/diabetic mice, which are sensitive to peripheral apelin [66], have increased plasma apelin levels [83]. Both the finding of abolished circadian apelin regulation in HFD-treated mice and that of chronic apelin treatment in normal mice triggering insulin intolerance are consistent with this hypothesis [83]. Other parameters explaining this differential action of apelin is the fact that hypothalamic nuclei (ventromedian hypothalamus, dorsomedian hypothalamus and arcuate nucleus) had different modes of activation in term of c-Fos expression in response to i.c.v. apelin. Similar to the control of peripheral glycemia/insulinemia, hypothalamic neuronal activation by apelin varied according to the injected dose (low vs. high) of apelin and the nutritional status (fasted vs. fed) [83]. Actually, we hypothesized that a rise in hypothalamic apelin levels could be involved in the transition from normal to diabetic status.

Conclusion

Apelin has pleiotropic effects on numerous organs and tissues but recent experimental investigations have enhanced the role of apelin on whole body metabolism (Figs. 1, 2). Several studies have reported a protective

Fig. 2 Metabolic effects of central apelin after acute or chronic injection in standard mice. Apelin has been administered by intracerebroventricular injection (i.c.v.) during acute treatment or by daily injection in the third ventricle (3v) during chronic treatment



action of apelin in obesity-associated diseases [84] notably, a cardio-protective effect and now, apelin, like adiponectin, can be considered as an insulin-sensitizing agent. The insulin mimetic effects of apelin on glucose metabolism are very encouraging and of major interest in the context of a therapeutic approach in type 2 diabetic patients. Studies in humans will be essential to confirm the role of apelin on carbohydrate metabolism. In addition, accumulating evidence suggests that apelin is also an important regulator on lipid metabolism by reducing fat mass and promoting fuel consumption, which is also consistent with an improvement of insulin sensitivity. Those findings strengthen the beneficial effects of apelin in obesity-associated diseases and hoist it on the list of potent therapeutic target.

Acknowledgments We would like to thank the SFD 2009 (Société Francophone du Diabète) and the SNF (Société Française de Nutrition) for financial support.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. B.F. O'Dowd, M. Heiber, A. Chan, H.H. Heng, L.C. Tsui, J.L. Kennedy, X. Shi, A. Petronis, S.R. George, T. Nguyen, *Gene* **136**, 355 (1993)
2. A.D. Medhurst, C.A. Jennings, M.J. Robbins, R.P. Davis, C. Ellis, K.Y. Winborn, K.W. Lawrie, G. Hervieu, G. Riley, J.E. Bolaky, N.C. Herrity, P. Murdock, J.G. Darker, *J. Neurochem.* **84**, 1162 (2003)
3. E. Devic, K. Rizzoti, S. Bodin, B. Knibiehler, Y. Audigier, *Mech. Dev.* **84**, 199 (1999)
4. S. El Messari, X. Iturrioz, C. Fassot, N. De Mota, D. Roesch, C. Llorens-Cortes, *J. Neurochem.* **90**, 1290 (2004)
5. M.J. Moon, D.Y. Oh, J.S. Moon, D.K. Kim, J.I. Hwang, J.Y. Lee, J.I. Kim, S. Cho, H.B. Kwon, J.Y. Seong, *Mol. Cell. Endocrinol.* **277**, 51 (2007)
6. B. Masri, H. Lahlou, H. Mazarguil, B. Knibiehler, Y. Audigier, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 539 (2002)
7. B. Masri, N. Morin, M. Cornu, B. Knibiehler, Y. Audigier, *FASEB J.* **18**, 1909 (2004)
8. K. Tatemoto, M. Hosoya, Y. Habata, R. Fujii, T. Kakegawa, M.X. Zou, Y. Kawamata, S. Fukusumi, S. Hinuma, C. Kitada, T. Kurokawa, H. Onda, M. Fujino, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**, 471 (1998)
9. D.K. Lee, R. Cheng, T. Nguyen, T. Fan, A.P. Kariyawasam, Y. Liu, D.H. Osmond, S.R. George, B.F. O'Dowd, *J. Neurochem.* **74**, 34 (2000)
10. M.J. Kleinz, A.P. Davenport, *Pharmacol. Ther.* **107**, 198 (2005)
11. C. Carpenne, C. Dray, C. Attane, P. Valet, M.P. Portillo, I. Churrua, F.I. Milagro, I. Castan-Laurell, *J. Physiol. Biochem.* **63**, 359 (2007)
12. G. Foldes, F. Horkay, I. Szokodi, O. Vuolteenaho, M. Ilves, K.A. Lindstedt, M. Mayranpaa, B. Sarman, L. Seres, R. Skoumal, Z. Lako-Futo, R. deChatel, H. Ruskoaho, M. Toth, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**, 480 (2003)
13. D.K. Lee, V.R. Saldivia, T. Nguyen, R. Cheng, S.R. George, B.F. O'Dowd, *Endocrinology* **146**, 231 (2005)
14. Y. Kawamata, Y. Habata, S. Fukusumi, M. Hosoya, R. Fujii, S. Hinuma, N. Nishizawa, C. Kitada, H. Onda, O. Nishimura, M. Fujino, *Biochim. Biophys. Acta* **1538**, 162 (2001)
15. N. De Mota, A. Reaux-Le Goazigo, S. El Messari, N. Chartrel, D. Roesch, C. Dujardin, C. Kordon, H. Vaudry, F. Moos, C. Llorens-Cortes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 10464 (2004)
16. J.J. Maguire, M.J. Kleinz, S.L. Pitkin, A.P. Davenport, *Hypertension* **54**, 598 (2009)
17. X. Fan, N. Zhou, X. Zhang, M. Mukhtar, Z. Lu, J. Fang, G.C. DuBois, R.J. Pomerantz, *Biochemistry* **42**, 10163 (2003)
18. M. Hosoya, Y. Kawamata, S. Fukusumi, R. Fujii, Y. Habata, S. Hinuma, C. Kitada, S. Honda, T. Kurokawa, H. Onda, O. Nishimura, M. Fujino, *J. Biol. Chem.* **275**, 21061 (2000)
19. D. Calebiro, V.O. Nikolaev, L. Persani, M.J. Lohse, *Trends Pharmacol. Sci.* **31**, 221 (2010)
20. D.K. Lee, S.S. Ferguson, S.R. George, B.F. O'Dowd, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **395**, 185 (2010)
21. N.J. Macaluso, S.L. Pitkin, J.J. Maguire, A.P. Davenport, R.C. Glen, *ChemMedChem* **6**, 1017 (2011)
22. X. Iturrioz, R. Alvear-Perez, N. De Mota, C. Franchet, F. Guiller, V. Leroux, H. Dabire, M. Le Jouan, H. Chabane, R. Gerbier, D. Bonnet, A. Berdeaux, B. Maigret, J.L. Galzi, M. Hibert, C. Llorens-Cortes, *FASEB J.* **24**, 1506 (2010)
23. C. Mesmin, M. Dubois, F. Becher, F. Fenaille, E. Ezan, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **24**, 2875 (2010)
24. C. Vickers, P. Hales, V. Kaushik, L. Dick, J. Gavin, J. Tang, K. Godbout, T. Parsons, E. Baronas, F. Hsieh, S. Acton, M. Patane, A. Nichols, P. Tummino, *J. Biol. Chem.* **277**, 14838 (2002)
25. A.Z. Kalea, D. Batlle, *Curr. Opin. Investig. Drugs* **11**, 273 (2010)
26. K. Kuba, Y. Imai, T. Ohto-Nakanishi, J.M. Penninger, *Pharmacol. Ther.* **128**, 119 (2010)
27. S.M. Bindom, C.P. Hans, H. Xia, A.H. Boulares, E. Lazartigues, *Diabetes* **59**, 2540 (2010)
28. K. Tatemoto, *Nippon Rinsho* **58**, 737 (2000)
29. J. Boucher, B. Masri, D. Daviaud, S. Gesta, C. Guigne, A. Mazzucotelli, I. Castan-Laurell, I. Tack, B. Knibiehler, C. Carpenne, Y. Audigier, J.S. Saulnier-Blache, P. Valet, *Endocrinology* **146**, 1764 (2005)
30. D. Daviaud, J. Boucher, S. Gesta, C. Dray, C. Guigne, D. Quilliot, A. Ayav, O. Ziegler, C. Carpenne, J.S. Saulnier-Blache, P. Valet, I. Castan-Laurell, *FASEB J.* **20**, 1528 (2006)
31. S. Han, G. Wang, X. Qi, E.W. Englander, G.H. Greeley Jr., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **295**, G1068 (2008)
32. N.J. Leeper, M.M. Tedesco, Y. Kojima, G.M. Schultz, R.K. Kundu, E.A. Ashley, P.S. Tsao, R.L. Dalman, T. Quertermous, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **296**, 1329 (2009)
33. A. Mazzucotelli, C. Ribet, I. Castan-Laurell, D. Daviaud, C. Guigne, D. Langin, P. Valet, *Regul. Pept.* **150**, 33 (2008)
34. S. Lorente-Cebrian, M. Bustos, A. Marti, J.A. Martinez, M.J. Moreno-Aliaga, *Mol. Nutr. Food Res.* **54**(Suppl 1), S104 (2010)
35. N. Perez-Echarri, P. Perez-Matute, B. Marcos-Gomez, J.A. Martinez, M.J. Moreno-Aliaga, *Br. J. Nutr.* **101**, 1059 (2009)
36. L. Martin de Santa Olalla, F.J. Sánchez Muniz, M.P. Vaquero, *Nutr. Hosp.* **24**, 113 (2009)
37. W.W. Hung, T.J. Hsieh, T. Lin, P.C. Chou, P.J. Hsiao, K.D. Lin, S.J. Shin, *Cardiovasc. Drugs Ther.* **25**, 3 (2011)
38. C. Foussal, O. Lairez, D. Calise, A. Pathak, C. Guilbeau-Frugier, P. Valet, A. Parini, O. Kunduzova, *FEBS Lett.* **584**, 2363 (2010)
39. X.J. Zeng, S.P. Yu, L. Zhang, L. Wei, *Exp. Cell Res.* **316**, 1773 (2010)
40. Q. He, Z. Gao, J. Yin, J. Zhang, Z. Yun, J. Ye, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **300**, E877 (2011)
41. K. Geiger, A. Muendlein, N. Stark, C.H. Saely, M. Wabitsch, P. Fraunberger, H. Drexel, *Horm. Metab. Res.* **43**, 380 (2011)
42. A.J. Glassford, P. Yue, A.Y. Sheikh, H.J. Chun, S. Zarafshar, D.A. Chan, G.M. Reaven, T. Quertermous, P.S. Tsao, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **293**, 1590 (2007)

43. O. Kunduzova, N. Alet, N. Delesque-Touchard, L. Millet, I. Castan-Laurell, C. Muller, C. Dray, P. Schaeffer, J.P. Hérault, P. Savi, F. Bono, P. Valet, *FASEB J.* **22**, 4146 (2008)
44. L. Wei, X. Hou, K. Tatemoto, *Regul. Pept.* **132**, 27 (2005)
45. I. Castan-Laurell, M. Vitkova, D. Daviaud, C. Dray, M. Kovacicova, Z. Kovacova, J. Hejnova, V. Stich, P. Valet, *Eur. J. Endocrinol.* **158**, 905 (2008)
46. B. Telejko, M. Kuzmicki, N. Wawrusiewicz-Kurylonek, J. Szamatowicz, A. Nikolajuk, A. Zonenberg, D. Zwierz-Gugala, W. Jelski, P. Laudanski, J. Wilczynski, A. Kretowski, M. Gorska, *Diabetes Res. Clin. Pract.* **87**, 176 (2010)
47. C. Dray, C. Debard, J. Jager, E. Disse, D. Daviaud, P. Martin, C. Attane, E. Waneq, C. Guigne, F. Bost, J.F. Tanti, M. Laville, H. Vidal, P. Valet, I. Castan-Laurell, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **298**, 1161 (2010)
48. C. Attane, D. Daviaud, C. Dray, R. Dusaulcy, M. Masseboeuf, D. Prevot, C. Carpene, I. Castan-Laurell, P. Valet, *J. Mol. Endocrinol.* **46**, 21 (2011)
49. M.V. Heinonen, A.K. Purhonen, P. Miettinen, M. Paakkonen, E. Pirinen, E. Alhava, K. Akerman, K.H. Herzog, *Regul. Pept.* **130**, 7 (2005)
50. L. Li, G. Yang, Q. Li, Y. Tang, M. Yang, H. Yang, K. Li, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **114**, 544 (2006)
51. F. Sorriquer, L. Garrido-Sanchez, S. Garcia-Serrano, J.M. Garcia-Almeida, J. Garcia-Arnes, F.J. Tinahones, E. Garcia-Fuentes, *Obes. Surg.* **19**, 1574 (2009)
52. G. Erdem, T. Dogru, I. Tasci, A. Sonmez, S. Tapan, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **116**, 289 (2008)
53. R. Zhang, C. Hu, C.R. Wang, X.J. Ma, Y.Q. Bao, J. Xu, J.Y. Lu, W. Qin, K.S. Xiang, W.P. Jia, *Chin. Med. J. (Engl.)* **122**, 1273 (2009)
54. N.P. Kadoglou, H. Tsanikidis, A. Kapelouzou, I. Vrabas, I. Vitta, P.E. Karayannacos, C.D. Liapis, N. Sailer, *Metabolism* **59**, 373 (2010)
55. S. Aydin, *Peptides* **31**, 2236 (2010)
56. S. Tapan, E. Tascilar, A. Abaci, A. Sonmez, S. Kilic, M.K. Erbil, O. Ozcan, *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **23**, 1039 (2010)
57. K. Ziara, J. Oswiecimska, E. Swietochowska, D. Ziara, Z. Ostrowska, M. Stojewska, E. Klimacka-Nawrot, A. Dyduch, B. Blonska-Fajfrowska, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95**, 2935 (2010)
58. Reinehr, T., Woelfle, J., Roth, C.L.: Lack of association between apelin, insulin resistance, cardiovascular risk factors, and obesity in children: a longitudinal analysis. *Metabolism*. (2011). doi:10.1016/j.metabol.2011.02.005
59. C. Meral, E. Tascilar, F. Karademir, I.A. Tanju, F. Cekmez, O.M. Ipcioglu, C.N. Ercin, I. Gocmen, T. Dogru, *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **23**, 497 (2010)
60. M.V. Heinonen, D.E. Laaksonen, T. Karhu, L. Karhunen, T. Laitinen, S. Kainulainen, A. Rissanen, L. Niskanen, K.H. Herzog, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **19**, 626 (2009)
61. C.N. Ercin, T. Dogru, S. Tapan, M. Kara, C. Haymana, N. Karadurmus, Y. Karslioglu, C. Acikel, *Metabolism* **59**, 977 (2010)
62. Y. Zhang, C. Shen, X. Li, G. Ren, X. Fan, F. Ren, N. Zhang, J. Sun, J. Yang, *Chin. Med. J.* **122**, 1273 (2009)
63. M. Sorhede Winzell, C. Magnusson, B. Ahren, *Regul. Pept.* **131**, 12 (2005)
64. L. Guo, Q. Li, W. Wang, P. Yu, H. Pan, P. Li, Y. Sun, J. Zhang, *Endocr. Res.* **34**, 142 (2009)
65. C. Ringstrom, M.D. Nitert, H. Bennet, M. Fex, P. Valet, J.F. Rehfeld, L. Friis-Hansen, N. Wierup, *Regul. Pept.* **162**, 44 (2010)
66. C. Dray, C. Knauf, D. Daviaud, A. Waget, J. Boucher, M. Buleon, P.D. Cani, C. Attane, C. Guigne, C. Carpene, R. Burcelin, I. Castan-Laurell, P. Valet, *Cell Metab.* **8**, 437 (2008)
67. Y.C. Long, J.R. Zierath, *J. Clin. Invest.* **116**, 1776 (2006)
68. P. Yue, H. Jin, M. Aillaud, A.C. Deng, J. Azuma, T. Asagami, R.K. Kundu, G.M. Reaven, T. Quertermous, P.S. Tsao, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **298**, E59 (2010)
69. S. Zhu, F. Sun, W. Li, Y. Cao, C. Wang, Y. Wang, D. Liang, R. Zhang, S. Zhang, H. Wang, F. Cao, *Mol. Cell. Biochem.* **353**, 305 (2011)
70. K. Higuchi, T. Masaki, K. Gotoh, S. Chiba, I. Katsuragi, K. Tanaka, T. Kakuma, H. Yoshimatsu, *Endocrinology* **148**, 2690 (2007)
71. B.C. Frier, D.B. Williams, D.C. Wright, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **297**, R1761 (2009)
72. L.E. Wright, A.E. Brandon, A.J. Hoy, G.B. Forsberg, C.J. Elliott, J. Reznick, L. Lofgren, J. Oscarsson, M. Stromstedt, G.J. Cooney, N. Turner, *Diabetologia* **54**, 1417 (2011)
73. Yamamoto, T., Habata, Y., Matsumoto, Y., Yasuhara, Y., Hashimoto, T., Hamajyo, H., Anayama, H., Fujii, R., Fuse, H., Shintani, Y., Mori, M.: Apelin-transgenic mice exhibit a resistance against diet-induced obesity by increasing vascular mass and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* (2011). doi:10.1016/j.bbagen.2011.05.004
74. P. Yue, H. Jin, S. Xu, M. Aillaud, A.C. Deng, J. Azuma, R.K. Kundu, G.M. Reaven, T. Quertermous, P.S. Tsao, *Endocrinology* **152**, 59 (2011)
75. Attané, C., Guzman-Riuz, R., Le Gonidec, S., Béziaire, V., Daviaud, D., Dray, C., Ruiz-Gayo, M., Valet, P., Castan-laurell, I.: Chronic apelin treatment effects on lipid metabolism in wild type and insulin-resistant mice *Diabetologia* **52**(Suppl), S20 (2009)
76. A. Reaux, N. De Mota, I. Skulteyova, Z. Lenkei, S. El Messari, K. Gallatz, P. Corvol, M. Palkovits, C. Llorens-Cortes, *J. Neurochem.* **77**, 1085 (2001)
77. D. Sunter, A.K. Hewson, S.L. Dickson, *Neurosci. Lett.* **353**, 1 (2003)
78. M. O'Shea, M.J. Hansen, K. Tatemoto, M.J. Morris, *Nutr. Neurosci.* **6**, 163 (2003)
79. S. Taheri, K. Murphy, M. Cohen, E. Sujkovic, A. Kennedy, W. Dhillo, C. Dakin, A. Sajedi, M. Ghatei, S. Bloom, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 1208 (2002)
80. K.J. Clarke, K.W. Whitaker, T.M. Reyes, *J. Neuroendocrinol.* **21**, 83 (2009)
81. M. Jaszberenyi, E. Bujdoso, G. Telegdy, *Neuroscience* **129**, 811 (2004)
82. A. Valle, N. Hoggard, A.C. Adams, P. Roca, J.R. Speakman, *J. Neuroendocrinol.* **20**, 79 (2008)
83. Duparc, T., Colom, A., Cani, P.D., Massaly, N., Rastrelli, S., Drougard, A., Le Gonidec, S., Mouldous, L., Frances, B., Leclercq, I., Llorens-Cortes, C., Pospisilik, J.A., Delzenne, N.M., Valet, P., Castan-Laurell, I., Knauf, C.: Central apelin controls glucose homeostasis via a nitric oxide-dependent pathway in mice. *Antioxid Redox Signal.* (2011). doi:10.1089/ars.2010.3454
84. G. Barnes, A.G. Japp, D.E. Newby, *Heart* **96**, 1011 (2010)

VI. Références bibliographiques

1. Girard J, Ferre P, Fougère F (1997) Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Annu Rev Nutr* 17: 325-352.
2. Bernard C (1855) Leçons sur la matière glycogène du foie. *Union méd Nouv. série*: 408-404II.
3. Klingenspor M (2003) Cold-induced recruitment of brown adipose tissue thermogenesis. *Exp Physiol* 88: 141-148.
4. Ouellet V, Labbe SM, Blondin DP, *et al.* (2012) Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J Clin Invest* 122: 545-552.
5. Orava J, Nuutila P, Lidell ME, *et al.* (2011) Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. *Cell Metab* 14: 272-279.
6. Aarsland A, Chinkes D, Wolfe RR (1997) Hepatic and whole-body fat synthesis in humans during carbohydrate overfeeding. *Am J Clin Nutr* 65: 1774-1782.
7. Ailhaud G (2000) Adipose tissue as an endocrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 2: S1-3.
8. Guerre-Millo M (2004) Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab* 30: 13-19.
9. Bell GI, Kayano T, Buse JB, *et al.* (1990) Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 13: 198-208.
10. Mueckler M (1994) Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* 219: 713-725.
11. Schmidt S, Joost HG, Schurmann A (2009) GLUT8, the enigmatic intracellular hexose transporter. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E614-618.
12. Karnieli E, Zarnowski MJ, Hissin PJ, *et al.* (1981) Insulin-stimulated translocation of glucose transport systems in the isolated rat adipose cell. Time course, reversal, insulin concentration dependency, and relationship to glucose transport activity. *J Biol Chem* 256: 4772-4777.
13. Cardenas ML, Cornish-Bowden A, Ureta T (1998) Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochim Biophys Acta* 1401: 242-264.
14. Surholt B, Newsholme EA (1981) Maximum activities and properties of glucose 6-phosphatase in muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem J* 198: 621-629.

15. Shulman RG (2005) Glycogen turnover forms lactate during exercise. *Exerc Sport Sci Rev* 33: 157-162.
16. Benoy MP, Elliott KA (1937) The metabolism of lactic and pyruvic acids in normal and tumour tissues: Synthesis of carbohydrate. *Biochem J* 31: 1268-1275.
17. Croset M, Rajas F, Zitoun C, *et al.* (2001) Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes* 50: 740-746.
18. Owen OE, Felig P, Morgan AP, Wahren J, Cahill GF, Jr. (1969) Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. *J Clin Invest* 48: 574-583.
19. Yanez AJ, Nualart F, Droppelmann C, *et al.* (2003) Broad expression of fructose-1,6-bisphosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase provide evidence for gluconeogenesis in human tissues other than liver and kidney. *J Cell Physiol* 197: 189-197.
20. Rajas F, Bruni N, Montano S, Zitoun C, Mithieux G (1999) The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology* 117: 132-139.
21. Hua Q (2010) Insulin: a small protein with a long journey. *Protein Cell* 1: 537-551.
22. Ullrich A, Bell JR, Chen EY, *et al.* (1985) Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 313: 756-761.
23. Hubbard SR, Wei L, Ellis L, Hendrickson WA (1994) Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature* 372: 746-754.
24. Lee J, Pilch PF, Shoelson SE, Scarlata SF (1997) Conformational changes of the insulin receptor upon insulin binding and activation as monitored by fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* 36: 2701-2708.
25. Pawson T (1995) Protein modules and signalling networks. *Nature* 373: 573-580.
26. Voliovitich H, Schindler DG, Hadari YR, *et al.* (1995) Tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in vivo depends upon the presence of its pleckstrin homology region. *J Biol Chem* 270: 18083-18087.
27. Myers MG, Jr., Backer JM, Sun XJ, *et al.* (1992) IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10350-10354.
28. Skolnik EY, Batzer A, Li N, *et al.* (1993) The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science* 260: 1953-1955.
29. Le Roith D, Zick Y (2001) Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care* 24: 588-597.

30. Faure R, Baquiran G, Bergeron JJ, Posner BI (1992) The dephosphorylation of insulin and epidermal growth factor receptors. Role of endosome-associated phosphotyrosine phosphatase(s). *J Biol Chem* 267: 11215-11221.
31. Iyengar R, Herberg JT (1984) Structural analysis of the hepatic glucagon receptor. Identification of a guanine nucleotide-sensitive hormone-binding region. *J Biol Chem* 259: 5222-5229.
32. Burcelin R, Li J, Charron MJ (1995) Cloning and sequence analysis of the murine glucagon receptor-encoding gene. *Gene* 164: 305-310.
33. Wakelam MJ, Murphy GJ, Hruby VJ, Houslay MD (1986) Activation of two signal-transduction systems in hepatocytes by glucagon. *Nature* 323: 68-71.
34. Rodbell M, Krans HM, Pohl SL, Birnbaumer L (1971) The glucagon-sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. IV. Effects of guanylnucleotides on binding of ¹²⁵I-glucagon. *J Biol Chem* 246: 1872-1876.
35. Krebs EG (1981) Phosphorylation and dephosphorylation of glycogen phosphorylase: a prototype for reversible covalent enzyme modification. *Curr Top Cell Regul* 18: 401-419.
36. Herzig S, Long F, Jhala US, *et al.* (2001) CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413: 179-183.
37. Jelinek LJ, Lok S, Rosenberg GB, *et al.* (1993) Expression cloning and signaling properties of the rat glucagon receptor. *Science* 259: 1614-1616.
38. Hansen LH, Gromada J, Bouchelouche P, *et al.* (1998) Glucagon-mediated Ca²⁺ signaling in BHK cells expressing cloned human glucagon receptors. *Am J Physiol* 274: C1552-1562.
39. Creutzfeldt W, Ebert R (1985) New developments in the incretin concept. *Diabetologia* 28: 565-573.
40. Elrick H, Stimmler L, Hlad CJ, Jr., Arai Y (1964) Plasma Insulin Response to Oral and Intravenous Glucose Administration. *J Clin Endocrinol Metab* 24: 1076-1082.
41. Miyawaki K, Yamada Y, Yano H, *et al.* (1999) Glucose intolerance caused by a defect in the entero-insular axis: a study in gastric inhibitory polypeptide receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14843-14847.
42. Scrocchi LA, Brown TJ, McClusky N, *et al.* (1996) Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene. *Nat Med* 2: 1254-1258.
43. Cani PD, Holst JJ, Drucker DJ, *et al.* (2007) GLUT2 and the incretin receptors are involved in glucose-induced incretin secretion. *Mol Cell Endocrinol* 276: 18-23.

44. Mojsov S, Heinrich G, Wilson IB, *et al.* (1986) Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J Biol Chem* 261: 11880-11889.
45. Patzelt C, Schug G (1981) The major proglucagon fragment: an abundant islet protein and secretory product. *FEBS Lett* 129: 127-130.
46. Nyberg J, Anderson MF, Meister B, *et al.* (2005) Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is expressed in adult hippocampus and induces progenitor cell proliferation. *J Neurosci* 25: 1816-1825.
47. Brubaker PL (2006) The glucagon-like peptides: pleiotropic regulators of nutrient homeostasis. *Ann N Y Acad Sci* 1070: 10-26.
48. Herrmann C, Goke R, Richter G, *et al.* (1995) Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion* 56: 117-126.
49. Roberge JN, Brubaker PL (1993) Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by glucose-dependent insulinotropic peptide in a novel enteroendocrine loop. *Endocrinology* 133: 233-240.
50. Rocca AS, Brubaker PL (1999) Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology* 140: 1687-1694.
51. Mentlein R, Gallwitz B, Schmidt WE (1993) Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur J Biochem* 214: 829-835.
52. Hassan M, Eskilsson A, Nilsson C, *et al.* (1999) In vivo dynamic distribution of ¹³¹I-glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in the rat studied by gamma camera. *Nucl Med Biol* 26: 413-420.
53. Mayo KE, Miller LJ, Bataille D, *et al.* (2003) International Union of Pharmacology. XXXV. The glucagon receptor family. *Pharmacol Rev* 55: 167-194.
54. Usdin TB, Mezey E, Button DC, Brownstein MJ, Bonner TI (1993) Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology* 133: 2861-2870.
55. Campos RV, Lee YC, Drucker DJ (1994) Divergent tissue-specific and developmental expression of receptors for glucagon and glucagon-like peptide-1 in the mouse. *Endocrinology* 134: 2156-2164.
56. Holz GG (2004) Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell. *Diabetes* 53: 5-13.

57. Cook DL, Hales CN (1984) Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic B-cells. *Nature* 311: 271-273.
58. Wang X, Cahill CM, Pineyro MA, *et al.* (1999) Glucagon-like peptide-1 regulates the beta cell transcription factor, PDX-1, in insulinoma cells. *Endocrinology* 140: 4904-4907.
59. Edvell A, Lindstrom P (1999) Initiation of increased pancreatic islet growth in young normoglycemic mice (Umea +/-?). *Endocrinology* 140: 778-783.
60. Farilla L, Bulotta A, Hirshberg B, *et al.* (2003) Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. *Endocrinology* 144: 5149-5158.
61. Holst JJ, Christensen M, Lund A, *et al.* (2011) Regulation of glucagon secretion by incretins. *Diabetes Obes Metab* 13 Suppl 1: 89-94.
62. Nauck MA, Niedereichholz U, Ettl R, *et al.* (1997) Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *Am J Physiol* 273: E981-988.
63. Meier JJ, Goetze O, Anstipp J, *et al.* (2004) Gastric inhibitory polypeptide does not inhibit gastric emptying in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E621-625.
64. Delgado E, Luque MA, Alcantara A, *et al.* (1995) Glucagon-like peptide-1 binding to rat skeletal muscle. *Peptides* 16: 225-229.
65. Nakagawa Y, Kawai K, Suzuki H, Ohashi S, Yamashita K (1996) Glucagon-like peptide-1(7-36) amide and glycogen synthesis in the liver. *Diabetologia* 39: 1241-1242.
66. Gu W, Lloyd DJ, Chinookswong N, *et al.* (2011) Pharmacological targeting of glucagon and glucagon-like peptide 1 receptors has different effects on energy state and glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *J Pharmacol Exp Ther* 338: 70-81.
67. Mohammad S, Ramos LS, Buck J, *et al.* (2011) Gastric inhibitory peptide controls adipose insulin sensitivity via activation of CREB and p110beta isoform of PI3 kinase. *J Biol Chem*.
68. Sancho V, Trigo MV, Gonzalez N, *et al.* (2005) Effects of glucagon-like peptide-1 and exendins on kinase activity, glucose transport and lipid metabolism in adipocytes from normal and type-2 diabetic rats. *J Mol Endocrinol* 35: 27-38.
69. Perea A, Vinambres C, Clemente F, Villanueva-Penacarrillo ML, Valverde I (1997) GLP-1 (7-36) amide: effects on glucose transport and metabolism in rat adipose tissue. *Horm Metab Res* 29: 417-421.

70. Knauf C, Cani PD, Perrin C, *et al.* (2005) Brain glucagon-like peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage. *J Clin Invest* 115: 3554-3563.
71. McIntosh CH, Bremsak I, Lynn FC, *et al.* (1999) Glucose-dependent insulinotropic polypeptide stimulation of lipolysis in differentiated 3T3-L1 cells: wortmannin-sensitive inhibition by insulin. *Endocrinology* 140: 398-404.
72. Getty-Kaushik L, Song DH, Boylan MO, Corkey BE, Wolfe MM (2006) Glucose-dependent insulinotropic polypeptide modulates adipocyte lipolysis and reesterification. *Obesity (Silver Spring)* 14: 1124-1131.
73. Kim SJ, Nian C, McIntosh CH (2010) GIP increases human adipocyte LPL expression through CREB and TORC2-mediated trans-activation of the LPL gene. *J Lipid Res* 51: 3145-3157.
74. Kim SJ, Nian C, McIntosh CH (2007) Activation of lipoprotein lipase by glucose-dependent insulinotropic polypeptide in adipocytes. A role for a protein kinase B, LKB1, and AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem* 282: 8557-8567.
75. Ruiz-Grande C, Alarcon C, Merida E, Valverde I (1992) Lipolytic action of glucagon-like peptides in isolated rat adipocytes. *Peptides* 13: 13-16.
76. Villanueva-Penacarrillo ML, Marquez L, Gonzalez N, Diaz-Miguel M, Valverde I (2001) Effect of GLP-1 on lipid metabolism in human adipocytes. *Horm Metab Res* 33: 73-77.
77. Jitrapakdee S, Wutthisathapornchai A, Wallace JC, MacDonald MJ (2010) Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling. *Diabetologia* 53: 1019-1032.
78. Leloup C, Turrel-Cuzin C, Magnan C, *et al.* (2009) Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 58: 673-681.
79. Pi J, Bai Y, Zhang Q, *et al.* (2007) Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 56: 1783-1791.
80. Curry DL, Bennett LL, Grodsky GM (1968) Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology* 83: 572-584.
81. Gembal M, Gilon P, Henquin JC (1992) Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K⁺ channels in mouse B cells. *J Clin Invest* 89: 1288-1295.
82. Sato Y, Henquin JC (1998) The K⁺-ATP channel-independent pathway of regulation of insulin secretion by glucose: in search of the underlying mechanism. *Diabetes* 47: 1713-1721.

83. Rutter GA, Da Silva Xavier G, Leclerc I (2003) Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem J* 375: 1-16.
84. Viollet B, Andreelli F, Jorgensen SB, *et al.* (2003) The AMP-activated protein kinase alpha2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *J Clin Invest* 111: 91-98.
85. Hardie DG, Salt IP, Hawley SA, Davies SP (1999) AMP-activated protein kinase: an ultrasensitive system for monitoring cellular energy charge. *Biochem J* 338 (Pt 3): 717-722.
86. Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, *et al.* (2004) The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3329-3335.
87. Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, *et al.* (2005) Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* 2: 9-19.
88. Russell RR, 3rd, Bergeron R, Shulman GI, Young LH (1999) Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am J Physiol* 277: H643-649.
89. Fryer LG, Hajduch E, Rencurel F, *et al.* (2000) Activation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via stimulation of nitric oxide synthase. *Diabetes* 49: 1978-1985.
90. Barnes K, Ingram JC, Porras OH, *et al.* (2002) Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK). *J Cell Sci* 115: 2433-2442.
91. Halse R, Fryer LG, McCormack JG, Carling D, Yeaman SJ (2003) Regulation of glycogen synthase by glucose and glycogen: a possible role for AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 52: 9-15.
92. Marsin AS, Bertrand L, Rider MH, *et al.* (2000) Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr Biol* 10: 1247-1255.
93. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, *et al.* (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8: 1288-1295.
94. Hubert A, Husson A, Chedeville A, Lavoigne A (2000) AMP-activated protein kinase counteracted the inhibitory effect of glucose on the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in rat hepatocytes. *FEBS Lett* 481: 209-212.
95. Leclerc I, Kahn A, Doiron B (1998) The 5'-AMP-activated protein kinase inhibits the transcriptional stimulation by glucose in liver cells, acting through the glucose response complex. *FEBS Lett* 431: 180-184.

96. Lochhead PA, Salt IP, Walker KS, Hardie DG, Sutherland C (2000) 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes* 49: 896-903.
97. Salt IP, Connell JM, Gould GW (2000) 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) inhibits insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 49: 1649-1656.
98. da Silva Xavier G, Leclerc I, Varadi A, *et al.* (2003) Role for AMP-activated protein kinase in glucose-stimulated insulin secretion and preproinsulin gene expression. *Biochem J* 371: 761-774.
99. Heitman J, Movva NR, Hall MN (1991) Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253: 905-909.
100. Brown EJ, Albers MW, Shin TB, *et al.* (1994) A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 369: 756-758.
101. Lindsley JE, Rutter J (2004) Nutrient sensing and metabolic decisions. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 139: 543-559.
102. Dennis PB, Jaeschke A, Saitoh M, *et al.* (2001) Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* 294: 1102-1105.
103. Um SH, Frigerio F, Watanabe M, *et al.* (2004) Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431: 200-205.
104. Gual P, Gremeaux T, Gonzalez T, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF (2003) MAP kinases and mTOR mediate insulin-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on serine residues 307, 612 and 632. *Diabetologia* 46: 1532-1542.
105. Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124: 471-484.
106. Inoki K, Zhu T, Guan KL (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115: 577-590.
107. Yonezawa K, Yoshino KI, Tokunaga C, Hara K (2004) Kinase activities associated with mTOR. *Curr Top Microbiol Immunol* 279: 271-282.
108. Rachdi L, Balcazar N, Osorio-Duque F, *et al.* (2008) Disruption of Tsc2 in pancreatic beta cells induces beta cell mass expansion and improved glucose tolerance in a TORC1-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 9250-9255.
109. Le Bacquer O, Petroulakis E, Paglialunga S, *et al.* (2007) Elevated sensitivity to diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking 4E-BP1 and 4E-BP2. *J Clin Invest* 117: 387-396.

110. Koketsu Y, Sakoda H, Fujishiro M, *et al.* (2008) Hepatic overexpression of a dominant negative form of raptor enhances Akt phosphorylation and restores insulin sensitivity in K/KAy mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E719-725.
111. Ganong WF (2000) Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27: 422-427.
112. Cone RD, Cowley MA, Butler AA, *et al.* (2001) The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 Suppl 5: S63-67.
113. Bouret SG, Simerly RB (2004) Minireview: Leptin and development of hypothalamic feeding circuits. *Endocrinology* 145: 2621-2626.
114. Cowley MA, Pronchuk N, Fan W, *et al.* (1999) Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron* 24: 155-163.
115. Luiten PG, ter Horst GJ, Steffens AB (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.
116. Bernardis LL, Bellinger LL (1986) Effect of palatable diet on growth, caloric intake and endocrine-metabolic profile in weanling rats with dorsomedial hypothalamic lesions. *Appetite* 7: 219-230.
117. van Dijk G, Evers SS, Guidotti S, *et al.* (2011) The lateral hypothalamus: a site for integration of nutrient and fluid balance. *Behav Brain Res* 221: 481-487.
118. Sternson SM, Shepherd GM, Friedman JM (2005) Topographic mapping of VMH --> arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nat Neurosci* 8: 1356-1363.
119. Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S (2005) Appetite control. *J Endocrinol* 184: 291-318.
120. Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V (1982) Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 296: 659-660.
121. Allen YS, Adrian TE, Allen JM, *et al.* (1983) Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science* 221: 877-879.
122. Fetissov SO, Kopp J, Hokfelt T (2004) Distribution of NPY receptors in the hypothalamus. *Neuropeptides* 38: 175-188.

123. Blomqvist AG, Soderberg C, Lundell I, Milner RJ, Larhammar D (1992) Strong evolutionary conservation of neuropeptide Y: sequences of chicken, goldfish, and *Torpedo marmorata* DNA clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 2350-2354.
124. Blomqvist AG, Herzog H (1997) Y-receptor subtypes--how many more? *Trends Neurosci* 20: 294-298.
125. Stanley BG, Leibowitz SF (1985) Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 3940-3943.
126. Billington CJ, Briggs JE, Grace M, Levine AS (1991) Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *Am J Physiol* 260: R321-327.
127. Currie PJ (2003) Integration of hypothalamic feeding and metabolic signals: focus on neuropeptide Y. *Appetite* 41: 335-337.
128. Zarjevski N, Cusin I, Vettor R, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B (1993) Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology* 133: 1753-1758.
129. Kalra SP, Dube MG, Sahu A, Phelps CP, Kalra PS (1991) Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10931-10935.
130. Mayer CM, Belsham DD (2009) Insulin directly regulates NPY and AgRP gene expression via the MAPK MEK/ERK signal transduction pathway in mHypoE-46 hypothalamic neurons. *Mol Cell Endocrinol* 307: 99-108.
131. Wilding JP, Gilbey SG, Bailey CJ, *et al.* (1993) Increased neuropeptide-Y messenger ribonucleic acid (mRNA) and decreased neurotensin mRNA in the hypothalamus of the obese (ob/ob) mouse. *Endocrinology* 132: 1939-1944.
132. Erickson JC, Hollopeter G, Palmiter RD (1996) Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science* 274: 1704-1707.
133. Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW (1998) Coexpression of *Agrp* and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* 1: 271-272.
134. Shutter JR, Graham M, Kinsey AC, *et al.* (1997) Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes Dev* 11: 593-602.
135. Stutz AM, Morrison CD, Argyropoulos G (2005) The agouti-related protein and its role in energy homeostasis. *Peptides* 26: 1771-1781.
136. Rossi M, Kim MS, Morgan DG, *et al.* (1998) A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 139: 4428-4431.

137. Hagan MM, Rushing PA, Pritchard LM, *et al.* (2000) Long-term orexigenic effects of AgRP-(83---132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R47-52.
138. Graham M, Shutter JR, Sarmiento U, Sarosi I, Stark KL (1997) Overexpression of Agrt leads to obesity in transgenic mice. *Nat Genet* 17: 273-274.
139. Small CJ, Kim MS, Stanley SA, *et al.* (2001) Effects of chronic central nervous system administration of agouti-related protein in pair-fed animals. *Diabetes* 50: 248-254.
140. Yasuda T, Masaki T, Kakuma T, Yoshimatsu H (2004) Hypothalamic melanocortin system regulates sympathetic nerve activity in brown adipose tissue. *Exp Biol Med (Maywood)* 229: 235-239.
141. Makimura H, Mizuno TM, Mastaitis JW, Agami R, Mobbs CV (2002) Reducing hypothalamic AGRP by RNA interference increases metabolic rate and decreases body weight without influencing food intake. *BMC Neurosci* 3: 18.
142. Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, *et al.* (1997) Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278: 135-138.
143. Zheng H, Patterson LM, Phifer CB, Berthoud HR (2005) Brain stem melanocortinerigic modulation of meal size and identification of hypothalamic POMC projections. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R247-258.
144. Raffin-Sanson ML, de Keyzer Y, Bertagna X (2003) Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions: from physiology to pathological conditions. *Eur J Endocrinol* 149: 79-90.
145. Pritchard LE, Turnbull AV, White A (2002) Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. *J Endocrinol* 172: 411-421.
146. Yaswen L, Diehl N, Brennan MB, Hochgeschwender U (1999) Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med* 5: 1066-1070.
147. Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, *et al.* (1993) Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72: 827-834.
148. Clark AJ, McLoughlin L, Grossman A (1993) Familial glucocorticoid deficiency associated with point mutation in the adrenocorticotropin receptor. *Lancet* 341: 461-462.

149. Chen W, Kelly MA, Opitz-Araya X, *et al.* (1997) Exocrine gland dysfunction in MC5-R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides. *Cell* 91: 789-798.
150. Butler AA, Kesterson RA, Khong K, *et al.* (2000) A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse. *Endocrinology* 141: 3518-3521.
151. Weide K, Christ N, Moar KM, *et al.* (2003) Hyperphagia, not hypometabolism, causes early onset obesity in melanocortin-4 receptor knockout mice. *Physiol Genomics* 13: 47-56.
152. Baker RA, Herkenham M (1995) Arcuate nucleus neurons that project to the hypothalamic paraventricular nucleus: neuropeptidergic identity and consequences of adrenalectomy on mRNA levels in the rat. *J Comp Neurol* 358: 518-530.
153. Daniels D, Patten CS, Roth JD, Yee DK, Fluharty SJ (2003) Melanocortin receptor signaling through mitogen-activated protein kinase in vitro and in rat hypothalamus. *Brain Res* 986: 1-11.
154. Obici S, Feng Z, Tan J, *et al.* (2001) Central melanocortin receptors regulate insulin action. *J Clin Invest* 108: 1079-1085.
155. Fan W, Dinulescu DM, Butler AA, *et al.* (2000) The central melanocortin system can directly regulate serum insulin levels. *Endocrinology* 141: 3072-3079.
156. Hwa JJ, Ghibaudi L, Gao J, Parker EM (2001) Central melanocortin system modulates energy intake and expenditure of obese and lean Zucker rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R444-451.
157. Kristensen P, Judge ME, Thim L, *et al.* (1998) Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393: 72-76.
158. Dominguez G (2006) The CART gene: structure and regulation. *Peptides* 27: 1913-1918.
159. Douglass J, McKinzie AA, Couceyro P (1995) PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci* 15: 2471-2481.
160. Thim L, Kristensen P, Nielsen PF, Wulff BS, Clausen JT (1999) Tissue-specific processing of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptides in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2722-2727.
161. Dhillon WS, Small CJ, Stanley SA, *et al.* (2002) Hypothalamic interactions between neuropeptide Y, agouti-related protein, cocaine- and amphetamine-regulated transcript and alpha-melanocyte-stimulating hormone in vitro in male rats. *J Neuroendocrinol* 14: 725-730.

162. Koylu EO, Couceyro PR, Lambert PD, Kuhar MJ (1998) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain. *J Comp Neurol* 391: 115-132.
163. Lambert PD, Couceyro PR, McGirr KM, *et al.* (1998) CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse* 29: 293-298.
164. Rohner-Jeanrenaud F, Craft LS, Bridwell J, *et al.* (2002) Chronic central infusion of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART 55-102): effects on body weight homeostasis in lean and high-fat-fed obese rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26: 143-149.
165. Moffett M, Stanek L, Harley J, *et al.* (2006) Studies of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) knockout mice. *Peptides* 27: 2037-2045.
166. Yermolaieva O, Chen J, Couceyro PR, Hoshi T (2001) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide modulation of voltage-gated Ca²⁺ signaling in hippocampal neurons. *J Neurosci* 21: 7474-7480.
167. Sarkar S, Wittmann G, Fekete C, Lechan RM (2004) Central administration of cocaine- and amphetamine-regulated transcript increases phosphorylation of cAMP response element binding protein in corticotropin-releasing hormone-producing neurons but not in prothyrotropin-releasing hormone-producing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res* 999: 181-192.
168. Lakatos A, Prinster S, Vicentic A, Hall RA, Kuhar MJ (2005) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide activates the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway in AtT20 cells via putative G-protein coupled receptors. *Neurosci Lett* 384: 198-202.
169. Rogge G, Jones D, Hubert GW, Lin Y, Kuhar MJ (2008) CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions. *Nat Rev Neurosci* 9: 747-758.
170. Turnley AM, Stapleton D, Mann RJ, *et al.* (1999) Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. *J Neurochem* 72: 1707-1716.
171. Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, *et al.* (2004) AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* 279: 12005-12008.
172. Dieguez C, Vazquez MJ, Romero A, Lopez M, Nogueiras R (2011) Hypothalamic control of lipid metabolism: focus on leptin, ghrelin and melanocortins. *Neuroendocrinology* 94: 1-11.
173. Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, *et al.* (2004) AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428: 569-574.

174. Claret M, Smith MA, Batterham RL, *et al.* (2007) AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *J Clin Invest* 117: 2325-2336.
175. Perrin C, Knauf C, Burcelin R (2004) Intracerebroventricular infusion of glucose, insulin, and the adenosine monophosphate-activated kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, controls muscle glycogen synthesis. *Endocrinology* 145: 4025-4033.
176. McCrimmon RJ, Fan X, Ding Y, *et al.* (2004) Potential role for AMP-activated protein kinase in hypoglycemia sensing in the ventromedial hypothalamus. *Diabetes* 53: 1953-1958.
177. Han SM, Namkoong C, Jang PG, *et al.* (2005) Hypothalamic AMP-activated protein kinase mediates counter-regulatory responses to hypoglycaemia in rats. *Diabetologia* 48: 2170-2178.
178. Kim MS, Park JY, Namkoong C, *et al.* (2004) Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 10: 727-733.
179. Xue B, Kahn BB (2006) AMPK integrates nutrient and hormonal signals to regulate food intake and energy balance through effects in the hypothalamus and peripheral tissues. *J Physiol* 574: 73-83.
180. Obici S, Feng Z, Arduini A, Conti R, Rossetti L (2003) Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. *Nat Med* 9: 756-761.
181. He W, Lam TK, Obici S, Rossetti L (2006) Molecular disruption of hypothalamic nutrient sensing induces obesity. *Nat Neurosci* 9: 227-233.
182. Martin TL, Alquier T, Asakura K, *et al.* (2006) Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. *J Biol Chem* 281: 18933-18941.
183. Cota D, Proulx K, Smith KA, *et al.* (2006) Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* 312: 927-930.
184. Blouet C, Ono H, Schwartz GJ (2008) Mediobasal hypothalamic p70 S6 kinase 1 modulates the control of energy homeostasis. *Cell Metab* 8: 459-467.
185. Woods SC, Seeley RJ, Cota D (2008) Regulation of food intake through hypothalamic signaling networks involving mTOR. *Annu Rev Nutr* 28: 295-311.
186. Ono H, Poci A, Wang Y, *et al.* (2008) Activation of hypothalamic S6 kinase mediates diet-induced hepatic insulin resistance in rats. *J Clin Invest* 118: 2959-2968.
187. Cota D, Matter EK, Woods SC, Seeley RJ (2008) The role of hypothalamic mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in diet-induced obesity. *J Neurosci* 28: 7202-7208.

188. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666.
189. Schmidt HH, Murad F (1991) Purification and characterization of a human NO synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 181: 1372-1377.
190. Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Forstermann U, Murad F (1993) Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* 316: 175-180.
191. Forstermann U, Sessa WC (2011) Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*.
192. Michel T, Li GK, Busconi L (1993) Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 6252-6256.
193. Nakane M, Mitchell J, Forstermann U, Murad F (1991) Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 180: 1396-1402.
194. Wood J, Garthwaite J (1994) Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology* 33: 1235-1244.
195. Fernhoff NB, Derbyshire ER, Marletta MA (2009) A nitric oxide/cysteine interaction mediates the activation of soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21602-21607.
196. Cherry PD, Furchgott RF, Zawadzki JV, Jothianandan D (1982) Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 2106-2110.
197. Cabou C, Cani PD, Campistron G, *et al.* (2007) Central insulin regulates heart rate and arterial blood flow: an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism altered during diabetes. *Diabetes* 56: 2872-2877.
198. Shankar R, Zhu JS, Ladd B, *et al.* (1998) Central nervous system nitric oxide synthase activity regulates insulin secretion and insulin action. *J Clin Invest* 102: 1403-1412.
199. Sadler CJ, Wilding JP (2004) Reduced ventromedial hypothalamic neuronal nitric oxide synthase and increased sensitivity to NOS inhibition in dietary obese rats: further evidence of a role for nitric oxide in the regulation of energy balance. *Brain Res* 1016: 222-228.
200. Mayer J (1955) Regulation of energy intake and the body weight: the glucostatic theory and the lipostatic hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* 63: 15-43.

201. Oomura Y, Kimura K, Ooyama H, *et al.* (1964) Reciprocal Activities of the Ventromedial and Lateral Hypothalamic Areas of Cats. *Science* 143: 484-485.
202. Campfield LA, Smith FJ (1986) Functional coupling between transient declines in blood glucose and feeding behavior: temporal relationships. *Brain Res Bull* 17: 427-433.
203. Song Z, Levin BE, McArdle JJ, Bakhos N, Routh VH (2001) Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes* 50: 2673-2681.
204. Fioramonti X, Lorsignol A, Taupignon A, Penicaud L (2004) A new ATP-sensitive K⁺ channel-independent mechanism is involved in glucose-excited neurons of mouse arcuate nucleus. *Diabetes* 53: 2767-2775.
205. Wang R, Liu X, Hentges ST, *et al.* (2004) The regulation of glucose-excited neurons in the hypothalamic arcuate nucleus by glucose and feeding-relevant peptides. *Diabetes* 53: 1959-1965.
206. Ashford ML, Boden PR, Treherne JM (1990) Glucose-induced excitation of hypothalamic neurones is mediated by ATP-sensitive K⁺ channels. *Pflugers Arch* 415: 479-483.
207. Kang L, Routh VH, Kuzhikandathil EV, Gaspers LD, Levin BE (2004) Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons. *Diabetes* 53: 549-559.
208. Kang L, Dunn-Meynell AA, Routh VH, *et al.* (2006) Glucokinase is a critical regulator of ventromedial hypothalamic neuronal glucosensing. *Diabetes* 55: 412-420.
209. Ibrahim N, Bosch MA, Smart JL, *et al.* (2003) Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels. *Endocrinology* 144: 1331-1340.
210. Fioramonti X, Contie S, Song Z, *et al.* (2007) Characterization of glucosensing neuron subpopulations in the arcuate nucleus: integration in neuropeptide Y and pro-opio melanocortin networks? *Diabetes* 56: 1219-1227.
211. Coterio VE, Routh VH (2009) Insulin blunts the response of glucose-excited neurons in the ventrolateral-ventromedial hypothalamic nucleus to decreased glucose. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E1101-1109.
212. Spanswick D, Smith MA, Mirshamsi S, Routh VH, Ashford ML (2000) Insulin activates ATP-sensitive K⁺ channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. *Nat Neurosci* 3: 757-758.
213. Irani BG, Le Foll C, Dunn-Meynell A, Levin BE (2008) Effects of leptin on rat ventromedial hypothalamic neurons. *Endocrinology* 149: 5146-5154.

214. Elmquist JK, Ahima RS, Elias CF, Flier JS, Saper CB (1998) Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 741-746.
215. Kong D, Vong L, Parton LE, *et al.* (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.
216. Parton LE, Ye CP, Coppari R, *et al.* (2007) Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 449: 228-232.
217. Dunn-Meynell AA, Routh VH, Kang L, Gaspers L, Levin BE (2002) Glucokinase is the likely mediator of glucosensing in both glucose-excited and glucose-inhibited central neurons. *Diabetes* 51: 2056-2065.
218. Murphy BA, Fakira KA, Song Z, Beuve A, Routh VH (2009) AMP-activated protein kinase and nitric oxide regulate the glucose sensitivity of ventromedial hypothalamic glucose-inhibited neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 297: C750-758.
219. Lira VA, Soltow QA, Long JH, *et al.* (2007) Nitric oxide increases GLUT4 expression and regulates AMPK signaling in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E1062-1068.
220. Hallows KR, Raghuram V, Kemp BE, Witters LA, Foskett JK (2000) Inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by novel interaction with the metabolic sensor AMP-activated protein kinase. *J Clin Invest* 105: 1711-1721.
221. Canabal DD, Song Z, Potian JG, *et al.* (2007) Glucose, insulin, and leptin signaling pathways modulate nitric oxide synthesis in glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R1418-1428.
222. Levin BE, Dunn-Meynell AA (2002) Reduced central leptin sensitivity in rats with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: R941-948.
223. Orosco M, Rouch C, Nicolaidis S (1994) Resistance of the obese Zucker rat to insulin-induced feeding and to satiety induced by coinfusion of insulin and glucose. *Appetite* 23: 209-218.
224. Reaven GM (1980) How high the carbohydrate? *Diabetologia* 19: 409-413.
225. Eckel RH, Alberti KG, Grundy SM, Zimmet PZ (2010) The metabolic syndrome. *Lancet* 375: 181-183.
226. Paz K, Hemi R, LeRoith D, *et al.* (1997) A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 272: 29911-29918.

227. Zick Y (2003) Role of Ser/Thr kinases in the uncoupling of insulin signaling. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3: S56-60.
228. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, *et al.* (1996) IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271: 665-668.
229. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, *et al.* (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420: 333-336.
230. Fritsche L, Neukamm SS, Lehmann R, *et al.* (2003) Insulin-induced serine phosphorylation of IRS-2 via ERK1/2 and mTOR: studies on the function of Ser675 and Ser907. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300: E824-836.
231. Bouzakri K, Roques M, Gual P, *et al.* (2003) Reduced activation of phosphatidylinositol-3 kinase and increased serine 636 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 52: 1319-1325.
232. Bertacca A, Ciccarone A, Cecchetti P, *et al.* (2007) High insulin levels impair intracellular receptor trafficking in human cultured myoblasts. *Diabetes Res Clin Pract* 78: 316-323.
233. Goldstein BJ, Ahmad F, Ding W, Li PM, Zhang WR (1998) Regulation of the insulin signalling pathway by cellular protein-tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biochem* 182: 91-99.
234. Zhang WR, Goldstein BJ (1991) Identification of skeletal muscle protein-tyrosine phosphatases by amplification of conserved cDNA sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 178: 1291-1297.
235. Klamann LD, Boss O, Peroni OD, *et al.* (2000) Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol Cell Biol* 20: 5479-5489.
236. Ahmad F, Azevedo JL, Cortright R, Dohm GL, Goldstein BJ (1997) Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes. *J Clin Invest* 100: 449-458.
237. Savage DC (1977) Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 31: 107-133.
238. Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID (2005) Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat Rev Microbiol* 3: 431-438.
239. Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ (2006) Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 40: 235-243.

240. Backhed F, Ding H, Wang T, *et al.* (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 15718-15723.
241. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, *et al.* (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444: 1027-1031.
242. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, *et al.* (2005) Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 11070-11075.
243. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444: 1022-1023.
244. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, *et al.* (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1761-1772.
245. de La Serre CB, Ellis CL, Lee J, *et al.* (2010) Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299: G440-448.
246. Ghoshal S, Witta J, Zhong J, de Villiers W, Eckhardt E (2009) Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J Lipid Res* 50: 90-97.
247. Deopurkar R, Ghanim H, Friedman J, *et al.* (2010) Differential effects of cream, glucose, and orange juice on inflammation, endotoxin, and the expression of Toll-like receptor-4 and suppressor of cytokine signaling-3. *Diabetes Care* 33: 991-997.
248. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, *et al.* (2008) Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57: 1470-1481.
249. Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, *et al.* (2009) Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 58: 1091-1103.
250. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249: 1431-1433.
251. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB (2006) Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116: 1793-1801.
252. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259: 87-91.
253. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS (1997) Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 389: 610-614.

254. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, *et al.* (1997) Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 4196-4200.
255. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW (1999) C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 972-978.
256. Weisberg SP, McCann D, Desai M, *et al.* (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1796-1808.
257. Cencello R, Henegar C, Viguerie N, *et al.* (2005) Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 54: 2277-2286.
258. Sartipy P, Loskutoff DJ (2003) Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7265-7270.
259. Wellen KE, Hotamisligil GS (2003) Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1785-1788.
260. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, *et al.* (2006) MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116: 1494-1505.
261. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, *et al.* (2006) Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem* 281: 26602-26614.
262. Inouye KE, Shi H, Howard JK, *et al.* (2007) Absence of CC chemokine ligand 2 does not limit obesity-associated infiltration of macrophages into adipose tissue. *Diabetes* 56: 2242-2250.
263. Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5: 953-964.
264. Maus U, Herold S, Muth H, *et al.* (2001) Monocytes recruited into the alveolar air space of mice show a monocytic phenotype but upregulate CD14. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L58-68.
265. Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR (2007) Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* 56: 16-23.
266. Cai D, Yuan M, Frantz DF, *et al.* (2005) Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 11: 183-190.

267. Neyrinck AM, Cani PD, Dewulf EM, *et al.* (2009) Critical role of Kupffer cells in the management of diet-induced diabetes and obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 385: 351-356.
268. Gao Z, Zuberi A, Quon MJ, Dong Z, Ye J (2003) Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in tumor necrosis factor-treated cells through targeting multiple serine kinases. *J Biol Chem* 278: 24944-24950.
269. Sidrauski C, Walter P (1997) The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* 90: 1031-1039.
270. Kaser A, Lee AH, Franke A, *et al.* (2008) XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 134: 743-756.
271. Harding HP, Zhang Y, Ron D (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397: 271-274.
272. Hamanaka RB, Bennett BS, Cullinan SB, Diehl JA (2005) PERK and GCN2 contribute to eIF2 α phosphorylation and cell cycle arrest after activation of the unfolded protein response pathway. *Mol Biol Cell* 16: 5493-5501.
273. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, *et al.* (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6: 1099-1108.
274. Ma Y, Brewer JW, Diehl JA, Hendershot LM (2002) Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J Mol Biol* 318: 1351-1365.
275. Chen X, Shen J, Prywes R (2002) The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem* 277: 13045-13052.
276. Nakamura T, Furuhashi M, Li P, *et al.* (2010) Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. *Cell* 140: 338-348.
277. Zhang W, Feng D, Li Y, *et al.* (2006) PERK EIF2AK3 control of pancreatic beta cell differentiation and proliferation is required for postnatal glucose homeostasis. *Cell Metab* 4: 491-497.
278. Gregor MF, Yang L, Fabbrini E, *et al.* (2009) Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes* 58: 693-700.
279. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, *et al.* (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306: 457-461.

280. Urano F, Wang X, Bertolotti A, *et al.* (2000) Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287: 664-666.
281. Parker RA, Flint OP, Mulvey R, *et al.* (2005) Endoplasmic reticulum stress links dyslipidemia to inhibition of proteasome activity and glucose transport by HIV protease inhibitors. *Mol Pharmacol* 67: 1909-1919.
282. Kars M, Yang L, Gregor MF, *et al.* (2010) Tauroursodeoxycholic Acid may improve liver and muscle but not adipose tissue insulin sensitivity in obese men and women. *Diabetes* 59: 1899-1905.
283. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, *et al.* (2006) Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 313: 1137-1140.
284. Wang Y, Vera L, Fischer WH, Montminy M (2009) The CREB coactivator CRTC2 links hepatic ER stress and fasting gluconeogenesis. *Nature* 460: 534-537.
285. Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552: 335-344.
286. Allen RG, Tresini M (2000) Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 28: 463-499.
287. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 91 Spec No: 179-194.
288. Leloup C, Casteilla L, Carriere A, *et al.* (2011) Balancing mitochondrial redox signaling: a key point in metabolic regulation. *Antioxid Redox Signal* 14: 519-530.
289. Noeman SA, Hamooda HE, Baalash AA (2011) Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetol Metab Syndr* 3: 17.
290. Rudich A, Kozlovsky N, Potashnik R, Bashan N (1997) Oxidant stress reduces insulin responsiveness in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol* 272: E935-940.
291. Bloch-Damti A, Bashan N (2005) Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 7: 1553-1567.
292. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, *et al.* (2005) Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 146: 4192-4199.
293. Milanski M, Degasperi G, Coope A, *et al.* (2009) Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci* 29: 359-370.

294. Kleinridders A, Schenten D, Konner AC, *et al.* (2009) MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid-induced leptin resistance and diet-induced obesity. *Cell Metab* 10: 249-259.
295. Zhang X, Zhang G, Zhang H, *et al.* (2008) Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 135: 61-73.
296. Hosoi T, Ozawa K (2009) Possible involvement of endoplasmic reticulum stress in obesity associated with leptin resistance. *J Med Invest* 56 Suppl: 296-298.
297. Ozcan L, Ergin AS, Lu A, *et al.* (2009) Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab* 9: 35-51.
298. Hosoi T, Sasaki M, Miyahara T, *et al.* (2008) Endoplasmic reticulum stress induces leptin resistance. *Mol Pharmacol* 74: 1610-1619.
299. Choi SJ, Kim F, Schwartz MW, Wisse BE (2010) Cultured hypothalamic neurons are resistant to inflammation and insulin resistance induced by saturated fatty acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E1122-1130.
300. Mayer CM, Belsham DD (2010) Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons: rescue of resistance and apoptosis through adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase activation. *Endocrinology* 151: 576-585.
301. Benani A, Troy S, Carmona MC, *et al.* (2007) Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: redox regulation of food intake. *Diabetes* 56: 152-160.
302. Leloup C, Magnan C, Benani A, *et al.* (2006) Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing. *Diabetes* 55: 2084-2090.
303. Zhang X, Dong F, Ren J, Driscoll MJ, Culver B (2005) High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex. *Exp Neurol* 191: 318-325.
304. Atef N, Ktorza A, Penicaud 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.
305. Colombani AL, Carneiro L, Benani A, *et al.* (2009) Enhanced hypothalamic glucose sensing in obesity: alteration of redox signaling. *Diabetes* 58: 2189-2197.
306. Avshalumov MV, Chen BT, Koos T, Tepper JM, Rice ME (2005) Endogenous hydrogen peroxide regulates the excitability of midbrain dopamine neurons via ATP-sensitive potassium channels. *J Neurosci* 25: 4222-4231.
307. Lee KJ, Vos R, Janssens J, Tack J (2004) Differences in the sensorimotor response to distension between the proximal and distal stomach in humans. *Gut* 53: 938-943.

308. Rigaud D, Trostler N, Rozen R, Vallot T, Apfelbaum M (1995) Gastric distension, hunger and energy intake after balloon implantation in severe obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 19: 489-495.
309. Sabbatini M, Molinari C, Grossini E, *et al.* (2004) The pattern of c-Fos immunoreactivity in the hindbrain of the rat following stomach distension. *Exp Brain Res* 157: 315-323.
310. Grundy D (2002) Neuroanatomy of visceral nociception: vagal and splanchnic afferent. *Gut* 51 Suppl 1: i2-5.
311. Sabbatini M, Molinari C, Grossini E, *et al.* (2008) GABAA receptors expression pattern in rat brain following low pressure distension of the stomach. *Neuroscience* 152: 449-458.
312. Buchan AM, Polak JM, Solcia E, *et al.* (1978) Electron immunohistochemical evidence for the human intestinal I cell as the source of CCK. *Gut* 19: 403-407.
313. Rehfeld JF (1978) Immunochemical studies on cholecystokinin. II. Distribution and molecular heterogeneity in the central nervous system and small intestine of man and hog. *J Biol Chem* 253: 4022-4030.
314. Micevych PE, Park SS, Akesson TR, Elde R (1987) Distribution of cholecystokinin-immunoreactive cell bodies in the male and female rat: I. Hypothalamus. *J Comp Neurol* 255: 124-136.
315. Beinfeld MC, Meyer DK, Eskay RL, Jensen RT, Brownstein MJ (1981) The distribution of cholecystokinin immunoreactivity in the central nervous system of the rat as determined by radioimmunoassay. *Brain Res* 212: 51-57.
316. Hokfelt T, Rehfeld JF, Skirboll L, *et al.* (1980) Evidence for coexistence of dopamine and CCK in meso-limbic neurones. *Nature* 285: 476-478.
317. Hendry SH, Jones EG, DeFelipe J, *et al.* (1984) Neuropeptide-containing neurons of the cerebral cortex are also GABAergic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 6526-6530.
318. Matozaki T, Sakamoto C, Nagao M, Nishizaki H, Baba S (1988) G protein in stimulation of PI hydrolysis by CCK in isolated rat pancreatic acinar cells. *Am J Physiol* 255: E652-659.
319. Vinayek R, Jensen RT, Gardner JD (1987) Role of sulfate ester in influencing biologic activity of cholecystokinin-related peptides. *Am J Physiol* 252: G178-181.
320. Saito A, Goldfine ID, Williams JA (1981) Characterization of receptors for cholecystokinin and related peptides in mouse cerebral cortex. *J Neurochem* 37: 483-490.

321. Honda T, Wada E, Battey JF, Wank SA (1993) Differential Gene Expression of CCK(A) and CCK(B) Receptors in the Rat Brain. *Mol Cell Neurosci* 4: 143-154.
322. Sankaran H, Goldfine ID, Deveney CW, Wong KY, Williams JA (1980) Binding of cholecystokinin to high affinity receptors on isolated rat pancreatic acini. *J Biol Chem* 255: 1849-1853.
323. Lloyd KC, Raybould HE, Walsh JH (1992) Cholecystokinin inhibits gastric acid secretion through type "A" cholecystokinin receptors and somatostatin in rats. *Am J Physiol* 263: G287-292.
324. Bitar KN, Makhoul GM (1982) Receptors on smooth muscle cells: characterization by contraction and specific antagonists. *Am J Physiol* 242: G400-407.
325. Moran TH, Norgren R, Crosby RJ, McHugh PR (1990) Central and peripheral vagal transport of cholecystokinin binding sites occurs in afferent fibers. *Brain Res* 526: 95-102.
326. Sacerdote P, Wiedermann CJ, Wahl LM, Pert CB, Ruff MR (1991) Visualization of cholecystokinin receptors on a subset of human monocytes and in rat spleen. *Peptides* 12: 167-176.
327. Lignon MF, Bernad N, Martinez J (1991) Pharmacological characterization of type B cholecystokinin binding sites on the human JURKAT T lymphocyte cell line. *Mol Pharmacol* 39: 615-620.
328. Lewis LD, Williams JA (1990) Regulation of cholecystokinin secretion by food, hormones, and neural pathways in the rat. *Am J Physiol* 258: G512-518.
329. Gibbs J, Young RC, Smith GP (1973) Cholecystokinin decreases food intake in rats. *Obes Res* 5: 284-290.
330. Kopin AS, Mathes WF, McBride EW, *et al.* (1999) The cholecystokinin-A receptor mediates inhibition of food intake yet is not essential for the maintenance of body weight. *J Clin Invest* 103: 383-391.
331. Smith GP, Jerome C, Cushin BJ, Eterno R, Simansky KJ (1981) Abdominal vagotomy blocks the satiety effect of cholecystokinin in the rat. *Science* 213: 1036-1037.
332. Ritter RC, Ritter S, Ewart WR, Wingate DL (1989) Capsaicin attenuates hindbrain neuron responses to circulating cholecystokinin. *Am J Physiol* 257: R1162-1168.
333. Cheung GW, Kokorovic A, Lam CK, Chari M, Lam TK (2009) Intestinal cholecystokinin controls glucose production through a neuronal network. *Cell Metab* 10: 99-109.

334. Zhu G, Yan J, Smith WW, Moran TH, Bi S (2012) Roles of dorsomedial hypothalamic cholecystokinin signaling in the controls of meal patterns and glucose homeostasis. *Physiol Behav* 105: 234-241.
335. Day HE, McKnight AT, Poat JA, Hughes J (1994) Evidence that cholecystokinin induces immediate early gene expression in the brainstem, hypothalamus and amygdala of the rat by a CCKA receptor mechanism. *Neuropharmacology* 33: 719-727.
336. Chen DY, Deutsch JA, Gonzalez MF, Gu Y (1993) The induction and suppression of c-fos expression in the rat brain by cholecystokinin and its antagonist L364,718. *Neurosci Lett* 149: 91-94.
337. Sabatier N, Leng G (2010) Responses to cholecystokinin in the ventromedial nucleus of the rat hypothalamus in vivo. *Eur J Neurosci* 31: 1127-1135.
338. Swartz TD, Duca FA, Covasa M (2010) Differential feeding behavior and neuronal responses to CCK in obesity-prone and -resistant rats. *Brain Res* 1308: 79-86.
339. Covasa M, Ritter RC (1998) Rats maintained on high-fat diets exhibit reduced satiety in response to CCK and bombesin. *Peptides* 19: 1407-1415.
340. French SJ, Murray B, Rumsey RD, Fadzlin R, Read NW (1995) Adaptation to high-fat diets: effects on eating behaviour and plasma cholecystokinin. *Br J Nutr* 73: 179-189.
341. Paulino G, Barbier de la Serre C, Knotts TA, et al. (2009) Increased expression of receptors for orexigenic factors in nodose ganglion of diet-induced obese rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E898-903.
342. Swartz TD, Savastano DM, Covasa M (2010) Reduced sensitivity to cholecystokinin in male rats fed a high-fat diet is reversible. *J Nutr* 140: 1698-1703.
343. Savastano DM, Covasa M (2005) Adaptation to a high-fat diet leads to hyperphagia and diminished sensitivity to cholecystokinin in rats. *J Nutr* 135: 1953-1959.
344. Peters JH, Simasko SM, Ritter RC (2006) Modulation of vagal afferent excitation and reduction of food intake by leptin and cholecystokinin. *Physiol Behav* 89: 477-485.
345. Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-660.
346. Seim I, Josh P, Cunningham P, Herington A, Chopin L (2011) Ghrelin axis genes, peptides and receptors: recent findings and future challenges. *Mol Cell Endocrinol* 340: 3-9.

347. Zhang JV, Ren PG, Avsian-Kretchmer O, *et al.* (2005) Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 310: 996-999.
348. Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL (2008) Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 132: 387-396.
349. Huda MS, Wilding JP, Pinkney JH (2006) Gut peptides and the regulation of appetite. *Obes Rev* 7: 163-182.
350. Date Y, Murakami N, Toshinai K, *et al.* (2002) The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 123: 1120-1128.
351. Guan XM, Yu H, Palyha OC, *et al.* (1997) Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 48: 23-29.
352. Willesen MG, Kristensen P, Romer J (1999) Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 70: 306-316.
353. Thielemans L, Peeters PJ, Jonckheere H, *et al.* (2007) The hepatocarcinoma cell line HepG2 does not express a GHS-R1a-type ghrelin receptor. *J Recept Signal Transduct Res* 27: 309-322.
354. Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, *et al.* (2002) Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol* 159: 1029-1037.
355. Date Y, Kojima M, Hosoda H, *et al.* (2000) Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141: 4255-4261.
356. Prado CL, Pugh-Bernard AE, Elghazi L, Sosa-Pineda B, Sussel L (2004) Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2924-2929.
357. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, *et al.* (2001) Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 4753-4758.
358. McCowen KC, Maykel JA, Bistrrian BR, Ling PR (2002) Circulating ghrelin concentrations are lowered by intravenous glucose or hyperinsulinemic euglycemic conditions in rodents. *J Endocrinol* 175: R7-11.
359. Williams DL, Grill HJ, Cummings DE, Kaplan JM (2003) Vagotomy dissociates short- and long-term controls of circulating ghrelin. *Endocrinology* 144: 5184-5187.

360. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, *et al.* (2001) Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5992.
361. Wren AM, Small CJ, Ward HL, *et al.* (2000) The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 141: 4325-4328.
362. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML (2000) Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407: 908-913.
363. Banks WA, Tschop M, Robinson SM, Heiman ML (2002) Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 822-827.
364. Date Y, Shimbara T, Koda S, *et al.* (2006) Peripheral ghrelin transmits orexigenic signals through the noradrenergic pathway from the hindbrain to the hypothalamus. *Cell Metab* 4: 323-331.
365. Hewson AK, Dickson SL (2000) Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *J Neuroendocrinol* 12: 1047-1049.
366. Nakazato M, Murakami N, Date Y, *et al.* (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409: 194-198.
367. Tschop M, Weyer C, Tataranni PA, *et al.* (2001) Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 50: 707-709.
368. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, *et al.* (2002) Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 240-244.
369. Perreault M, Istrate N, Wang L, *et al.* (2004) Resistance to the orexigenic effect of ghrelin in dietary-induced obesity in mice: reversal upon weight loss. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28: 879-885.
370. Druce MR, Wren AM, Park AJ, *et al.* (2005) Ghrelin increases food intake in obese as well as lean subjects. *Int J Obes (Lond)* 29: 1130-1136.
371. Drucker DJ (2006) The biology of incretin hormones. *Cell Metab* 3: 153-165.
372. Baraboi ED, St-Pierre DH, Shooner J, Timofeeva E, Richard D (2011) Brain activation following peripheral administration of the GLP-1 receptor agonist exendin-4. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301: R1011-1024.
373. Knauf C, Cani PD, Kim DH, *et al.* (2008) Role of central nervous system glucagon-like Peptide-1 receptors in enteric glucose sensing. *Diabetes* 57: 2603-2612.

374. Adachi A, Shimizu N, Oomura Y, Kobashi M (1984) Convergence of hepatoportal glucose-sensitive afferent signals to glucose-sensitive units within the nucleus of the solitary tract. *Neurosci Lett* 46: 215-218.
375. Hevener AL, Bergman RN, Donovan CM (1997) Novel glucosensor for hypoglycemic detection localized to the portal vein. *Diabetes* 46: 1521-1525.
376. Matsuhisa M, Morishima T, Nakahara I, *et al.* (1997) Augmentation of hepatic glucose uptake by a positive glucose gradient between hepatoportal and central nervous systems. *Diabetes* 46: 1101-1105.
377. Hamilton-Wessler M, Bergman RN, Halter JB, Watanabe RM, Donovan CM (1994) The role of liver glucosensors in the integrated sympathetic response induced by deep hypoglycemia in dogs. *Diabetes* 43: 1052-1060.
378. Burcelin R, Dolci W, Thorens B (2000) Portal glucose infusion in the mouse induces hypoglycemia: evidence that the hepatoportal glucose sensor stimulates glucose utilization. *Diabetes* 49: 1635-1642.
379. Langhans W, Grossmann F, Geary N (2001) Intrameal hepatic-portal infusion of glucose reduces spontaneous meal size in rats. *Physiol Behav* 73: 499-507.
380. Fukaya M, Mizuno A, Arai H, *et al.* (2007) Mechanism of rapid-phase insulin response to elevation of portal glucose concentration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E515-522.
381. Burcelin R, Dolci W, Thorens B (2000) Glucose sensing by the hepatoportal sensor is GLUT2-dependent: in vivo analysis in GLUT2-null mice. *Diabetes* 49: 1643-1648.
382. Burcelin R, Da Costa A, Drucker D, Thorens B (2001) Glucose competence of the hepatoportal vein sensor requires the presence of an activated glucagon-like peptide-1 receptor. *Diabetes* 50: 1720-1728.
383. Shimizu N, Oomura Y, Novin D, Grijalva CV, Cooper PH (1983) Functional correlations between lateral hypothalamic glucose-sensitive neurons and hepatic portal glucose-sensitive units in rat. *Brain Res* 265: 49-54.
384. Dicostanzo CA, Dardevet DP, Neal DW, *et al.* (2006) Role of the hepatic sympathetic nerves in the regulation of net hepatic glucose uptake and the mediation of the portal glucose signal. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E9-E16.
385. Banks WA, Jaspan JB, Kastin AJ (1997) Selective, physiological transport of insulin across the blood-brain barrier: novel demonstration by species-specific radioimmunoassays. *Peptides* 18: 1257-1262.
386. Havrankova J, Roth J, Brownstein M (1978) Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature* 272: 827-829.

387. Koch L, Wunderlich FT, Seibler J, *et al.* (2008) Central insulin action regulates peripheral glucose and fat metabolism in mice. *J Clin Invest* 118: 2132-2147.
388. Obici S, Feng Z, Karkanias G, Baskin DG, Rossetti L (2002) Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci* 5: 566-572.
389. Schwartz MW, Marks JL, Sipols AJ, *et al.* (1991) Central insulin administration reduces neuropeptide Y mRNA expression in the arcuate nucleus of food-deprived lean (Fa/Fa) but not obese (fa/fa) Zucker rats. *Endocrinology* 128: 2645-2647.
390. Obici S, Zhang BB, Karkanias G, Rossetti L (2002) Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med* 8: 1376-1382.
391. Rahmouni K, Morgan DA, Morgan GM, *et al.* (2004) Hypothalamic PI3K and MAPK differentially mediate regional sympathetic activation to insulin. *J Clin Invest* 114: 652-658.
392. Pocai A, Lam TK, Gutierrez-Juarez R, *et al.* (2005) Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature* 434: 1026-1031.
393. Cabou C, Campistron G, Marsollier N, *et al.* (2008) Brain glucagon-like peptide-1 regulates arterial blood flow, heart rate, and insulin sensitivity. *Diabetes* 57: 2577-2587.
394. Woods SC, Lutz TA, Geary N, Langhans W (2006) Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1219-1235.
395. Ishida T, Chap Z, Chou J, *et al.* (1983) Differential effects of oral, peripheral intravenous, and intraportal glucose on hepatic glucose uptake and insulin and glucagon extraction in conscious dogs. *J Clin Invest* 72: 590-601.
396. Muller WA, Faloon GR, Unger RH (1971) The influence of the antecedent diet upon glucagon and insulin secretion. *N Engl J Med* 285: 1450-1454.
397. Geary N, Le Sauter J, Noh U (1993) Glucagon acts in the liver to control spontaneous meal size in rats. *Am J Physiol* 264: R116-122.
398. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, *et al.* (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432.
399. Rentsch J, Chiesi M (1996) Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS Lett* 379: 55-59.
400. Zhang HH, Kumar S, Barnett AH, Eggo MC (2000) Tumour necrosis factor- α exerts dual effects on human adipose leptin synthesis and release. *Mol Cell Endocrinol* 159: 79-88.
401. Ahima RS, Flier JS (2000) Leptin. *Annu Rev Physiol* 62: 413-437.

402. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, *et al.* (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83: 1263-1271.
403. Lee GH, Proenca R, Montez JM, *et al.* (1996) Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379: 632-635.
404. Wang MY, Zhou YT, Newgard CB, Unger RH (1996) A novel leptin receptor isoform in rat. *FEBS Lett* 392: 87-90.
405. Bjorbaek C, Elmquist JK, Michl P, *et al.* (1998) Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology* 139: 3485-3491.
406. Golden PL, Maccagnan TJ, Pardridge WM (1997) Human blood-brain barrier leptin receptor. Binding and endocytosis in isolated human brain microvessels. *J Clin Invest* 99: 14-18.
407. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG (1996) Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 98: 1101-1106.
408. Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, *et al.* (1996) Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett* 387: 113-116.
409. Baskin DG, Breininger JF, Schwartz MW (1999) Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes* 48: 828-833.
410. Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA (1997) Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 138: 4489-4492.
411. Hakansson ML, Meister B (1998) Transcription factor STAT3 in leptin target neurons of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 68: 420-427.
412. Ahima RS, Lazar MA (2008) Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. *Mol Endocrinol* 22: 1023-1031.
413. McCowen KC, Chow JC, Smith RJ (1998) Leptin signaling in the hypothalamus of normal rats in vivo. *Endocrinology* 139: 4442-4447.
414. Lee JY, Muenzberg H, Gavrilova O, *et al.* (2008) Loss of cytokine-STAT5 signaling in the CNS and pituitary gland alters energy balance and leads to obesity. *PLoS One* 3: e1639.
415. Gao Q, Wolfgang MJ, Neschen S, *et al.* (2004) Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4661-4666.

416. Piper ML, Unger EK, Myers MG, Jr., Xu AW (2008) Specific physiological roles for signal transducer and activator of transcription 3 in leptin receptor-expressing neurons. *Mol Endocrinol* 22: 751-759.
417. Zhao AZ, Huan JN, Gupta S, Pal R, Sahu A (2002) A phosphatidylinositol 3-kinase phosphodiesterase 3B-cyclic AMP pathway in hypothalamic action of leptin on feeding. *Nat Neurosci* 5: 727-728.
418. Bjorbaek C, Buchholz RM, Davis SM, *et al.* (2001) Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors. *J Biol Chem* 276: 4747-4755.
419. Kaszubska W, Falls HD, Schaefer VG, *et al.* (2002) Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates leptin signaling in a hypothalamic cell line. *Mol Cell Endocrinol* 195: 109-118.
420. Zabolotny JM, Bence-Hanulec KK, Stricker-Krongrad A, *et al.* (2002) PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev Cell* 2: 489-495.
421. Ring LE, Zeltser LM (2010) Disruption of hypothalamic leptin signaling in mice leads to early-onset obesity, but physiological adaptations in mature animals stabilize adiposity levels. *J Clin Invest* 120: 2931-2941.
422. Dobbins RL, Szczepaniak LS, Zhang W, McGarry JD (2003) Chemical sympathectomy alters regulation of body weight during prolonged ICV leptin infusion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E778-787.
423. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, *et al.* (1995) Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1: 1155-1161.
424. Gautron L, Elmquist JK (2011) Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance. *J Clin Invest* 121: 2087-2093.
425. Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM, Charron MJ (1997) Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* 389: 374-377.
426. German J, Kim F, Schwartz GJ, *et al.* (2009) Hypothalamic leptin signaling regulates hepatic insulin sensitivity via a neurocircuit involving the vagus nerve. *Endocrinology* 150: 4502-4511.
427. German JP, Thaler JP, Wisse BE, *et al.* (2011) Leptin activates a novel CNS mechanism for insulin-independent normalization of severe diabetic hyperglycemia. *Endocrinology* 152: 394-404.
428. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Healy D, *et al.* (1998) Efficacy of exogenous recombinant murine leptin in lean and obese 10- to 12-mo-old female CD-1 mice. *Am J Physiol* 275: R950-959.
429. Banks WA, DiPalma CR, Farrell CL (1999) Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity. *Peptides* 20: 1341-1345.

430. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, *et al.* (1996) Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 348: 159-161.
431. Lin S, Storlien LH, Huang XF (2000) Leptin receptor, NPY, POMC mRNA expression in the diet-induced obese mouse brain. *Brain Res* 875: 89-95.
432. Fukuda M, Williams KW, Gautron L, Elmquist JK (2011) Induction of leptin resistance by activation of cAMP-Epac signaling. *Cell Metab* 13: 331-339.
433. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF (1995) A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270: 26746-26749.
434. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, *et al.* (2001) Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1930-1935.
435. Lihn AS, Bruun JM, He G, *et al.* (2004) Lower expression of adiponectin mRNA in visceral adipose tissue in lean and obese subjects. *Mol Cell Endocrinol* 219: 9-15.
436. Kaser S, Moschen A, Cayon A, *et al.* (2005) Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 54: 117-121.
437. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, *et al.* (2003) Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423: 762-769.
438. Kos K, Harte AL, da Silva NF, *et al.* (2007) Adiponectin and resistin in human cerebrospinal fluid and expression of adiponectin receptors in the human hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 1129-1136.
439. Guillod-Maximin E, Roy AF, Vacher CM, *et al.* (2009) Adiponectin receptors are expressed in hypothalamus and colocalized with proopiomelanocortin and neuropeptide Y in rodent arcuate neurons. *J Endocrinol* 200: 93-105.
440. Hoyda TD, Fry M, Ahima RS, Ferguson AV (2007) Adiponectin selectively inhibits oxytocin neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Physiol* 585: 805-816.
441. Psilopanagioti A, Papadaki H, Kranioti EF, Alexandrides TK, Varakis JN (2009) Expression of adiponectin and adiponectin receptors in human pituitary gland and brain. *Neuroendocrinology* 89: 38-47.
442. Thundyil J, Tang SC, Okun E, *et al.* (2010) Evidence that adiponectin receptor 1 activation exacerbates ischemic neuronal death. *Exp Transl Stroke Med* 2: 15.
443. Dridi S, Taouis M (2009) Adiponectin and energy homeostasis: consensus and controversy. *J Nutr Biochem* 20: 831-839.

444. Coope A, Milanski M, Araujo EP, *et al.* (2008) AdipoR1 mediates the anorexigenic and insulin/leptin-like actions of adiponectin in the hypothalamus. *FEBS Lett* 582: 1471-1476.
445. Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, *et al.* (2004) Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med* 10: 524-529.
446. Hoyda TD, Samson WK, Ferguson AV (2009) Adiponectin depolarizes parvocellular paraventricular nucleus neurons controlling neuroendocrine and autonomic function. *Endocrinology* 150: 832-840.
447. Kubota N, Yano W, Kubota T, *et al.* (2007) Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab* 6: 55-68.
448. Mao X, Kikani CK, Riojas RA, *et al.* (2006) APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. *Nat Cell Biol* 8: 516-523.
449. Park S, Kim DS, Kwon DY, Yang HJ (2011) Long-term central infusion of adiponectin improves energy and glucose homeostasis by decreasing fat storage and suppressing hepatic gluconeogenesis without changing food intake. *J Neuroendocrinol* 23: 687-698.
450. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, *et al.* (1998) Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 251: 471-476.
451. O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, *et al.* (1993) A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 136: 355-360.
452. Masri B, Knibiehler B, Audigier Y (2005) Apelin signalling: a promising pathway from cloning to pharmacology. *Cell Signal* 17: 415-426.
453. Devic E, Rizzoti K, Bodin S, Knibiehler B, Audigier Y (1999) Amino acid sequence and embryonic expression of msr/apj, the mouse homolog of Xenopus X-msr and human APJ. *Mech Dev* 84: 199-203.
454. Hosoya M, Kawamata Y, Fukusumi S, *et al.* (2000) Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J Biol Chem* 275: 21061-21067.
455. Lee DK, Cheng R, Nguyen T, *et al.* (2000) Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J Neurochem* 74: 34-41.
456. Medhurst AD, Jennings CA, Robbins MJ, *et al.* (2003) Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J Neurochem* 84: 1162-1172.

457. Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S, *et al.* (2001) Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim Biophys Acta* 1538: 162-171.
458. Reaux-Le Goazigo A, Morinville A, Burlet A, Llorens-Cortes C, Beaudet A (2004) Dehydration-induced cross-regulation of apelin and vasopressin immunoreactivity levels in magnocellular hypothalamic neurons. *Endocrinology* 145: 4392-4400.
459. Brailoiu GC, Dun SL, Yang J, *et al.* (2002) Apelin-immunoreactivity in the rat hypothalamus and pituitary. *Neurosci Lett* 327: 193-197.
460. Bodineau L, Taveau C, Le Quan Sang HH, *et al.* (2011) Data supporting a new physiological role for brain apelin in the regulation of hypothalamic oxytocin neurons in lactating rats. *Endocrinology* 152: 3492-3503.
461. Reaux LEGA, Bodineau L, Picco DEMN, *et al.* (2011) Apelin and the proopiomelanocortin system : a new regulatory pathway of hypothalamic alpha-MSH-release. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301: 955-966.
462. Boucher J, Masri B, Daviaud D, *et al.* (2005) Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 146: 1764-1771.
463. Daviaud D, Boucher J, Gesta S, *et al.* (2006) TNFalpha up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue. *Faseb J* 20: 1528-1530.
464. Geurts L, Lazarevic V, Derrien M, *et al.* (2011) Altered gut microbiota and endocannabinoid system tone in obese and diabetic leptin-resistant mice: impact on apelin regulation in adipose tissue. *Front Microbiol* 2: 149.
465. Mazzucotelli A, Ribet C, Castan-Laurell I, *et al.* (2008) The transcriptional co-activator PGC-1alpha up regulates apelin in human and mouse adipocytes. *Regul Pept* 150: 33-37.
466. Masri B, Lahlou H, Mazarguil H, Knibiehler B, Audigier Y (2002) Apelin (65-77) activates extracellular signal-regulated kinases via a PTX-sensitive G protein. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 539-545.
467. Szokodi I, Tavi P, Foldes G, *et al.* (2002) Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res* 91: 434-440.
468. Masri B, Morin N, Cornu M, Knibiehler B, Audigier Y (2004) Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *Faseb J* 18: 1909-1911.
469. Chung J, Grammer TC, Lemon KP, Kazlauskas A, Blenis J (1994) PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 370: 71-75.

470. Asaki C, Usuda N, Nakazawa A, Kametani K, Suzuki T (2003) Localization of translational components at the ultramicroscopic level at postsynaptic sites of the rat brain. *Brain Res* 972: 168-176.
471. Dray C, Knauf C, Daviaud D, *et al.* (2008) Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 8: 437-445.
472. Attane C, Daviaud D, Dray C, *et al.* (2011) Apelin stimulates glucose uptake but not lipolysis in human adipose tissue *ex vivo*. *J Mol Endocrinol* 46: 21-28.
473. Yue P, Jin H, Aillaud M, *et al.* (2009) Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E59-67.
474. Kuba K, Zhang L, Imai Y, *et al.* (2007) Impaired heart contractility in Apelin gene-deficient mice associated with aging and pressure overload. *Circ Res* 101: e32-42.
475. Kasai A, Shintani N, Kato H, *et al.* (2008) Retardation of retinal vascular development in apelin-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 1717-1722.
476. Kidoya H, Ueno M, Yamada Y, *et al.* (2008) Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *Embo J* 27: 522-534.
477. Kasai A, Kinjo T, Ishihara R, *et al.* (2011) Apelin deficiency accelerates the progression of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 6: e23968.
478. Sorhede Winzell M, Magnusson C, Ahren B (2005) The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice. *Regul Pept* 131: 12-17.
479. Roberts EM, Pope GR, Newson MJ, *et al.* (2010) Stimulus-specific neuroendocrine responses to osmotic challenges in apelin receptor knockout mice. *J Neuroendocrinol* 22: 301-308.
480. Roberts EM, Newson MJ, Pope GR, *et al.* (2009) Abnormal fluid homeostasis in apelin receptor knockout mice. *J Endocrinol* 202: 453-462.
481. De Mota N, Reaux-Le Goazigo A, El Messari S, *et al.* (2004) Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 10464-10469.
482. Reaux A, De Mota N, Skultetyova I, *et al.* (2001) Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J Neurochem* 77: 1085-1096.
483. Taheri S, Murphy K, Cohen M, *et al.* (2002) The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 1208-1212.

484. Valle A, Hoggard N, Adams AC, Roca P, Speakman JR (2008) Chronic central administration of apelin-13 over 10 days increases food intake, body weight, locomotor activity and body temperature in C57BL/6 mice. *J Neuroendocrinol* 20: 79-84.
485. Sunter D, Hewson AK, Dickson SL (2003) Intracerebroventricular injection of apelin-13 reduces food intake in the rat. *Neurosci Lett* 353: 1-4.
486. Clarke KJ, Whitaker KW, Reyes TM (2009) Diminished metabolic responses to centrally-administered apelin-13 in diet-induced obese rats fed a high-fat diet. *J Neuroendocrinol* 21: 83-89.
487. Lv SY, Yang YJ, Qin YJ, Xiong W, Chen Q (2011) Effect of centrally administered apelin-13 on gastric emptying and gastrointestinal transit in mice. *Peptides* 32: 978-982.
488. Higuchi K, Masaki T, Gotoh K, *et al.* (2007) Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology* 148: 2690-2697.
489. Attane C, Foussal C, Le Gonidec S, *et al.* (2011) Apelin Treatment Increases Complete Fatty Acid Oxidation, Mitochondrial Oxidative Capacity, and Biogenesis in Muscle of Insulin-Resistant Mice. *Diabetes*.
490. Soriguer F, Garrido-Sanchez L, Garcia-Serrano S, *et al.* (2009) Apelin levels are increased in morbidly obese subjects with type 2 diabetes mellitus. *Obes Surg* 19: 1574-1580.
491. Castan-Laurell I, Boucher J, Dray C, *et al.* (2005) Apelin, a novel adipokine over-produced in obesity: friend or foe? *Mol Cell Endocrinol* 245: 7-9.
492. Xu Q, Tam M, Anderson SA (2008) Fate mapping Nkx2.1-lineage cells in the mouse telencephalon. *J Comp Neurol* 506: 16-29.
493. Jiang C, Qu A, Matsubara T, *et al.* (2011) Disruption of hypoxia-inducible factor 1 in adipocytes improves insulin sensitivity and decreases adiposity in high-fat diet-fed mice. *Diabetes* 60: 2484-2495.
494. Ross SR, Graves RA, Greenstein A, *et al.* (1990) A fat-specific enhancer is the primary determinant of gene expression for adipocyte P2 in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 9590-9594.
495. Chandra SM, Razavi H, Kim J, *et al.* (2011) Disruption of the apelin-APJ system worsens hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 814-820.
496. Jia YX, Lu ZF, Zhang J, *et al.* (2007) Apelin activates L-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in rat aortas. *Peptides* 28: 2023-2029.

497. Shimazu T (1981) Central nervous system regulation of liver and adipose tissue metabolism. *Diabetologia* 20 Suppl: 343-356.
498. Shimazu T, Fukuda A (1965) Increased activities of glycogenolytic enzymes in liver after splanchnic-nerve stimulation. *Science* 150: 1607-1608.
499. Shimazu T, Ogasawara S (1975) Effects of hypothalamic stimulation on gluconeogenesis and glycolysis in rat liver. *Am J Physiol* 228: 1787-1793.
500. Yao F, Modgil A, Zhang Q, *et al.* (2011) Pressor effect of apelin-13 in the rostral ventrolateral medulla: role of NAD(P)H oxidase-derived superoxide. *J Pharmacol Exp Ther* 336: 372-380.
501. Nishihara M, Hirooka Y, Matsukawa R, Kishi T, Sunagawa K (2012) Oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla modulates excitatory and inhibitory inputs in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 30: 97-106.
502. Zhong MK, Gao J, Zhang F, *et al.* (2009) Reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla modulate cardiac sympathetic afferent reflex in rats. *Acta Physiol (Oxf)* 197: 297-304.
503. Huber DA, Schreihof AM (2010) Attenuated baroreflex control of sympathetic nerve activity in obese Zucker rats by central mechanisms. *J Physiol* 588: 1515-1525.
504. Morgan DA, Anderson EA, Mark AL (1995) Renal sympathetic nerve activity is increased in obese Zucker rats. *Hypertension* 25: 834-838.
505. Jaimes EA, Sweeney C, Raij L (2001) Effects of the reactive oxygen species hydrogen peroxide and hypochlorite on endothelial nitric oxide production. *Hypertension* 38: 877-883.
506. Cotero VE, Zhang BB, Routh VH (2010) The response of glucose-excited neurones in the ventromedial hypothalamus to decreased glucose is enhanced in a murine model of type 2 diabetes mellitus. *J Neuroendocrinol* 22: 65-74.
507. Das UN (2010) Obesity: genes, brain, gut, and environment. *Nutrition* 26: 459-473.
508. Ding S, Chi MM, Scull BP, *et al.* (2010) High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. *PLoS One* 5: e12191.
509. Dickhout JG, Carlisle RE, Jerome DE, *et al.* (2012) The integrated stress response modulates cellular redox state via induction of cystathionine gamma-lyase: cross-talk between the integrated stress response and thiol metabolism. *J Biol Chem*.
510. Circu ML, Aw TY (2011) Redox biology of the intestine. *Free Radic Res* 45: 1245-1266.

511. Serino M, Waget A, Marsollier N, *et al.* (2011) Lipid-induced peroxidation in the intestine is involved in glucose homeostasis imbalance in mice. *PLoS One* 6: e21184.
512. Amrouni D, Gautier-Sauvigne S, Meiller A, *et al.* (2010) Cerebral and peripheral changes occurring in nitric oxide (NO) synthesis in a rat model of sleeping sickness: identification of brain iNOS expressing cells. *PLoS One* 5: e9211.
513. Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7773-7777.
514. Amin A, Choi SK, Galan M, *et al.* (2011) Chronic inhibition of endoplasmic reticulum stress and inflammation prevents ischemia-induced vascular pathology in type II diabetic mice. *J Pathol.*
515. Rendon-Ramirez A, Cerbon-Solorzano J, Maldonado-Vega M, Quintanar-Escorza MA, Calderon-Salinas JV (2007) Vitamin-E reduces the oxidative damage on delta-aminolevulinic dehydratase induced by lead intoxication in rat erythrocytes. *Toxicol In Vitro* 21: 1121-1126.
516. Schriener SE, Linford NJ, Martin GM, *et al.* (2005) Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 308: 1909-1911.
517. Zaghloul N, Nasim M, Patel H, *et al.* (2012) Overexpression of EC-SOD has a protective role against hyperoxia-induced brain injury in neonatal mice. *FEBS J.*
518. Liu M, Yue Y, Li D, Duan D (2007) Catalase overexpression does not impair extensor digitorum longus muscle function in normal mice. *Muscle Nerve* 36: 833-841.
519. Paradis AM, Godin G, Perusse L, Vohl MC (2009) Associations between dietary patterns and obesity phenotypes. *Int J Obes (Lond)* 33: 1419-1426.
520. Chamberland A, Tremblay N, Audet M, *et al.* (2009) Association study between candidate genes and obesity-related phenotypes using a sample of lumberjacks. *Public Health Genomics* 12: 253-258.
521. Bouchard L, Rabasa-Lhoret R, Faraj M, *et al.* (2010) Differential epigenomic and transcriptomic responses in subcutaneous adipose tissue between low and high responders to caloric restriction. *Am J Clin Nutr* 91: 309-320.
522. Jacobsen SH, Olesen SC, Dirksen C, *et al.* (2012) Changes in Gastrointestinal Hormone Responses, Insulin Sensitivity, and Beta-Cell Function Within 2 Weeks After Gastric Bypass in Non-diabetic Subjects. *Obes Surg.*
523. Peterli R, Steinert RE, Woelnerhanssen B, *et al.* (2012) Metabolic and Hormonal Changes After Laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass and Sleeve Gastrectomy: a Randomized, Prospective Trial. *Obes Surg.*

524. Vincent RP, le Roux CW (2008) Changes in gut hormones after bariatric surgery. *Clin Endocrinol (Oxf)* 69: 173-179.
525. Li JV, Ashrafian H, Bueter M, *et al.* (2011) Metabolic surgery profoundly influences gut microbial-host metabolic cross-talk. *Gut* 60: 1214-1223.
526. Li JV, Reshat R, Wu Q, *et al.* (2011) Experimental bariatric surgery in rats generates a cytotoxic chemical environment in the gut contents. *Front Microbiol* 2: 183.
527. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, *et al.* (2002) Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346: 393-403.
528. (2009) Rimonabant: depression and suicide. *Prescrire Int* 18: 24.
529. Ryder RE (2011) Pioglitazone and bladder cancer. *Lancet* 378: 1544; author reply 1544-1545.
530. Fioramonti X, Marsollier N, Song Z, *et al.* (2010) Ventromedial hypothalamic nitric oxide production is necessary for hypoglycemia detection and counterregulation. *Diabetes* 59: 519-528.
531. Castan-Laurell I, Dray C, Attane C, *et al.* (2011) Apelin, diabetes, and obesity. *Endocrine* 40: 1-9.