
Université de Montréal

Faculté de médecine

**Caractérisation et régulation du métabolisme
des acides gras dans l'hypothalamus**

Par

Bouchra TAIB

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de :

Docteur en Pathologie et Biologie cellulaire

Option : système nerveux

Directeur de thèse : Dr Thierry Alquier

Juin, 2014



© Bouchra TAIB, 2014
Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Thèse de doctorat intitulée :

Caractérisation et régulation du métabolisme des acides gras dans l'hypothalamus

Présentée par :
Bouchra TAIB

Directeur de thèse : Dr Thierry Alquier

Jury

Dr. Thierry Alquier, directeur de recherche
Dr. Vincent Poitout, co-directeur de recherche
Dre. Adriana Di Polo, présidente-rapporteuse
Dr. Christopher Rose, membre du jury
Dr. Frédéric Calon, examinateur externe
Dre Anne Noël Samaha, représentante du doyen de la FES



Résumé

Résumé

Un déséquilibre de la balance énergétique constitue la principale cause du développement des pathologies métaboliques telles que l'obésité et le diabète de type 2. Au sein du cerveau, l'hypothalamus joue un rôle primordial dans le contrôle de la prise alimentaire et du métabolisme périphérique via le système nerveux autonome. Ce contrôle, repose sur l'existence de différentes populations neuronales au sein de l'hypothalamus médio-basal (MBH), neurones à neuropeptide Y (NPY)/Agouti-related peptide (AgRP), et neurones à proopiomelanocortine (POMC), dont l'activité est directement modulée par les variations des taux circulants des nutriments tels que le glucose et les acides gras (FA). Alors que les mécanismes de détection et le métabolisme intracellulaire du glucose ont été largement étudiés, l'implication du métabolisme intracellulaire des FA dans leurs effets centraux, est très peu comprise. De plus, on ignore si le glucose, module le métabolisme intracellulaire des acides gras à longue chaîne (LCFA) dans le MBH.

Le but de notre première étude est, de déterminer l'impact du glucose sur le métabolisme des LCFA, le rôle de l'AMP-activated protein kinase (AMPK), kinase détectrice du statut énergétique cellulaire, et d'établir s'il y a des changements dans le métabolisme des LCFA en fonction de leur structure, du type cellulaire et de la région cérébrale.

Nos résultats montrent que le glucose inhibe l'oxydation du palmitate via l'AMPK dans les neurones et les astrocytes primaires hypothalamiques, *in vitro*, ainsi que dans les explants du MBH, *ex vivo*, mais pas dans les astrocytes et les explants corticaux. De plus, le glucose augmente l'estérification du palmitate et non de l'oléate dans les neurones et les explants du MBH, mais pas dans les astrocytes hypothalamiques.

Ces résultats décrivent le devenir métabolique de différents LCFA dans le MBH, ainsi que, la régulation AMPK - dépendante de leur métabolisme par le glucose dans les astrocytes et les neurones, et démontrent pour la première fois que le métabolisme du glucose et des LCFA est couplé spécifiquement dans les noyaux du MBH, dont le rôle est critique pour le contrôle de l'équilibre énergétique.

Le deuxième volet de cette thèse s'est intéressé à déterminer les mécanismes intracellulaires impliqués dans le rôle de la protéine de liaison ACBP dans le métabolisme

Résumé

central des FA. Nous avons démontré que le métabolisme de l'oléate et non celui du palmitate est dépendant de la protéine ACBP, dans les astrocytes hypothalamiques ainsi que dans les explants du MBH. Ainsi, nos résultats démontrent qu'ACBP, protéine identifiée originellement au niveau central, comme un modulateur allostérique des récepteurs GABA, agit comme un régulateur du métabolisme intracellulaire des FA.

Ces résultats ouvrent de nouvelles pistes de recherche liées à la régulation du métabolisme des acides gras au niveau central, ainsi que, la nouvelle fonction de la protéine ACBP dans la régulation du métabolisme des FA au niveau du système nerveux central. Ceci aiderait à identifier des cibles moléculaires pouvant contribuer au développement de nouvelles approches thérapeutiques de pathologies telles que l'obésité et le diabète de type 2.

Mots clés : Hypothalamus, astrocytes, métabolisme neuronale, glucose, palmitate, oléate, AMPK, ACBP

Abstract

Abstract

An imbalance of energy balance is the main cause of the development of metabolic diseases such as obesity and type 2 diabetes. Within the brain, the hypothalamus plays an important role in the control of food intake and peripheral metabolism, via the autonomic nervous system. This control relies on the existence of different neuronal populations in the medio-basal hypothalamus (MBH), including neuropeptide Y (NPY), agouti-related peptide (AgRP) and proopiomelanocortin (POMC) neurons, the activity of which, is directly modulated by changes in the circulating levels of nutrients such as glucose and fatty acids (FA). While mechanisms governing the detection and the intracellular metabolism of glucose have been extensively studied, the involvement of FA intracellular metabolism, in their central effects is poorly understood. It is currently unknown if glucose regulates long chain fatty acids (LCFA) metabolism in the MBH.

The aim of our first study was to determine the impact of glucose on LCFA metabolism, assess the role of AMP-activated Kinase (AMPK), a sensor of cellular energy status, and to establish if changes in LCFA metabolism, and its regulation by glucose, vary as a function of LCFA type, cell type and brain region.

We show that glucose inhibits palmitate oxidation via AMPK in hypothalamic neuronal cell lines, primary hypothalamic astrocyte cultures and MBH slices, *ex vivo*, but not in cortical astrocytes and slice preparations. In addition, our results show that glucose increases palmitate but not oleate esterification into neutral lipids, in neurons and MBH slices, but not in hypothalamic astrocytes.

These findings reveal the metabolic fate of different LCFA in the MBH, demonstrate AMPK-dependent glucose regulation of LCFA oxidation in both astrocytes and neurons and established for the first time the metabolic coupling of glucose and LCFA as a specific feature of the MBH, whose role is critical for the control of energy balance.

During the second part of this thesis, we were interested to determine the intracellular mechanisms involved in the role of Acyl-CoA binding protein (ACBP), in the central metabolism of FA. We have shown that the metabolism of oleate but not palmitate is ACBP -

Abstract

dependent in hypothalamic astrocytes and MBH slices. Thus, our results demonstrate That ACBP, a protein originally identified as an allosteric modulator of GABA receptor peptide, acts as a regulator of intracellular metabolism of FA.

These results open a new avenues of research related to the central regulation of fatty acid metabolism and the new function of ACBP protein in the regulation of FA metabolism in the central nervous system, which could help to identify molecular targets that may contribute to the development of new therapeutic approaches of diseases such as obesity and type 2 diabetes.

Keywords: Hypothalamus, astrocytes, neural metabolism, glucose, palmitate, oleate, AMPK, ACBP

Table des matières

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures et tableaux	ix
Liste des abréviations.....	x
Dédicace.....	xiii
Remerciements.....	xiv
Préambule.....	1
Revue Bibliographique	4
I- L'homéostasie énergétique.....	5
A-Définition	5
B-Contrôle central de l'homéostasie énergétique	5
II-Système nerveux central	7
A-Organisation du cerveau.....	7
A-1-Neuroanatomie du cerveau.....	7
A-2- Neuroanatomie de l'hypothalamus.....	8
A-2-1- Noyau hypothalamique du 1 ^{er} ordre : Noyau arqué ARC.....	8
A-2-2-Noyaux hypothalamiques du 2 ^{ème} ordre.....	8
A-2-2-a Noyau paraventriculaire : PVN.....	8
A-2-2-b L'hypothalamus ventromédian: VMH	9
A-2-2-c L'hypothalamus dorsomedian : DMH	9
A-2-2-d L'hypothalamus latéral LH	10
B- Composantes du tissu nerveux	12
B-1Les neurones.....	13

Table des matières

B-1-1 Structure des neurones.....	13
B-1-2 Rôle des neurones.....	15
B-2 - Les astrocytes.....	15
B-2-1 Structure des astrocytes.....	15
B-2-2 Rôle des astrocytes.....	17
B-3-La coopération neurones-astrocytes.....	18
III-Contrôle central de l'homéostasie énergétique.....	18
A-Prise alimentaire.....	18
B-Dépenses énergétiques.....	20
C- Réseau neuronal clé contribuant à la régulation de l'homéostasie énergétique.....	21
C-1 Réseau des connexions intra et extra-hypothalamiques.....	21
C-2 Réseaux des neurones hypothalamiques.....	23
C-2-1 Les neurones NPY.....	23
C-2-1-a Production et site d'action du neuropeptide Y (NPY).....	23
C-2-1-b Rôle du NPY.....	24
C-2-2-Les neurones Agouti related-peptide (AGRP).....	24
C-2-2-a Production et sites d'action d'AGRP.....	24
C-2-2-b Rôle d'AGRP.....	25
C-2-3-Les neurones Pro-opiomélanocortine (POMC).....	25
C-2-3-a Production et sites d'action de POMC.....	25
C-2-3-b Rôle de POMC.....	26
IV-Signaux métaboliques et hormonaux impliqués dans cette régulation.....	27
A-La barrière hémato-encéphalique (BHE).....	27

Table des matières

C-3-1-d Acyl-CoA binding protein (ACBP)	59
C-3-1-4-a-Expression et rôle d'ACBP	59
C-3-1-4-b-Oxydation mitochondriale des acides gras	62
C-3-1-4-c ACBP et beta oxydation des acides gras.....	63
C-3-2- Détection et effets centraux	64
V- Métabolisme des acides gras et le contrôle hypothalamique de l'homéostasie énergétique :	66
VI- Modèles expérimentaux pour l'étude des fonctions hypothalamiques :	71
Objectifs et approches expérimentales	74
Résultats	77
A-Chapitre 1: Le glucose régule le métabolisme intracellulaire hypothalamique des acides gras à longue chaîne via l'AMPK dans les neurones et les astrocytes	77
B-Chapitre 2: Rôle d'ACBP dans le métabolisme des acides gras.....	113
Discussion générale	132
Conclusion et perspectives	155
Annexes	162
Annexe I: Résultats complémentaires à l'étude I	162
Annexe II: Implication d'ACBP dans l'inflammation induite par les acides gras dans l'hypothalamus?.....	168
Annexe III: Collaboration à d'autres études de recherche	172
Bibliographie	174

Liste des figures et tableaux

Liste des figures

- Figure 1:** Régulation de l'homéostasie énergétique.
- Figure 2:** Les différents noyaux impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique
- Figure 3:** Exemple de neurones et d'astrocytes en culture.
- Figure 4:** Réseau des connexions intra et extra-hypothalamiques intervenant dans la transmission de l'information entre le système nerveux central et la périphérie.
- Figure 5:** Mécanismes de détection du glucose dans les neurones hypothalamiques.
- Figure 6:** Couplage métabolique entre neurones et astrocytes.
- Figure 7:** Régulation hormonale de l'AMPK hypothalamique et contrôle de la prise alimentaire.
- Figure 8:** Fonctions proposées d'ACBP.
- Figure 9:** Représentation schématique de la voie de l'oxydation mitochondriale des acides gras à longue chaîne.
- Figure 10:** Hypothèse de l'implication du réseau de signalisation AMPK /ACC /malonyl-CoA dans le métabolisme du glucose et des acides gras au niveau de l'hypothalamus médio-basal.
- Figure 11 :** Modèle proposé du couplage entre le métabolisme du glucose et des acides gras dans le MBH.

Liste des tableaux

- Tableau 1:** Localisation cérébrale des transporteurs du glucose (Gluts).
- Tableau2 :** Rôle du glucose et de la protéine ACBP dans la régulation du métabolisme central des acides gras.

Liste des abréviations

Liste des abréviations

α :	<i>Alpha</i>
β :	<i>Bêta</i>
ω :	<i>Omega</i>
α -MSH:	<i>alpha-melanocyte-stimulating hormone</i>
ACBP:	<i>Acyl-CoA Binding Protein</i>
ACC:	<i>Acetyl-CoA Carboxylase</i>
ADP:	<i>Adenosine diphosphate</i>
AGL:	<i>Acides gras libres</i>
AgRP:	<i>Agouti-related peptide</i>
AMPK:	<i>AMP-activated kinase</i>
ANLS:	<i>Astrocyte Neuron Lactate Shuttle,</i>
ARC:	<i>Noyau arqué</i>
ARNm:	<i>Acide ribonucléique messenger</i>
ATP :	<i>Adénosine Triphosphate</i>
BHE:	<i>Barrière hémato-encéphalique</i>
Ca ²⁺ :	<i>Atomes de calcium</i>
CaMK:	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase</i>
CART:	<i>Cocaine- and amphetamine-regulated transcript</i>
CCK:	<i>Cholécystokinine</i>
CNTF:	<i>Ciliary Neurotrophic Factor</i>
CRH:	<i>Corticotropin-releasing hormone</i>
CPT-1:	<i>Carnitine palmitoyltransférase 1</i>
DAG:	<i>Diacylglycérole</i>
DG:	<i>Déoxyglucose</i>
DMH:	<i>Dorso-medial Hypothalamus</i>

Liste des abréviations

DMV:	<i>Dorsal motor nucleus of the vagus</i>
DIO:	<i>Diet Induced Obesity</i>
EAAT:	<i>Excitatory Amino Acid Transporter 1</i>
FABP:	<i>Fatty Acid Binding Proteins</i>
FAS:	<i>Fatty Acid Synthase</i>
FAT/ CD36:	<i>Fatty Acid Translocase/CD36</i>
FATPs:	<i>Fatty Acids Transport Proteins</i>
GABA:	<i>γ-aminobutyric acid</i>
GCN:	<i>General Control Non-derepressible</i>
GE:	<i>Glucocorticoid</i>
GFAP:	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GFAT:	<i>Glutamine fructose-6-phosphate aminotransférase</i>
GHSR:	<i>Growth Hormone Secretagogue Receptor</i>
GI:	<i>Glucocorticoid</i>
GK:	<i>Glucokinase</i>
GLAST:	<i>GLutamate ASpartate Transporter</i>
GLT1:	<i>Glial Glutamate Transporter 1</i>
GlcN:	<i>Glucosamine</i>
GlcNAc:	<i>N-acétylglucosamine</i>
GLP-1:	<i>Glucagon-like peptide-1</i>
GLUT:	<i>Transporteur de glucose</i>
GS:	<i>Glutamine synthase</i>
HK-1:	<i>Hexokinase-1</i>
ICV:	<i>Intracérébroventriculaire</i>
JAK/STAT:	<i>Janus Kinase 2 Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
K _m :	<i>constante de Michaelis</i>
LH:	<i>lateral Hypothalamus</i>

Liste des abréviations

LCFA:	<i>Long chain fatty acids</i>
LC-acyl-coA:	<i>Long chain-acyl-coA</i>
MAPK:	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MCD:	<i>Malonyl CoA Decarboxylase</i>
MCH:	<i>Melanin-concentrating hormone</i>
ME :	<i>Médiane Eminence</i>
MCT :	<i>Transporteurs de monocarboxylates</i>
MC3R/MC4R:	<i>Melanocortin 3 Receptors/ Melanocortin 4 Receptors</i>
mTORC1:	<i>Mammalian Target of Rapamycin Complex 1</i>
NPY:	<i>Neuropeptide Y</i>
NTS:	<i>Noyau du tractus solitaire</i>
ODN :	<i>Octadecaneuropeptide</i>
POMC:	<i>Pro-opiomélanocortine</i>
PI3 K:	<i>Phosphatide Inositol 3 Kinase</i>
PL:	<i>Phospholipids</i>
PVN :	<i>Noyau para ventriculaire</i>
PYY :	<i>Peptide YY</i>
SGLT :	<i>Sodium glucose cotransporter-1</i>
SSO:	<i>Sulfo-N-succinimidyl oleate</i>
SNC :	<i>Système nerveux central</i>
SGZ :	<i>Zone sous-granulaire</i>
SVZ :	<i>Zone sous-ventriculaire</i>
TCA :	<i>Cycle de l'Acide tricarboxylique</i>
TAG:	<i>Triacylglycerol</i>
TTN:	<i>Triakontatetranuropeptide</i>
TRH:	<i>Thyrotropin-releasing hormone</i>
VMH :	<i>Hypothalamus ventromédian</i>

Dédicaces

À la mémoire de mon papa qui a toujours cru en moi, et a été le premier à m'encourager à aller si loin dans mes études.

À la mémoire de ma grande mère, avec qui j'ai fait mes premiers pas à l'école.

Remerciements

Parce qu'un travail de thèse n'est jamais le fruit du travail d'une seule personne, c'est avec un grand plaisir que j'aimerais adresser mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont accompagnée et soutenue tout au long de ce travail.

À mon directeur de thèse Dr Thierry Alquier,

Thierry, toute fière d'avoir été ta première étudiante☺, je te suis spécialement reconnaissante de m'avoir ouvert les portes de ton laboratoire et d'avoir cru en moi depuis le premier jour. Merci d'avoir partagé avec moi ta patience pour la science et la recherche et de m'avoir encadrée et guidée dans la démarche scientifique à entreprendre, tout au long de ce travail de doctorat. Merci pour ton aide et tes conseils pour la rédaction de ce manuscrit. Et finalement un grand merci pour ta disponibilité, ta bonne humeur, et ta patience envers ma spontanéité à m'emporter parfois ☺. J'espère que j'étais à la hauteur de ta confiance, et que tu trouveras en ces mots l'expression de ma profonde gratitude !

Aux membres du jury,

Je tiens à remercier énormément les membres du jury Dre. Adriana Di Polo, présidente-rapporteuse, Dr. Frédéric Calon, examinateur externe, Dr. Christopher Rose, membre du jury, et Dre Anna Samaha, représentante du Doyen. Malgré vos occupations, vous m'avez fait l'honneur d'accepter, sans réserve aucune, de juger ce manuscrit de thèse et de me faire part de vos remarques et commentaires, qui sans aucun doute, ont contribué à la perfectionner et l'enrichir.

Mes remerciements vont également à mon codirecteur de thèse, Dr Vincent Poitout, ainsi qu'au Dre Stéphanie Fulton, je vous remercie beaucoup pour votre disponibilité, vos conseils précieux ainsi que toutes les discussions enrichissantes qu'on a partagées tout au long de cette thèse.

Je tiens particulièrement à remercier Dr Marc Prentki, directeur du Centre de Recherche du Diabète de Montréal, ainsi que tous les membres de son laboratoire, d'avoir mis à ma disposition les équipements nécessaires à la réalisation de ce travail, mais aussi pour leur aide ainsi que leurs remarques et suggestions lors de diverses discussions sur mon travail de recherche.

Remerciements

Et bien sur les membres du labo Alquier, Khalil, Demetra et Lionel. Khalil, vraiment contente d'avoir partagé ces années de travail avec toi, je te remercie également pour ta disponibilité et ta gentillesse, tes blagues vont me manquer☺.

Demi, thanks a lot for your technical help and your good humor, I will miss your stories during lunch☺.

Et les autres copains de galère :

Bader, Meryem, comment j'aurais fait sans vous ? Fernanda, Cécile, nous étions là ensemble depuis le début et nous avons eu la chance de voir nos deux labo grandir, c'était vraiment agréable de partager ce bout de chemin avec vous tous, merci !

A tous mes collègues du MDRC-CRCHUM, spécialement, la bande d'Angus, présents et anciens avec qui j'ai partagé des grands ou petits bouts de ces années de thèse. Ce fut un plaisir de travailler à vos côtés. Grand merci à chacun et chacune d'entre vous.

Alix, Un énorme merci pour tous les moments qu'on a partagé ensemble, tes encouragements et ta bonne humeur, tu vas simplement me manquer !

Et finalement, c'est le tour de ma famille et mes ami(e)s,

A mon adorable maman qui était toujours présente et continue de l'être pour faire mon bonheur. Je sais que de ta part c'est un grand sacrifice d'accepter mon départ aussi loin de toi, les mots manquent pour exprimer ma gratitude envers toi, mais tout simplement merci d'être ma mère.

Mes frères, Marouane, Tarik et Houssam, merci d'avoir été toujours à mes côtés, de m'avoir encouragé et d'avoir été la bouffée d'oxygène qui me réchauffait le cœur durant mes moments de faiblesse. Btisseem, merci pour les corrections d'orthographe ☺

Je tiens également à remercier mes ami(e)s, Hanane Enneya, Sanae Zarrari, Murielle Tremoy, Imane Elkassmi, et Monsef Derraji de m'avoir toujours encouragé, la liste est longue et je pourrai remplir une autre page en citant les noms de toutes les personnes que j'aimerai remercier mais je dirai tout simplement :

Un grand merci à toute personne qui a contribué de proche ou de loin à la réalisation de cette thèse.

Préambule

Préambule

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, d'ici 2030, le nombre de personnes en surpoids devrait atteindre 3,3 milliards. En effet, le surpoids et l'obésité ont atteint des proportions pandémiques et sont devenus un problème de santé publique majeur. Ils font au minimum 2,8 millions de victimes chaque année, représentant ainsi le cinquième facteur de risque de décès au niveau mondial. L'impact est plus marqué dans les pays développés où la proportion des obèses atteint son paroxysme. Toutefois, les pays en développement tout en poursuivant leur combat contre la faim, se heurtent maintenant à leur tour au problème de l'obésité. En effet, l'accumulation excessive des graisses, caractéristique majeure de l'obésité, est la manifestation d'un déséquilibre du bilan énergétique entre la prise alimentaire et les dépenses énergétiques. La régulation de l'appétit et de la dépense énergétique est un processus complexe résultant de l'intégration de différents signaux métaboliques et hormonaux au niveau du cerveau qui contrôle en retour la quantité de calories ingérées et le métabolisme de base. Plusieurs études ont montré que le développement d'un surpoids corporel et de l'obésité sont en partie associés à une prédisposition génétique. Par ailleurs, plusieurs facteurs environnementaux tels que le changement de mode de vie, caractérisé par une accessibilité facile à une alimentation à haute charge calorique associée au manque de pratique quotidienne d'activité physique, contribuent à l'étiologie de l'obésité (Hebebrand and Hinney 2009).

La surcharge pondérale ou l'obésité est définie à l'aide d'une mesure appelée l'indice de la masse corporelle (IMC). Cette méthode ne nécessitant que la taille et le poids, poids (en kg) divisé par la taille (en mètres), est utilisée pour l'évaluation globale de la corpulence et de l'importance de la masse grasse présente dans le corps (Formiguera and Canton 2004). Ainsi, un IMC normal se situe entre 18,5 et 24,9 kg/ m², alors qu'un IMC inférieur à 18,5 kg/ m² représente une insuffisance pondérale. Inversement, une personne est en surpoids quand son IMC est supérieur ou égal à 25 kg/ m², et elle est considérée obèse dès lors que son IMC est égale à 30 kg/ m² ou plus (Ogunbode, Ladipo et al. 2011).

Cette méthode est couramment utilisée bien qu'elle reste controversée dans la littérature (Lissner, Visscher et al. 2013). En effet, peu coûteuse et facile à obtenir, la simplicité de son utilisation a fait d'elle une référence internationale dans la pratique clinique et épidémiologique (Formiguera and Canton 2004).

Préambule

Souvent, l'obésité est associée à diverses comorbidités et à une incidence de maladies chroniques, dont le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires et certains types de cancers (Azagury and Lautz 2011). Selon les statistiques réalisées en 2013 par la Fédération Internationale du Diabète, il existe 382 millions de diabétiques dans le monde, ce nombre est estimé à augmenter à 592 millions en 2035 (Rochester and Akiyode 2014).

La pathologie du diabète en soi englobe deux types, d'une part, le diabète de type I, qui est une maladie auto-immune médiée par les cellules T et caractérisée par la destruction des cellules β pancréatiques (Tan, Xiang et al. 2014). D'autre part, on trouve le diabète de type 2 également connu sous le nom de diabète sucré ou diabète méllitus. Il représente 90-95% des personnes atteintes du diabète, et se réfère à des individus qui maintiennent initialement une glycémie normale par une surproduction d'insuline par le pancréas. À long terme, cette production devient insuffisante pour compenser la résistance à l'insuline, entraînant ainsi des niveaux élevés de glucose dans le sang, et pouvant conduire au dysfonctionnement de la cellule β pancréatique (Stumvoll, Goldstein et al. 2005). Bien que tous les individus obèses ne développent pas automatiquement le diabète de type 2, la plupart des patients atteints de cette forme de diabète, sont obèses (Mokdad, Ford et al. 2003).

Récemment, des altérations du métabolisme lipidique, de l'inflammation et du système nerveux central, ont été rapporté dans le développement de ces pathologies associées à l'obésité (Gregor and Hotamisligil 2011). De plus, Il est bien établi maintenant que certaines régions du cerveau, en particulier, l'hypothalamus, se trouvant au centre de la régulation de l'équilibre énergétique. Une meilleure compréhension des mécanismes intracellulaires neuronaux permettrait d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de l'obésité ainsi que les troubles pathologiques associés.

Revue bibliographique

I- Homéostasie énergétique:

A- Définition :

Le maintien de la balance énergétique dépend essentiellement de l'équilibre entre deux facteurs principaux, d'une part, les apports énergétiques, en l'occurrence, la prise alimentaire, et d'autre part, les dépenses énergétiques incluant l'activité physique et le métabolisme de base. Bien que le rythme de trois repas par jour caractérise les habitudes alimentaires de nombreuses personnes, d'autres caractéristiques rentrent en jeu, notamment la taille et la valeur calorique du repas, conduisant ainsi à une quantité totale différente de nourriture consommée entre individus. D'autre part, on trouve des facteurs socio-environnementaux tels que l'abondance des aliments riches en calories et le rythme de vie stressant et de plus en plus sédentaire. La capacité de l'organisme à intégrer tous ces différents facteurs et à maintenir un poids corporel relativement stable et proche d'une valeur constante, est appelée l'homéostasie énergétique (Berthoud 2007).

B- Régulation de l'homéostasie énergétique :

L'homéostasie énergétique fait appel à des systèmes de régulation très fins, permettant d'assurer un équilibre entre les apports et les dépenses énergétiques. Les circuits physiologiques impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique sont habiles à s'adapter rapidement aux changements des conditions environnementales. Leur capacité d'adaptation implique un acheminement étroit et complexe entre le système nerveux central et de nombreux organes et tissus métaboliques au niveau périphérique. Ainsi, le réseau de signalisation régissant cette régulation comprend des signaux hormonaux tels que la leptine et l'insuline sécrétées respectivement à partir du tissu adipeux et du pancréas, les incrétines incluant la cholécystokinine (CCK), le glucagon-like peptide- 1 (GLP-1) et la ghréline produits par le tractus gastro-intestinal, les signaux métaboliques incluant les macronutriments (acides aminés, acides gras et glucose) ainsi que des signaux nerveux efférents (Migrenne, Marsollier et al. 2006). L'ensemble des informations sont acheminées vers le cerveau, en outre, au niveau de l'hypothalamus qui à son tour active des réseaux neuronaux distincts impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et des dépenses énergétiques (Figure 1).

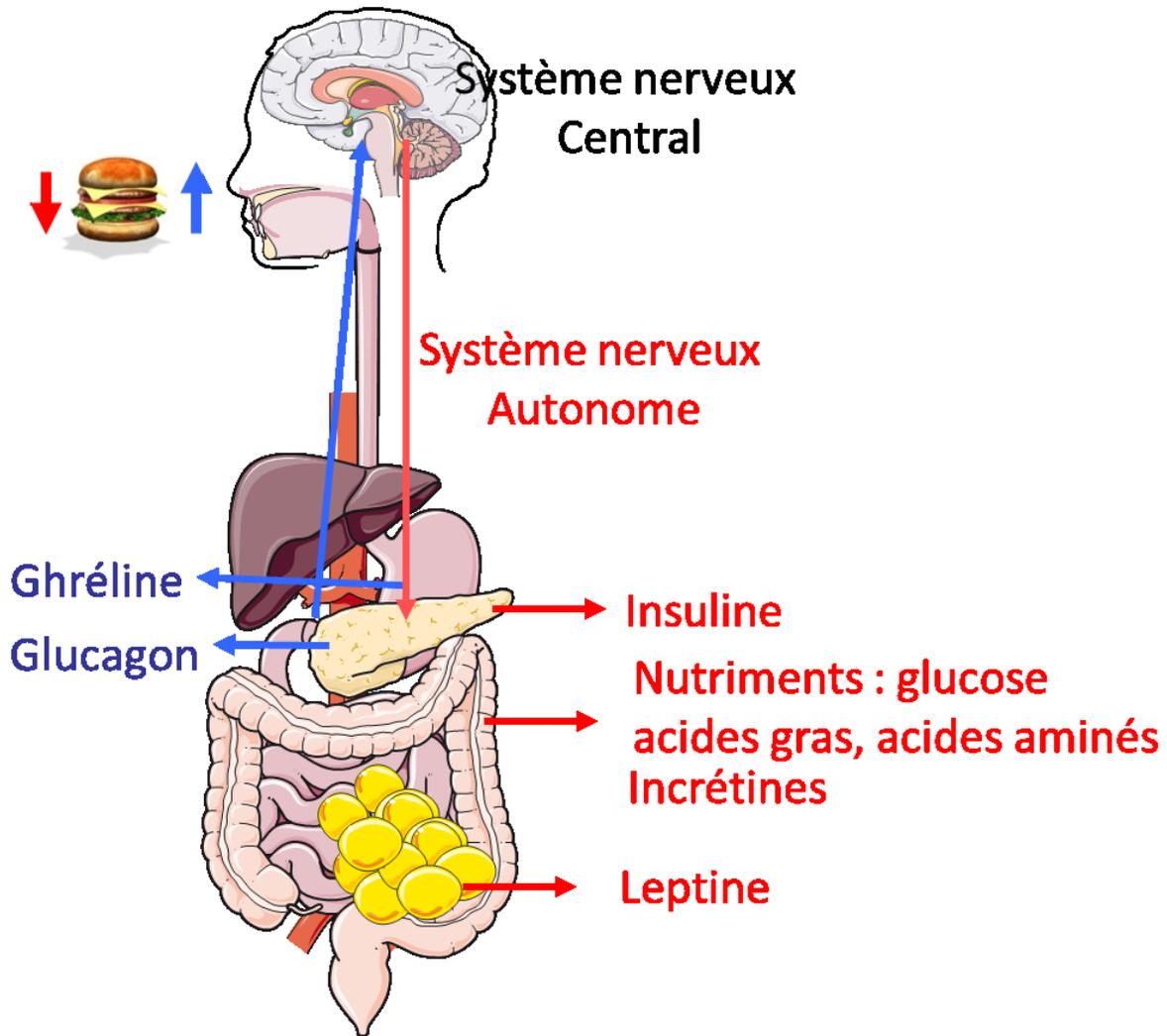


Figure 1 : Régulation de l'homéostasie énergétique.

Afin de maintenir l'homéostasie énergétique, le système nerveux central (SNC) reçoit en permanence des signaux métaboliques tels que les nutriments, ou hormonaux tels que les incrétones sécrétées par l'intestin, ainsi que la ghréline et le glucagon. Intégrés par le cerveau, ces signaux vont contrôler la prise alimentaire et la mise en place via le système nerveux autonome de réponses adaptées aux besoins de l'organisme telle que la sécrétion des hormones du pancréas endocrine (insuline et glucagon), pour le maintien de l'homéostasie glucidique.

II- Système nerveux central

A- Organisation du cerveau

A-1 Neuroanatomie du cerveau

L'organisation du cerveau constitue l'élément clé contrôlant la nature de l'information transmise. Tout en communiquant les unes avec les autres, les différentes régions du cerveau possèdent chacune une fonction bien spécifique. De façon générale, on distingue :

Le télencéphale : comporte les deux hémisphères cérébraux quasi symétriques. Ils sont liés essentiellement via le corps calleux. Chaque hémisphère comporte deux régions bien distinctes, une région périphérique qui est le cortex comportant les corps des cellules nerveuses, et une région centrale faite de substance blanche. Cette dernière contient essentiellement les prolongements axoniques des neurones responsables de l'ensemble de nos fonctions mentales supérieures, incluant les fonctions d'apprentissage, mémoire et mouvements volontaires (Chayer and Freedman 2001).

Le mésencéphale : appelé aussi cerveau moyen, est la partie supérieure du tronc cérébral directement reliée au cerveau. Le tronc cérébral qui constitue un pont de liaison entre les hémisphères cérébraux et la moelle épinière, est aussi responsable des fonctions vitales du corps englobant la respiration, la tension artérielle ou encore le rythme cardiaque.

Le cervelet : comporte différentes fissures et lobes, et est responsable de l'équilibre corporel et de la coordination de tous les mouvements et réflexes (Glickstein 2007).

Le diencephale : englobe les ensembles de substance grise et de formes ovoïdes constituées en outre, du thalamus et de l'hypothalamus. Ce dernier est situé au-dessus du tronc cérébral, en-dessous du thalamus, et au niveau dorsal par rapport à l'hypophyse. Il marque la paroi latérale du troisième ventricule (Penfield 1934).

Le tronc cérébral et l'hypothalamus, plus spécifiquement l'hypothalamus médio-basal (MBH), sont tous deux capables de détecter les signaux métaboliques et nutritionnels circulants et sont ainsi directement impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Schneeberger, Gomis et al. 2014). Durant mon travail de doctorat je me suis

Revue bibliographique

particulièrement intéressée à la région du MBH qui comprend le noyau arqué et l'hypothalamus ventro-médian tel que détaillé ci-dessous.

A-2 Neuroanatomie de l'hypothalamus

L'hypothalamus est constitué de différents noyaux organisés de façon symétrique par rapport au 3^{ème} ventricule. Ces structures sont divisées en noyaux dits de 1^{er} ordre dont fait partie le noyau arqué à la base de l'hypothalamus. Les neurones de ce dernier se projettent pour établir des connexions avec les noyaux dits de 2^{ème} ordre incluant le noyau paraventriculaire (PVN), l'hypothalamus dorso et ventro-médian DMH et VMH, et l'hypothalamus latéral (LH) (Figure 2).

A-2-1 Noyau hypothalamique du 1^{er} ordre : Noyau arqué (ARC)

Le noyau arqué est l'un des noyaux hypothalamiques les plus étudiés. Il est situé à la base médiane de l'hypothalamus au niveau du troisième ventricule. A cet endroit, les parois de l'hypothalamus fusionnent formant l'éminence médiane (ME), considérée comme un organe circumventriculaire et faisant partie des régions dans lesquelles la barrière hématoencéphalique est fenêtrée. Une telle position rend l'ARC perméable à plusieurs signaux métaboliques et hormonaux circulants et lui confère la particularité d'assurer le relai entre le système nerveux central et les organes périphériques. L'ARC contient deux populations neuronales antagonistes, les neurones orexigènes exprimant les neuropeptides Agouti related peptide (AGRP) et Neuropeptide Y (NPY) et les neurones anorexigènes exprimant les neuropeptides à pro-opiomélanocortine/cocaine- and amphetamine-regulated transcript (POMC et CART). Je discuterai des particularités de ces neuropeptides ultérieurement dans cette introduction.

A-2-2 Noyaux hypothalamiques de 2^{ème} ordre :

A-2-2-a Noyau paraventriculaire : (PVN)

Le PVN se localise au niveau de l'hypothalamus antérieur, adjacent au troisième ventricule. Il constitue également un site important d'intégration des signaux hormonaux et endocriniens. Le PVN est composé de différentes populations neuronales incluant d'une

Revue bibliographique

part les neurones magnocellulaires qui se projettent sur la partie postérieure de l'hypophyse et libèrent la vasopressine et l'ocytocine, et d'autres part les neurones parvocellulaires produisant les neuropeptides CRH (*Corticotropin Releasing Hormone*), et TRH (*Thyreotropin Releasing Hormone*), à effet anorexigènes (McMinn, Baskin et al. 2000). Le PVN reçoit des projections afférentes de nombreux noyaux de l'hypothalamus, incluant l'ARC, le LH, l'aire préoptique médiane, et le noyau suprachiasmatique mais aussi des projections de noyaux localisés dans le cerveau postérieur, du noyau du tractus solitaire (NTS), ainsi que du noyau moteur du nerf vague. Il comporte de nombreux neurones exprimant les récepteurs des mélanocortines MC3R/MC4R (Hill 2012).

A-2-2-b L'hypothalamus ventro-médian : (VMH)

Le VMH constitue avec le noyau arqué l'hypothalamus médiobasal, il se projette aussi vers les noyaux paraventriculaires et dorsomédians et indirectement vers le LH (Harrold, Williams et al. 2000). Le rôle du VMH dans le contrôle de la prise alimentaire a été mis en évidence grâce à des études montrant d'une part, que l'induction de lésions au niveau du VMH conduit à une augmentation de la prise alimentaire et à l'obésité et d'autre part, que la stimulation électrique du VMH conduit à une diminution de la prise alimentaire (King 2006). De plus, des études électrophysiologiques ont montré que l'activité des neurones du VMH était sensible à la distension gastrique, effet médié par le nerf vague (Sun, Tang et al. 2006). Pour ces raisons, le VMH a été initialement considéré comme le centre de la satiété (King 2006).

A-2-2-c L'hypothalamus dorso-médian (DMH)

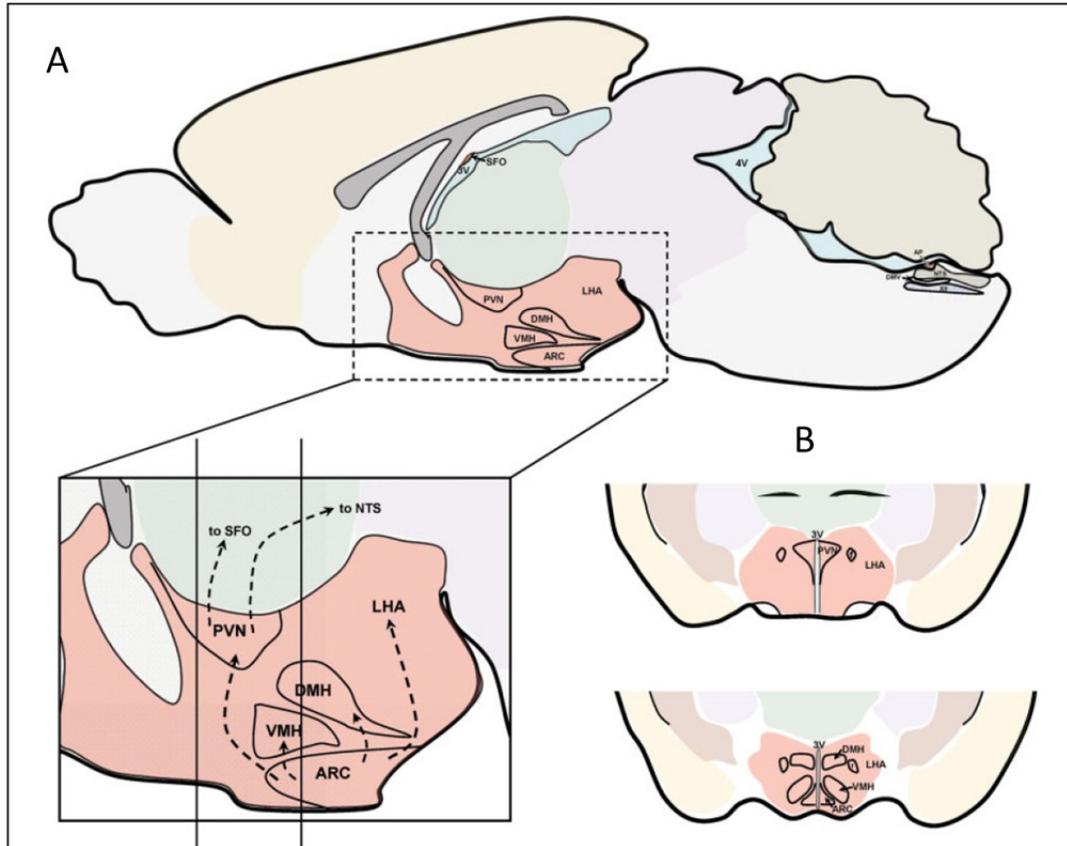
Le DMH est impliqué dans plusieurs processus physiologiques, incluant l'appétit, la thermorégulation et le stress. Il reçoit des projections provenant de la plupart des noyaux hypothalamiques, en particulier l'ARC, et envoie en retour des projections vers le PVN et le VMH (Kalra, Dube et al. 1999). Le DMH exprime un certain nombre de neuropeptides tel que le NPY. Les neurones NPY du DMH projettent notamment au niveau du noyau NTS et affectent la prise alimentaire. Le DMH exprime aussi les récepteurs d'autres peptides

impliqués dans le contrôle de l'appétit et l'équilibre énergétique, tels que les récepteurs de la leptine et des mélanocortines (Bi, Kim et al. 2012).

A-2-2-d L'hypothalamus latéral (LH)

Situé dans la région la plus latérale de l'hypothalamus, le LH se distingue par l'abondance de fibres des cellules projetant vers les diverses aires cérébraux comme le cortex, le tronc cérébral et la moelle épinière. Le LH joue un rôle essentiel dans les réponses orexigènes. Des lésions bilatérales au niveau du LH conduisent à une diminution de la prise alimentaire. Inversement, cette dernière est augmentée suite à la stimulation électrique du LH même en état rassasié (Smith and Ferguson 2008), ce qui a initialement conduit à proposer le LH comme le centre de la faim. On compte aussi d'autres populations neuronales spécifiques au sein du LH, tels que les neurones à orexines, qui sont stimulés par la faim et en situation d'hypoglycémie, ainsi que les neurones à melanin concentrating hormone (MCH). Ce neuropeptide injecté au niveau central, augmente la prise alimentaire transitoirement. Les neurones à MCH sont régulés par la leptine, l'insuline, et le glucose (Smith and Ferguson 2008).

Cependant, de nombreux neurones du PVN et du LH envoient à leur tour des prolongements en direction de l'ARC modifiant activement les informations qui leur seront transmises par la suite. Les neurones de 2^{ème} ordre sont donc loin d'être des récepteurs passifs de l'information venant des neurones du 1^{er} ordre. Ces deux types de neurones entretiennent plutôt un dialogue bidirectionnel (Schwartz, Woods et al. 2000).



Source : (Smith and Ferguson, 2008)

Figure 2 : Les différents noyaux impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique

A- Vue sagittale de l'encéphale avec un agrandissement de la région de l'hypothalamus et des principales projections anatomiques des circuits hypothalamiques. L'ARC (noyau arqué) se projette vers le VMH (hypothalamus ventro-médian), DMH (hypothalamus dorso-médian), LH (hypothalamus latéral), et le PVN (noyau paraventriculaire). Sont aussi présentées les projections du PVN au SFO (organes subfornical) du cerveau antérieur et au NTS (noyau du tractus solitaire) au niveau du tronc cérébral.

B- Section coronale montrant les emplacements anatomiques des noyaux hypothalamiques 20,7 mm Bregma (supérieure) et 22,6 mm Bregma (inférieure)

B- Composantes du tissu nerveux

Hormis les différents types cellulaires rentrant dans la composition du tissu nerveux, tels que les cellules endothéliales, les cellules méningées et les cellules souches, on note deux acteurs majeurs assurant le fonctionnement cérébral. D'une part, les cellules neuronales ou neurones ayant pour rôle principal d'assurer la transmission de l'information centrale en périphérie. D'autre part, les cellules gliales appelées aussi gliocytes, beaucoup plus nombreuses, suggérant ainsi leur importance dans le soutien des fonctions neuronales (Herculano-Houzel 2014). Le système nerveux périphérique comporte également des cellules gliales telles que les cellules satellites et les cellules de Schwann. Globalement, deux catégories de cellules gliales existent au niveau du système nerveux central, que l'on différencie en macroglie et microglie.

La microglie, est principalement constituée des cellules microgliales. Celles-ci assurent un rôle immunitaire et protecteur des cellules du système nerveux central contre les agressions infectieuses ou toxiques. Ces petites cellules étoilées ont les mêmes origines que les monocytes et les macrophages périphériques (Wirenfeldt, Babcock et al. 2011).

La macroglie, est constituée d'oligodendrocytes et d'astrocytes. Les oligodendrocytes assurent la myélinisation des axones. La gaine de myéline est constituée principalement de lipides et sert en outre à accélérer la vitesse de l'influx nerveux. Un dysfonctionnement des oligodendrocytes engendre des pathologies du système nerveux central telles que la sclérose en plaques (Keirstead and Blakemore 1999).

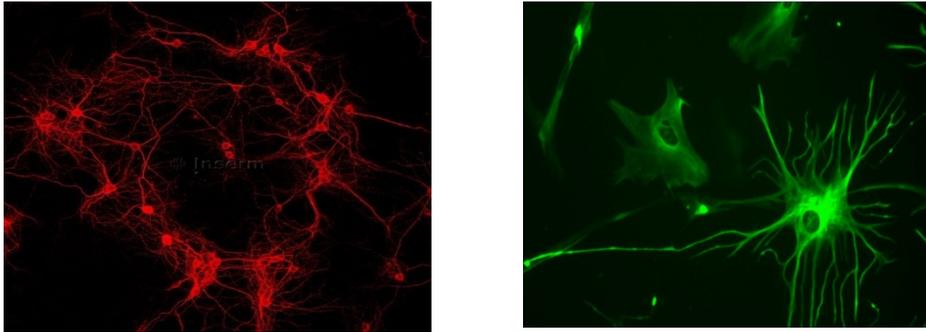
Enfin, les astrocytes sont les cellules gliales les plus abondantes au niveau central (Navarrete and Araque 2014). Nous discuterons plus en détail de leurs propriétés et de l'important rôle qu'ils assurent dans le fonctionnement neuronal dans la suite de ce chapitre.

B-1 Les neurones

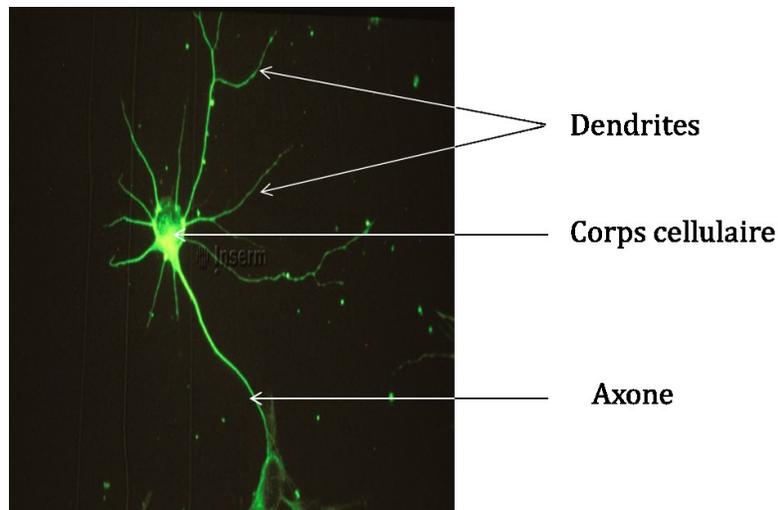
B-1-1 Structure des neurones

D'abord défini par *Santiago Ramón y Cajal* comme l'unité de base structurelle et fonctionnelle du système nerveux, cette notion a été reprise par *Heinrich Wilhelm Waldeyer* à la fin du XIX^e siècle qui, pour mieux la désigner, lui proposa le nom « neurone ». Globalement, notre système nerveux contient environ 100 milliards de neurones. Typiquement, un neurone comporte trois régions distinctes à savoir : le corps cellulaire, les dendrites et la fibre nerveuse. Cette dernière appelée aussi axone, est un prolongement plus ou moins long du neurone (Glees and Meller 1964) (Figure 3B). L'axone conduit le signal électrique sous forme de potentiels d'actions à partir du corps cellulaire jusqu'aux zones synaptiques afin de libérer les neurotransmetteurs et/ou neuropeptides. Les dendrites, quant à eux, constituent un autre type de prolongements conduisant le signal des synapses vers le corps cellulaire (Xue, Yang et al. 2004). Ils sont recouverts de bourgeons appelés aussi épines dendritiques leur permettant, en outre, d'augmenter de manière importante la surface de réception de l'influx nerveux. Un neurone typique est le plus souvent constitué d'un seul axone et plusieurs dendrites. Par ailleurs, il est capable de rentrer en contact avec plusieurs autres neurones d'une part via sa terminaison axonale très ramifiée constituant l'élément pré-synaptique et d'autre part, grâce aux milliers d'épines dendritiques (Harms and Dunaevsky 2007). Finalement on retrouve le cœur d'un neurone qui est le corps cellulaire appelé aussi «soma». Ce dernier comporte tous les constituants de la machinerie cellulaire, incluant plusieurs mitochondries qui procurent l'énergie nécessaire au métabolisme cellulaire au sein du système nerveux central (Glees and Meller 1964).

A



Source : Inserm/Koulakoff, Annette



Source : <http://www.serimedis.inserm.fr/fr/spotlight/329/neurones/page/1/SN/neuro>

Figure 3 : Exemple de neurones et d'astrocytes en culture.

A- A gauche : Réseaux de neurones corticaux de souris après trois semaines en culture, visualisés par immunomarquage à l'aide du marqueur MAP2 (Microtubul Associated Protein).

A droite : image d'astrocytes humains en culture, coloration immunohistochimique réalisée à l'aide du marqueur astrocytaire GFAP (Glial fibrillary acidic protein).

B- Image de neurone de l'hippocampe révélé par immunofluorescence à la tubuline, montrant les principales parties du neurone qui sont les dendrites, le corps cellulaire et l'axone.

B-1-2 Rôle des neurones

Le rôle principal des neurones est de transporter, unifier et relier l'information des différentes zones du corps vers les différentes régions du cerveau et vice versa. À la naissance, le cerveau dispose d'environ 100 milliards de neurones, qui accompagneront l'individu le long de sa vie. Cependant, tout au cours du développement, des nouveaux réseaux se créent entre les neurones mettant en place un réseau neuronal interconnecté.

A la fois communicants et dépendants les uns des autres, les neurones élaborent ainsi l'architecture cérébrale (Figure 3A). Pendant longtemps, le dogme concernant l'incapacité du SNC adulte à s'auto-régénérer a été entretenu. Récemment, de nombreuses données ont montré l'existence de neurogenèse au niveau du SNC adulte. En particulier, il a été démontré que les cellules souches et progénitrices neurales, ayant la particularité de s'auto-renouveler à long-terme, persistent tout au long de la vie chez les mammifères y compris les humains (Temple 2001). Le processus de la neurogenèse adulte se produit essentiellement dans la zone sous-ventriculaire (SVZ) des ventricules latéraux et la zone sous-granulaire (SGZ) du gyrus denté de l'hippocampe (Duan, Kang et al. 2008). De plus, le remodelage synaptique des neurones existants dans l'hippocampe est connu comme étant essentiel pour l'apprentissage et la mémoire (Wang and Jin 2014). Au niveau hypothalamique, *KoKoeva et al* ont démontré que des nouvelles cellules naissent en permanence en grand nombre dans l'hypothalamus de souris adulte (Kokoeva, Yin et al. 2007).

B-2 Les astrocytes

B-2-1 Structure des astrocytes

En 1856, *Rudolf Virchow*, anatomiste allemand décrivit pour la première fois que l'espace interstitiel entre les neurones n'était pas totalement vide mais constitue plutôt un tissu connectif qu'il nomma neuroglie (Ndubaku and de Bellard 2008). Ce terme signifie littéralement une « glue » ou une colle. Plus tard, et grâce au développement des techniques de colorations histologiques, on suggéra que cette neuroglie est constituée de plusieurs types cellulaires incluant les astrocytes. En 1886, *Camilio Golgi* identifia les astrocytes en

Revue bibliographique

tant que population cellulaire distincte et proposa le concept de couplage métabolique neuroglial grâce à la position particulière que les astrocytes occupent entre les vaisseaux sanguins et les neurones. Finalement, en 1893, *Von Lenhossek*, désigna le terme astrocyte sur la base de leur morphologie qui ressemble à celle des étoiles (Ndubaku and de Bellard 2008) (Figure 3A). Grâce aux techniques d'immunohistochimie ainsi que de fluorescence, il a été établi que chaque cellule neuro-gliale est indirectement en contact avec un vaisseau sanguin et que la surface de tous les capillaires est recouverte à 99% par les extensions ou « pieds » astrocytaires (Kacem, Lacombe et al. 1998). Morphologiquement, les astrocytes sont caractérisés par une structure très ramifiée leur facilitant ainsi le contact à la fois avec les vaisseaux sanguins, les neurones et d'autres astrocytes. En se basant sur les différences existantes dans leurs morphologies cellulaires et leurs emplacements anatomiques, les astrocytes sont divisés en deux sous-types principaux, les astrocytes protoplasmiques et les astrocytes fibreux. Les premiers, possèdent des prolongements très fins tout en étant nombreux et sont organisés en micro-domaines (Bushong, Martone et al. 2002), Inversement, les astrocytes fibreux, possèdent des prolongements plus larges mais ils sont moins nombreux. Les analyses microscopiques ont révélé que les astrocytes protoplasmiques enveloppent les synapses alors que les astrocytes fibreux sont essentiellement présents au niveau des nœuds de Ranvier, néanmoins, les deux types d'astrocytes forment des jonctions gap avec les astrocytes voisins (Sofroniew and Vinters 2010). Les jonctions gap permettent des échanges et communication entre astrocytes constituant ainsi un réseau cellulaire nommé syncytium (Giaume and McCarthy 1996). Un deuxième facteur déterminant dans la formation de ce réseau est l'existence de vagues d'ion calcium qui se propagent en stimulant un groupe bien déterminé d'astrocytes voisins sans induire de réponse dans les autres groupes astrocytaires, suggérant ainsi l'existence d'un réseau de signalisation organisé d'astrocytes (Allen and Barres 2009). En conséquence, l'ensemble du réseau conduit à des réponses bien coordonnées et synchronisées (Theis, Sohl et al. 2005).

B-2-2 Rôle des astrocytes

De par leur localisation, les astrocytes établissent un contact étroit avec les capillaires sanguins cérébraux. Ils régulent ainsi le débit sanguin en contrôlant la vasomotricité des vaisseaux transportant entre autres le glucose et l'oxygène nécessaires au fonctionnement neuronal (Attwell, Buchan et al. 2010). Ces caractéristiques permettent aux astrocytes d'assurer et réguler l'apport de substrats métaboliques aux neurones. De plus, les astrocytes se dotent de plusieurs caractéristiques métaboliques. En effet, comparativement aux neurones, ils sont enrichis en enzymes impliquées dans le stockage du glycogène (Pellegrini, Rossier et al. 1996). Également, ils expriment de manière plus abondante différentes enzymes glycolytiques notamment, la 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (Pfkfb3), enzyme qui conduit à l'activation de l'enzyme glycolytique phospho-fructose-kinase 1 (PFK) (Herrero-Mendez, Almeida et al. 2009). Inversement, l'enzyme pyruvate déshydrogénase (PDH), qui permet la synthèse d'Acétyl-CoA à partir du pyruvate, est très peu active dans les astrocytes (Laughton, Bittar et al. 2007).

Les astrocytes se dotent aussi d'autres fonctions métaboliques notamment leur capacité à accumuler l'acétate ainsi que d'autres acides gras à courte ou moyenne chaîne et les métaboliser via le cycle tricarboxylique (TCA) (Waniewski and Martin 1998). On note aussi la production des corps cétoniques dans des astrocytes primaires en culture (Auestad, Korsak et al. 1991). D'autre part, la co-culture de cellules endothéliales de la barrière hématoencéphalique avec des astrocytes, augmentent leur teneur en acides gras polyinsaturés de façon très importante. Ces derniers sont libérés par les astrocytes sous forme d'acides gras non estérifiés, suggérant ainsi que les astrocytes pourraient jouer un rôle majeur dans la fourniture des acides gras essentiels polyinsaturés à la barrière hématoencéphalique elle-même (Bernoud, Fenart et al. 1998).

Les astrocytes secrètent aussi des facteurs neurotrophiques tels que le NGF (Nerve Growth Factor) et le CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor), respectivement impliqués dans la survie et la remyélinisation neuronale (Farina, Aloisi et al. 2007).

Finalement les capacités astrocytaires s'étendent aussi à la libération de diverses cytokines connues pour leurs propriétés anti-inflammatoires, en particulier l'IL-6 (Interleukine-6) et et TGF β (Transforming growth factor beta) (Farina, Aloisi et al. 2007). Cependant, leurs

effets neuroprotecteurs peuvent être contrebalancés par la libération de cytokines pro-inflammatoires.

B-3 La coopération neurones - astrocytes.

La nature des mécanismes impliqués dans l'interaction entre les astrocytes et les neurones reste encore débattue, cependant, le besoin neuronal régulier d'énergie exige un lien fonctionnel très étroit entre les neurones et les astrocytes. Dans ce contexte, les astrocytes forment avec les neurones ce qu'on appelle la synapse tripartite. Cette dernière inclut le processus neuronal pré- et post-synaptique (Araque, Parpura et al. 1999). La synapse tripartite constitue une partie intégrante de la théorie de la navette du lactate entre astrocytes et neurones (Astrocyte Neuron Lactate Shuttle, ANLS), proposée par *Pellerin et Magistretti* (Pellerin and Magistretti, 1994). Les mécanismes impliqués dans cette interaction métabolique seront abordés ultérieurement en détail dans cette introduction. L'importance des astrocytes au niveau synaptique s'étend aussi jusqu'à la régulation de la plasticité synaptique. En outre, les astrocytes sont capables de modifier l'organisation des synapses via la libération de particules de cholestérol qui seraient ensuite intégrées par les neurones afin d'augmenter le nombre de synapses (Fields and Stevens-Graham 2002). Récemment des études d'électrophysiologie ont été réalisées sur des explants d'hippocampe. Le suivi du devenir du glucose dans les astrocytes montre que le trafic du glucose à travers le réseau astroglial subit une régulation bien spécifique dépendante de l'activité neuronale, le dirigeant préférentiellement vers les pieds astrocytaires (Rouach, Koulakoff et al. 2008).

III-Contrôle central de l'homéostasie énergétique.

A- la Prise alimentaire

En 1953, *Kennedy* émit l'hypothèse « lipostatique » selon laquelle l'augmentation de la masse adipeuse induit la sécrétion adipocytaire de signaux anorexigènes qui sont détectés par le système nerveux central, conduisant en retour à la perte de poids. Cette dernière réduira à son tour la masse adipeuse et les signaux anorexigènes levant ainsi l'inhibition

Revue bibliographique

sur la prise alimentaire pour restaurer les réserves en énergie (Kennedy 1953). Deux ans plus tard, *Mayer*, proposa l'hypothèse « gluco-statique » suggérant qu'une baisse à court terme de la disponibilité du glucose constitue l'élément stimulant la prise alimentaire. Inversement, un message de satiété est généré lorsque les niveaux et ou la disponibilité de glucose redeviennent normaux (Mayer 1955). Grâce à des études ultérieures, ces deux grandes hypothèses ont été validées, conduisant à l'identification de différentes hormones impliquées dans cette régulation. En effet, différents signaux participent à la régulation de la prise alimentaire à court et à long-terme.

Régulation à court terme : La plupart des signaux de régulation à court terme, sont des signaux anorexigènes tels que les hormones gastro-intestinales (CCK, ghréline), incluant différentes incréтины dont le GLP1, et le glucose, modulant ainsi la prise alimentaire en agissant au niveau des neurones viscéraux dans la veine porte et de neurones localisés dans l'ARC et le NTS (Havel 2001). Toute baisse de la glycémie sanguine en dessous de ~ 5 mM induit une réponse contre-régulatrice rapide. Cette dernière stimule la faim, active la sécrétion du glucagon à partir des cellules alpha pancréatiques et des catécholamines à partir des cellules de la médullo-surrénale, ainsi que la stimulation de la production hépatique du glucose via le système nerveux autonome (Marty, Dallaporta et al. 2007). Dans ce type de régulation, on retrouve également la ghréline, synthétisée par l'estomac et seule hormone circulante connue à effet orexigène, dont la libération est induite par le jeûne et inhibée par la prise alimentaire (Cummings, Purnell et al. 2001).

Régulation à long terme : Deux principaux facteurs régulent à long terme la prise alimentaire et l'équilibre énergétique, soit, l'insuline, sécrétée par la cellule bêta pancréatique et la leptine par le tissu adipeux. Toutes les deux, agissent au niveau du SNC pour inhiber la prise alimentaire et augmenter les dépenses d'énergie (Havel 2001). Les concentrations circulantes d'insuline et de leptine sont proportionnelles à la masse grasse et constituent ainsi un signal du niveau d'adiposité et des réserves énergétiques (Woods and Seeley 2000).

B- Les dépenses énergétiques

Le terme dépense énergétique englobe les dépenses liées au métabolisme de base, à la thermogénèse, et à l'exercice physique.

Le métabolisme de base représente environ 60 à 70% de nos dépenses totales et correspond aux dépenses de l'organisme en état de repos dans le but d'assurer les fonctions de ses organes vitaux (Connolly, Romano et al. 1999).

La thermogénèse dépend principalement de la température ambiante et de la prise alimentaire.

Cette dernière est appelée aussi thermogénèse postprandiale. Elle est principalement due à la conversion des aliments pour l'utilisation ou le stockage via l'activité des enzymes et des transporteurs, elle dépend du contenu énergétique des aliments consommés (Westerterp 2004).

La thermogénèse due à la température est divisée en deux types. D'une part, la thermogénèse de frisson produite par les contractions musculaires, cette dernière est notamment absente chez les rongeurs (Clapham 2012).

D'autre part, la thermogénèse sans frisson, qui résulte du découplage de la phosphorylation oxydative mitochondriale et de la production d'ATP, et qui dépend essentiellement de la capacité thermogénique du tissu adipeux brun (BAT). En effet, considéré depuis longtemps, comme étant important seulement chez les petits mammifères et les nouveau-nés humains, des données récentes ont montré que le BAT est également fonctionnel chez les humains adultes (Contreras, Gonzalez et al. 2014). La fonction du BAT est contrôlée à la fois par le système nerveux périphérique et central. Ce dernier implique différents noyaux de l'hypothalamus, notamment, le VMH, premier noyau hypothalamique identifié comme étant impliqué dans la thermorégulation. D'autre part, il a été démontré que la population des neurones orexigènes (NPY/AGRP) de l'ARC inhibe la thermogénèse (Shi, Lau et al. 2013), et qu'une perte partielle de ces neurones, conduit à un phénotype hypophagique, caractérisé par une activation sympathique du BAT (Bewick, Gardiner et al. 2005). De plus, une désinhibition des neurones du DMH, augmente l'activation sympathique du BAT et de la thermogénèse. Cependant, étant donné que les neurones du DMH ne projettent pas

directement au niveau du BAT, les mécanismes impliqués dans cette régulation sont encore mal connus.

Enfin, on retrouve l'activité physique qui varie en fonction de son intensité, de sa durée et de sa fréquence. Elle inclut tout ce qui est relatif à l'activité physique et l'exercice.

C- Réseau neuronal impliqué dans la régulation de l'homéostasie énergétique.

C-1 Réseau des connexions intra et extra-hypothalamiques

Tel que mentionné précédemment, la régulation de l'homéostasie énergétique implique à la fois l'hypothalamus et le tronc cérébral. Brièvement, lors de la prise alimentaire, le tronc cérébral reçoit et intègre les informations en provenance du tractus digestif via le nerf vague. Il représente ainsi le premier relais central des informations périphériques nerveuses. En retour, l'hypothalamus, va réajuster le système autonome afin de réguler plusieurs fonctions autonomes et végétatives dont la température corporelle, la pression artérielle, ainsi que la fonction du pancréas, du foie, et du système cardiopulmonaire. L'ensemble de ces régulations repose sur l'existence de différentes connexions, souvent réciproques, entre les noyaux du tronc cérébral et ceux du MBH, et projetant pour certaines, au niveau de la moelle épinière (Marino, Xu et al. 2011) (Figure 4). Dans la section qui suit, je me limiterai à la description du réseau neuronal hypothalamique.

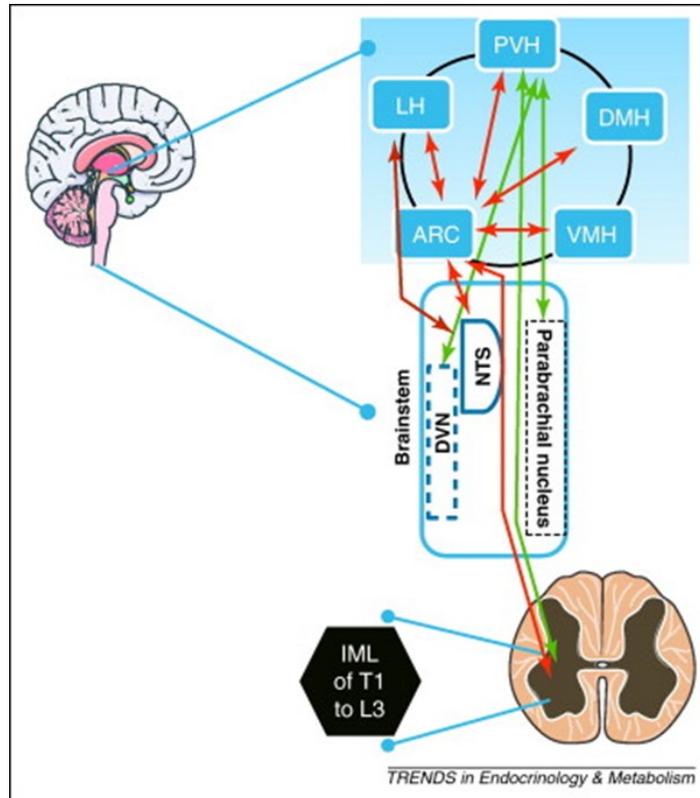


Figure 4 : Réseau des connexions intra et extra-hypothalamiques intervenant dans la transmission de l'information entre le système nerveux central et la périphérie.

Les axones du PVN ou PVH (en vert), traversent le tronc cérébral en se projetant à la fois au niveau du noyau dorso-vagal (DVN), du noyau para brachial et continuent jusqu'au niveau des cellules intermédiolatérales de la moelle épinière (IML). Les axones de l'hypothalamus latéral (LH) se projettent au niveau du NTS (noyau du tractus solitaire) et du noyau parabrachial. Finalement, on retrouve les neurones (POMC/CART) de l'ARC (en rouge), qui en plus de communiquer avec les autres neurones du même noyau, du LH, du noyau moteur dorsal médullaire du nerf vague et du NTS projettent directement au niveau de la moelle épinière.

C-2 Réseaux des neurones hypothalamiques.

Au sein du noyau arqué du MBH, les neurones exprimant le neuropeptide NPY/ AGRP et ceux exprimant POMC ont été identifiés comme les régulateurs clé du contrôle hypothalamique de l'homéostasie énergétique.

C-2-1-Les neurones NPY

C-2-1-a Production et site d'action du neuropeptide Y (NPY)

Le neuropeptide NPY est composé de 36 acides aminés, il a été isolé pour la première fois à partir du cerveau de porc en 1982 (Tatemoto, Carlquist et al. 1982). Il est principalement exprimé et produit dans l'hypothalamus par les neurones de l'ARC (Chronwall, DiMaggio et al. 1985). La majorité de ces neurones co-expriment aussi le peptide AGRP (Broberger, Johansen et al. 1998). Toutefois, d'autres neurones du DMH sont aussi capables de produire du NPY (Grove, Allen et al. 2003). En dehors de l'hypothalamus, certaines études ont montré que d'autres régions telles que le tronc cérébral ou l'hippocampe comportent également des neurones exprimant NPY (de Quidt and Emson 1986, van den Pol, Yao et al. 2009). Cependant, l'éventuel rôle du NPY au sein de ces régions extra-hypothalamiques dans la régulation de la balance énergétique demeure inconnu.

Des expériences d'injection intracérébrale de NPY ont permis d'identifier trois noyaux cibles du NPY dans l'hypothalamus, à savoir le LH, le PVN, et le VMH (Stanley, Chin et al. 1985). Toutefois, NPY semble préférentiellement moduler l'activité neuronale dans le PVN par deux mécanismes pré et post-synaptiques. Au niveau pré-synaptique, le NPY agit en inhibant la libération du neurotransmetteur GABA dans la fente synaptique des neurones parvocellulaires (Melnick, Pronchuk et al. 2007). Le mécanisme post-synaptique, quant à lui, est spécifique des neurones exprimant les récepteurs de la mélanocortine MC3 et 4R. En effet, des études d'électrophysiologie utilisant la méthode de patch clamp ont testé les effets d'AgRP, et NPY dans les neurones MC4R du PVN de souris transgéniques MC4R. Les enregistrements de l'activité neuronale montre qu'à la fois AGRP et NPY induisent une inhibition de l'activité des neurones MC4R via une hyperpolarisation directe de la membrane. De plus, les effets observés de NPY étaient réversible suggérant ainsi qu'ils sont médiés par des mécanismes post-synaptiques (Ghamari-Langroudi, Srisai et al. 2011).

C-2-1-b-Rôle du neuropeptide Y (NPY).

Le NPY est l'un des plus importants neuropeptides orexigènes agissant au niveau de l'hypothalamus. Cinq récepteurs métabotropiques différents du NPY ont été identifiés jusqu'à présent Y1, Y2, Y4, Y5 et Y6 couplés soit à la protéine Gi, inhibant ainsi l'Adénylate Cyclase, soit à la protéine Gq conduisant à une augmentation des concentrations du calcium intracellulaire (Gehlert 2004). Parmi l'ensemble des récepteurs décrits, on note Y1 exprimé dans les neurones POMC et Y2 au niveau des neurones NPY (Broberger, Landry et al. 1997) de l'ARC. Une étude récente suggère que les effets de NPY sur la prise alimentaire requièrent à la fois l'activation des deux récepteurs Y1 et Y5 (Nguyen, Mitchell et al. 2012). L'étude des effets métaboliques et comportementaux de ce neuropeptide a démontré qu'une administration chronique de NPY chez des rongeurs induit une hyperphagie et une prise de poids conduisant à l'obésité (Zarjevski, Cusin et al. 1993). Les taux de NPY dans l'ARC sont augmentés dans plusieurs modèles animaux d'obésité notamment, les souris sensibles à la DIO (Diet-Induced Obesity) (Guan, Yu et al. 1998), les souris obèses *ob/ob* déficientes en leptine, et les souris déficientes en MC4R (Kesterson, Huszar et al. 1997). La délétion de NPY chez les souris *ob/ob* réduit leur phénotype hyperphagique et d'obésité. L'utilisation d'adénovirus anti-sens dirigé contre NPY spécifiquement dans l'ARC de rats adultes, diminue l'expression de NPY et induit une diminution de la prise alimentaire et du poids corporel (Gardiner, Kong et al. 2005). L'ensemble de ces études supportent donc un rôle clé du NPY dans la régulation de la prise alimentaire et de l'obésité.

C-2-2 Les neurones Agouti related-peptide (AGRP)

C-2-2-a Production et sites d'action d'AGRP

AGRP est un peptide de 132 acides aminés. Des études d'immunohistochimie et d'hybridation *in-situ* ont démontré qu'AGRP est exprimé principalement dans l'hypothalamus et les glandes surrénales (Haskell-Luevano, Chen et al. 1999). Cependant, l'utilisation de la colchicine ne montre pas l'existence de corps cellulaires AGRP positifs en dehors de l'ARC (Broberger, Johansen et al. 1998). De plus, il a été démontré que 95% de la

population des neurones exprimant AGRP, co-exprime le neuropeptide NPY et se projettent vers le PVN et DMH (Arora and Anubhuti 2006).

C-2-2-b Rôle d'AGRP

Le rôle d'AGRP dans la régulation de la prise alimentaire et le poids corporel a été mis en évidence en 1999 (Wilson, Ollmann et al. 1999). Une administration chronique d'AGRP chez les rongeurs induit une hyperphagie conduisant à l'obésité (Small, Kim et al. 2001). Inversement, l'ablation des neurones AGRP chez la souris adulte inhibe la prise alimentaire chez ces animaux, conduisant dans certains cas à l'anorexie (Cansell, Denis et al. 2012). L'AGRP est un antagoniste endogène des récepteurs aux mélanocortines MC3 et 4R (Yang, Thompson et al. 1999). Cependant, il a été suggéré qu'au moins une partie des effets à long terme d'AGRP peut être indépendante de son effet antagoniste de MC3 et 4R. Elle impliquerait plutôt des mécanismes supplémentaires tels que ses effets en tant qu'agoniste inverse de MC3 et 4R, ou de son interaction avec un récepteur inconnu (Hagan, Rushing et al. 2000). D'autre part, il a été démontré que 22 semaines de diète riche en gras, réduit de manière significative l'expression d'AGRP au niveau de l'ARC tandis que l'expression de MC4R l'augmente (Huang, Han et al. 2003). L'activité neuronale des neurones NPY/AGRP est sujet à régulation par plusieurs facteurs hormonaux régulant la prise alimentaire notamment la leptine, la ghréline et l'insuline (Belgardt, Okamura et al. 2009).

C-2-3 Les neurones à Pro-opiomélanocortine (POMC)

C-2-3-a Production et sites d'action de POMC

Le pro-opiomélanocortine ou POMC est un précurseur de deux différentes classes de peptides, les mélanocortines et les bêta-endorphines (Pritchard, Turnbull et al. 2002). Il est exprimé dans le cerveau ainsi que dans différents tissus périphériques. Les clivages post-traductionnels de POMC diffèrent selon le type de tissu ainsi que les endoprotéases (convertases) exprimées dans ce tissu, conduisant à des hormones polypeptidiques différentes (Bloomquist, Eipper et al. 1991, Bicknell 2008). Dans le SNC, POMC est principalement exprimé au niveau hypothalamique ainsi que le NTS (Mountjoy 2010). Au niveau de l'hypothalamus, il est retrouvé plus spécifiquement, dans les neurones de l'ARC,

où il est clivé en α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) (Bicknell 2008). La plupart des neurones POMC co-expriment également CART, un peptide avec des propriétés anorexigènes. Les cellules POMC et CART-positives (POMC / CART) sont localisées dans la partie ventro-latérale de l'ARC et la zone péri-arqué de l'hypothalamus (Cone 2005).

C-2-3-b Rôle de POMC

Le clivage de POMC dans les neurones de l'ARC génère l' α -MSH. Ce peptide est un agoniste des récepteurs MC3R et 4R exprimés par certains neurones du PVN de l'hypothalamus, mais aussi, dans d'autres régions durant le développement telles que le cortex cérébral et l'hippocampe (Kistler-Heer, Lauber et al. 1998). Administré centralement, l' α -MSH inhibe la prise alimentaire ainsi que le poids corporel. Cet effet est altéré par l'administration d'AGRP (Rossi, Kim et al. 1998) (Neary, Goldstone et al. 2004), qui est un antagoniste endogène du MC4R.

Les souris déficientes en POMC semblent représenter le même phénotype que celles déficientes en MC4R, c'est à dire obèses, hyperphagiques et présentent une augmentation soutenue de la prise alimentaire lors d'un régime riche en gras. Les souris déficientes en POMC présentent également une préférence marquée pour les diètes riches en gras lorsqu'elles ont le choix de repas avec 10%, 45% ou 60% de matière grasse (Garfield, Lam et al. 2009). A l'instar des neurones NPY/AGRP, les neurones POMC semblent aussi être régulés à la fois par les nutriments tels que le glucose et les acides gras, et par les hormones telles que l'insuline et la leptine (Belgardt, Okamura et al. 2009). Récemment, il a été démontré qu'un régime riche en gras augmente le tonus anorexigène en modulant l'activité des neurones POMC et ce, après 3 jours de régime (Benani, Hryhorczuk et al. 2012). Des mutations du gène POMC ou du récepteur MC4R sont les rares causes d'obésité monogéniques chez l'homme, marquant ainsi l'importance de ce réseau neuronal dans la pathologie humaine (Farooqi and O'Rahilly 2005).

IV-Signaux métaboliques et hormonaux impliqués dans la régulation centrale de l'homéostasie énergétique.

Afin d'accéder au niveau central, les hormones ainsi que les nutriments circulants doivent franchir la barrière hémato-encéphalique.

A-La barrière hémato-encéphalique (BHE).

La barrière hématoencéphalique est une structure vasculaire dont la caractéristique principale est la présence de jonctions serrées entre les cellules endothéliales. Cependant, la BHE comprend également d'autres types cellulaires incluant les cellules gliales et les péricytes en contact direct avec les cellules endothéliales (Hawkins and Davis 2005) (Langlet, Mullier et al. 2013). Les cellules endothéliales composant la BHE présentent une faible épaisseur et de nombreuses mitochondries, caractéristiques d'un métabolisme énergétique intense. Elles reposent sur une membrane basale, composée d'un ensemble de fibronectine, collagène, perlecan et de différentes isoformes de chaînes de laminine (Engelhardt and Sorokin 2009). L'ensemble de cette structure permet ainsi de réguler finement le passage de molécules de la périphérie vers le système nerveux central, en diminuant la diffusion paracellulaire des substances provenant du plasma et les dirigeant vers un passage transcellulaire (Mouille, Cansell et al. 2012). Ceci prévient une exposition directe du système nerveux central aux molécules circulantes, et garantit ainsi une certaine stabilité de l'environnement cérébral.

Comme décrit antérieurement, différentes hormones et peptides sont impliqués dans le contrôle central de l'homéostasie énergétique. Cependant, les effets physiologiques ainsi que les mécanismes d'action de certains peptides tels que la bombésine et l'entérostatine ne sont pas complètement établis. Nous nous limiterons dans cette introduction à trois hormones bien caractérisées qui sont la leptine, la ghréline et l'insuline.

B- Signaux hormonaux

B-1 La leptine

La leptine est une hormone de nature peptidique, essentiellement sécrétée par le tissu adipeux proportionnellement à la masse adipeuse, et dont les taux circulants sont élevés chez les personnes en surpoids et obèses. Le récepteur à la leptine, Ob-R, se présente sous plusieurs isoformes se répartissant en trois groupes, la forme sécrétée, courte, et longue.

Tandis que la forme sécrétée des récepteurs ne comprend que la partie extracellulaire du récepteur se liant ainsi à la leptine circulante, les deux isoformes courte et longue comprennent une partie extracellulaire, transmembranaire, et intracellulaire. La différence majeure entre les deux, réside dans la longueur de la partie intracellulaire. Ainsi, la partie courte assure le transport de la leptine à travers la BHE (Bates, Stearns et al. 2003), alors que la forme longue est exprimée dans les noyaux de l'hypothalamus. En liant la leptine, ce dernier s'associe via sa partie intracellulaire avec la voie de signalisation Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK/STAT), membre de la famille des tyrosines kinases. La leptine active JAK2 qui s'autophosphoryle et active à son tour par phosphorylation le facteur de transcription STAT3. STAT3 agit notamment en régulant la transcription des gènes codant pour POMC et NPY/AGRP (Bates and Myers 2004, Morton, Blevins et al. 2009). La leptine module également d'autres voies de signalisation dans le cerveau, y compris la phosphoinositide 3-kinase (PI3K), ainsi que la voie de l'AMPK (Villanueva and Myers 2008). Le rôle de la leptine dans la régulation de l'homéostasie énergétique a bien été élucidé, notamment chez les souris *ob/ob*, déficientes pour la leptine ainsi que les souris *db/db* déficientes pour son récepteur Ob-R. Ces souris présentent une obésité sévère avec développement d'un diabète de type 2 chez la souris *db/db* (Friedman and Halaas 1998).

B-2- L'insuline

L'insuline est la principale hormone hypoglycémisante. Bien que son expression a été décrite au niveau cérébral (Banks 2004), sa sécrétion est quasi-exclusive par la cellule bêta du pancréas en réponse à une augmentation de la glycémie. De plus, les taux circulants de

Revue bibliographique

l'hormone sont proportionnels à la masse grasse (Polonsky, Given et al. 1988) supportant son rôle de « lipostat ». Son rôle principal est d'assurer le maintien de l'euglycémie en situation postprandiale en inhibant la production hépatique du glucose et stimulant son utilisation par le muscle et le tissu adipeux. Toutefois, l'insuline se révèle aussi effectrice au sein de certaines régions du cerveau qui régulent la balance énergétique.

Le récepteur à l'insuline est largement exprimé au niveau du SNC (Unger, Livingston et al. 1991), notamment au niveau du tronc cérébral, du cervelet, de l'hippocampe, du cortex, et de l'hypothalamus. Ce dernier, présente une forte concentration dans l'ARC suivit des autres noyaux hypothalamiques incluant le DMH, VMH et le LH (Schwartz MW et coll., 1992). L'expression de l'insuline elle-même au sein du cerveau, fait encore l'objet d'un débat controversé. Cependant, la sécrétion d'insuline a été détectée in vitro au niveau de neurones de cerveau de rat en culture (Clarke, Mudd et al. 1986). Récemment, il a été démontré, que le gène de l'insuline 2, *Ins2* et non *Ins1* est exprimé au niveau du système nerveux central (Mehran, Templeman et al. 2012). L'activation des récepteurs à l'insuline implique la voie phosphoinositide 3-kinase (PI3K/ AKT), la voie des MAP (Mitogen-Activated Proteins) Kinases, en outre, l'inhibition de la voie PI3K bloque l'effet de l'insuline sur la prise alimentaire (Niswender, Morrison et al. 2003). D'autre part, l'insuline active aussi la voie mTOR (mammalian target of rapamycin) dans l'hypothalamus, à son tour, mTOR/S6K (p70 S6 kinase) régule la suppression de la production hépatique du glucose médiée par l'insuline (Ono, Pociu et al. 2008). Le rôle central de l'insuline dans la régulation de l'homéostasie glucidique a fait l'objet de plusieurs études. Dans ce contexte, les souris dont le gène du récepteur à l'insuline a été invalidé spécifiquement dans les neurones, deviennent obèses suite à une augmentation de la prise alimentaire, et développent une résistance à l'insuline et une hypertriglycémie (Bruning, Gautam et al. 2000).

Cependant, la découverte d'un certain nombre de fonctions non-métaboliques de l'insuline dans le SNC et à la BHE, suggère que contrairement à son rôle de régulateur métabolique au niveau périphérique, l'insuline agit au niveau central indépendamment du glucose.

il a été particulièrement démontré que l'insuline a plusieurs effets sur la fonction des cellules de la barrière, en améliorant le transport des deux acides aminés, la tyrosine et le tryptophane (Cangiano, Cardelli-Cangiano et al. 1983). L'insuline augmente aussi le

transport de la leptine du sang vers le cerveau (Kastin and Akerstrom 2001), ainsi que l'expression et la fonction du transporteur, la glycoprotéine-P (Liu, Yang et al. 2009).

Par ailleurs, d'autres aspects des effets centraux de l'insuline, liés à la cognition, sont aussi bien documentés (Luchsinger, Tang et al. 2004).

L'ensemble de ces données montrent donc que l'insuline emprunte deux voies d'actions différentes entre les tissus périphériques et le SNC, la raison de cette différence demeure inconnue, cependant, il est bien établi que l'action de l'insuline au niveau central dépend à la fois de sa production périphérique par la cellule bêta pancréatique et de son transport à travers la BHE (Banks, Owen et al. 2012).

B-3 La ghréline

La ghréline est synthétisée principalement par les cellules endocrines de l'estomac et les cellules de l'intestin, elle a été identifiée initialement comme un facteur stimulant la sécrétion d'hormone de croissance en se liant à son récepteur couplé aux protéines G, le GHSR (Growth Hormone Secretagogue Receptor). Une fois activé, le GHSR augmente l'activité de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3)/ phospholipase C et diacylglycérol conduisant à l'augmentation du calcium intracellulaire et l'activation de la protéine kinase C (Abizaid and Horvath 2012). Par la suite, d'autres fonctions lui ont été attribuées notamment le contrôle de la sécrétion des acides gastriques, la motilité gastro-intestinale, ainsi que d'autres processus (van der Lely, Tschop et al. 2004). Toutefois, l'importance de la ghréline réside dans son rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie glucidique. L'infusion de la ghréline augmente la glycémie sanguine, réduit la tolérance au glucose et diminue la sécrétion d'insuline via des mécanismes impliquant la cellule bêta pancréatique (Dezaki, Hosoda et al. 2004). À ce jour, la ghréline est la seule hormone orexigène identifiée. L'administration périphérique ou centrale de la ghréline conduit à une augmentation puissante de la prise alimentaire, similaire à celle obtenue avec le neuropeptide NPY. De plus, l'administration chronique ICV de la ghréline réduit l'utilisation des acides gras dans les tissus périphériques conduisant à leur accumulation et à l'augmentation du poids corporel (Abizaid and Horvath 2012).

C- Signaux métaboliques

C-1 Les acides aminés

Les acides aminés sont des éléments clé dans la composition des protéines. Ce sont aussi des précurseurs de plusieurs composants incluant les neurotransmetteurs et les hormones. Ils se divisent en deux groupes, les acides aminés essentiels, qui ne sont pas synthétisés par l'organisme, et nécessitent donc un apport via l'alimentation, et les acides aminés non essentiels qui sont synthétisés à partir des intermédiaires de la glycolyse et du cycle de l'acide citrique.

A leur tour, les acides aminés sont détectés initialement au niveau de la cavité orale impliquant les récepteurs couplés à la protéine G de la famille des récepteurs (type 1 taste receptor) T1R1 et T1R3 (Wauson, Lorente-Rodriguez et al. 2013) et les récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR1 et mGluR4) (Chaudhari, Pereira et al. 2009). Des études récentes suggèrent que l'apport en protéines alimentaires ou l'augmentation des concentrations circulantes des acides aminés régulent la prise alimentaire (Wang, Khondowe et al. 2012). En effet, l'administration des protéines à court terme ou des acides aminés tels que la phénylalanine et le tryptophane, diminue et supprime respectivement la prise alimentaire (Rogers and Blundell 1994, Porrini, Santangelo et al. 1997). De plus, une administration périphérique *in vivo* d'une mixture d'acides aminés active les neurones orexigènes à orexines au niveau du LH (Karnani, Apergis-Schoute et al. 2011).

D'autres approches expérimentales qui consistent à infuser la leucine au niveau du MBH, montrent une réduction significative de la prise alimentaire et du poids corporel (Cota, Proulx et al. 2006), ainsi que le taux plasmatique du glucose. Combinée à un clamp pancréatique basal, l'infusion de la leucine supprime la production hépatique du glucose en diminuant à la fois la glycogénolyse et la néoglucogenèse, suggérant ainsi le rôle métabolique de la leucine au niveau du MBH dans le contrôle de l'homéostasie glucidique (Su, Lam et al. 2012). Au niveau central, deux principales voies de signalisation sont impliquées dans la détection des acides aminés, qui sont la voie mTORC1 (Mammalian Target of Rapamycin Complex 1) et GCN (General Control Non-derepressible) (Xia, Cheng et al. 2012) (Maurin, Jousse et al. 2005). Il est important de noter que des transporteurs membranaires d'acides aminés sont présents en aval et en amont de ces deux voies de

signalisation, afin de réguler les concentrations intra et extracellulaires des acides aminés (Taylor 2014). Cependant le rôle de ces transporteurs dans la régulation hypothalamique de la balance énergétique par les acides aminés est encore inconnu.

C-2 Le Glucose

Le glucose est l'élément clé du métabolisme énergétique, il représente la source d'énergie fondamentale chez la plupart des espèces. Il est aussi précurseur d'autres molécules rentrant dans la régulation du métabolisme énergétique et responsable d'autres fonctions comme la différenciation et la croissance cellulaire. Le glucose circulant provient de deux principales sources, soit l'alimentation ou la production endogène. Cette dernière se manifeste en situation de jeûne, situation pendant laquelle l'organisme puisera dans ses réserves au niveau hépatique via la glycogénolyse et la gluconéogenèse. Le stockage et la mobilisation du glucose sont essentiellement contrôlés par les hormones pancréatiques, l'insuline et le glucagon, respectivement produites par les cellules bêta et alpha du pancréas. La sécrétion de ces hormones est régulée en partie par l'hypothalamus via le système nerveux autonome qui innerve les cellules alpha et bêta-pancréatiques (Pocai, Lam et al. 2005). De plus, le système nerveux autonome régule directement la production hépatique de glucose (Pocai, Obici et al. 2005).

Grace à la méthode utilisant le [14C] 2-désoxyglucose (2DG), analogue du glucose non métabolisable, *Sokoloff et al*, ont rendu possible l'estimation *in vivo*, des niveaux de l'utilisation du glucose dans le cerveau, et a fourni une première démonstration pour l'utilisation cérébral du glucose (Sokoloff, Reivich et al. 1977). Cependant la limitation de cette méthode, est que la nature cellulaire responsable de cette utilisation restait encore inconnue. Ceci a été rendu possible notamment grâce au développement de la technique d'autoradiographie à haute résolution, pour la localisation du glucose ou du 2DG radiomarqué, combinée à des marquages immunohistochimiquee. Ainsi, il a été montré que 50% du glucose entrant dans le cerveau est repris par les astrocytes, tandis que l'autre moitié est directement métabolisée par les neurones (Nehlig, Wittendorp-Rechenmann et al. 2004).

Revue bibliographique

Dans une revue récente, une estimation de la distribution des dépenses énergétiques au niveau cérébral a été réalisée, d'une part, entre les différentes régions et d'autre part, entre les différents processus au sein de la même région. Basés sur différents modèles publiés antérieurement, *Howarth et al*, ont proposé une nouvelle estimation de cette distribution, en comparant deux régions cérébrales, soit, le cortex et le cervelet. 50% des dépenses énergétiques dans le cortex seraient donc dédiées aux récepteurs post-synaptiques, contre seulement 22% dans le cervelet. Inversement, ce dernier, utiliserait une grande fraction d'énergie, 54%, pour maintenir le potentiel de repos contre 20% dans le cortex cérébral, qui, garderait ce même pourcentage pour les potentiels d'action contre 17% dans le cervelet. Ainsi, dans le cortex cérébral, les récepteurs post-synaptiques sont le principal consommateur d'énergie (50%), contrairement au cervelet où l'énergie est utilisée principalement pour le maintien du potentiel de repos (54%) (Howarth, Gleeson et al. 2012). Ces données suggèrent donc une étroite liaison entre les fonctions des régions cérébrales et la distribution des dépenses énergétiques. Toutefois, très peu est connu sur la distribution de l'énergie entre les fonctions de base telles que la synthèse protéique et celle des lipides ainsi que le trafic des organites et des molécules. Bien qu'au niveau du cortex, cette proportion a été estimée entre 25 et 50% (Howarth, Gleeson et al. 2012), rien n'est encore établi au niveau hypothalamique.

Le métabolisme énergétique cérébral est un processus dynamique hautement régulé, ceci est principalement due à une étroite collaboration entre les neurones, les astrocytes et les cellules endothéliales formant ce qu'on appelle l'unité neurovasculaire (Muoio, Persson et al. 2014). De ce fait, les demandes énergétiques cellulaires, le taux du métabolisme cérébral, et le débit sanguin cérébral sont étroitement couplés, ainsi, une augmentation de la demande énergétique conduirait à une augmentation du débit sanguin.

Globalement, l'entrée du glucose dans les cellules se fait à l'aide de transporteurs divisés en différentes isoformes selon leur localisation ou leur affinité pour le glucose. (Thorens and Mueckler 2010).

C-2-1 Transport et métabolisme

Afin de pénétrer dans la cellule, le glucose doit traverser la membrane plasmique. Ce passage se fait essentiellement par diffusion passive à travers la membrane, diffusion facilitée via les transporteurs Gluts et par transport actif via les transporteurs SGLT (sodium glucose cotransporter-1 et 2). Ces derniers, sont très présents au niveau du tube digestif et du tube rénal (Kanwal and Banerjee 2013).

Les transporteurs Gluts assurent une diffusion passive facilitée du glucose selon le gradient de concentration. Initialement caractérisés comme transporteurs exclusifs de glucose, il s'est avéré que certains Gluts transportent aussi d'autres hexoses. Par exemple, Glut-2 transporte non seulement le glucose mais aussi le fructose et le galactose, alors que Glut-5 transporte spécifiquement le fructose (Mueckler and Thorens 2013). La famille des Gluts comprend 14 isoformes qui diffèrent par leur affinité pour le glucose ainsi que leur distribution tissulaire et intracellulaire. Je me limiterai ici à la description des isoformes de Gluts exprimés dans le cerveau dont la localisation est résumée dans le tableau 1.

Glut-1, présente une affinité pour le glucose de ~ 4 mM, entraînant un transport saturé et maximal de ce dernier en conditions euglycémiques. Au niveau central, Glut-1 existe sous deux isoformes de masses moléculaires différentes. Cette différence de masse moléculaire est due à l'existence d'un site de glycosylation au niveau de la première boucle extracellulaire de sa structure transmembranaire. Typiquement, Glut-1 est exprimé dans les cellules qui servent de barrière tels que l'endothélium cérébral de la BHE et le pigment rétinien épithélial de la barrière hémato-rétinienne (Yeh, Lin et al. 2008). Alors que l'isoforme de 45-kDa est exprimée plus spécifiquement au niveau des pieds périvasculaires astrocytaires et absente dans les axones, les synapses neuronales et la microglie (Jurcovicova 2014), l'isoforme de 55 kDa est située au niveau des membranes lumineales et ablumineales des cellules endothéliales cérébrales. Cependant des études antérieures ont rapporté l'expression de Glut-1 dans des neurones en culture à la fois au niveau de la membrane plasmique et du cytoplasme (Maher, Davies-Hill et al. 1991).

Revue bibliographique

Glut-2, possède une forte constante d'affinité K_m égale à ~ 17 mM, caractéristique qui lui permet, dans la cellule bêta pancréatique, d'assurer la détection du glucose, et de le transporter, proportionnellement aux concentrations circulantes, sans être saturé (Thorens 1992). Au niveau central, la présence de Glut-2 a été détectée à la fois au niveau des neurones et des astrocytes (Arluison, Quignon et al. 2004), dans un nombre de noyaux cérébraux incluant le NTS, le bulbe olfactif, ainsi que différents noyaux hypothalamiques, tels que le PVN, le LH et l'ARC (Leloup, Arluison et al. 1994). D'autre part, Glut-2 joue aussi un rôle dans la détection du glucose que j'aborderai un peu plus loin.

Glut-3, est le transporteur majeur du glucose dans les neurones avec des niveaux d'expression variables selon les régions cérébrales et une faible constante d'affinité d' ~ 1.5 mM. Le marquage intracellulaire montre que l'expression de Glut-3 est beaucoup plus concentrée au niveau des terminaisons pré et post synaptiques. Ces zones sont connues pour leur grande capacité métabolique et demande d'énergie (Leino, Gerhart et al. 1997) (Simpson, Dwyer et al. 2008). Tout cela suggère donc le rôle fonctionnel de Glut-3 dans le processus de terminaison synaptique. Cependant, peu de marquage a été détecté au niveau du corps cellulaire neuronal lui-même. Les astrocytes et les cellules endothéliales n'ont pas montré de présence de Glut-3, confirmant ainsi que c'est un transporteur neuronal spécifique (Leino, Gerhart et al. 1997).

Glut-4, sa constante d'affinité est de 2 à 5 mM. Globalement, son rôle et sa régulation au niveau central sont peu connus. Des études ont montré la présence de l'ARNm de Glut-4 ainsi que sa protéine dans plusieurs régions du cerveau de rongeurs, incluant le cervelet, le cortex, l'hippocampe ainsi que l'hypothalamus (El Messari, Ait-Ikhlef et al. 2002). De plus, dans un modèle de rats hyperinsulinémiques et hyperglycémiques, caractérisé par la diminution de l'activité du système nerveux autonome, l'expression de Glut-4 était affectée dans certains noyaux hypothalamiques (Alquier, Leloup et al. 2001). Cependant, il est important de mentionner que globalement, l'utilisation et le transport de glucose dans le cerveau, ne sont pas contrôlés par l'insuline.

Revue bibliographique

Glut-5 : a une constante d'affinité $d' \sim 6\text{mM}$, présente une affinité préférentielle pour le fructose et est principalement exprimé dans les cellules épithéliales de l'intestin. Dans le cerveau, sa présence a été décrite dans les cellules microgliales. Cependant, comme il est encore incertain que le fructose traverse la BHE, il est possible que Glut-5 transporte d'autres substrats, ce qui pourrait expliquer sa distribution tissulaire et son implication dans la pathologie du diabète (Mueckler and Thorens 2013).

Gluts	Localisation cérébrale	Km
Glut-1	(55kDa): Cellules endothéliales (45kDa): Astrocyte	$\sim 4\text{mM}$
Glut-2	Astrocytes, Neurones	$\sim 17\text{mM}$
Glut-3	Neurones	$\sim 1.5\text{mM}$
Glut-4	Cervelet, Cortex, Hippocampe et Hypothalamus	2-5 mM
Glut-5 (transport du fructose)	Cellules microgliales	$\sim 6\text{mM}$

[Tableau 1 : Localisation cérébrale des transporteurs du glucose \(Gluts\).](#)

Tableau illustrant l'expression tissulaire ou cellulaire des transporteurs du glucose au sein du cerveau, ainsi que leurs caractéristiques cinétiques représentées ici par leur Km (Constante de Michaelis.) pour le glucose.

La famille des Gluts compte aussi d'autres isoformes dont les fonctions spécifiques au niveau périphérique et central ne sont pas encore totalement élucidées.

Transporté à l'intérieur de la cellule, le glucose est phosphorylé par l'enzyme hexokinase, pour produire du glucose -6-phosphate (glucose-6P). Ce dernier peut emprunter trois voies métaboliques possibles. Soit il est stocké sous forme de glycogène ou pris en charge par la voie du pentose phosphate (PPP) conduisant à la production de NADPH. Finalement, il peut être métabolisé par la glycolyse générant deux molécules de pyruvate, de l'ATP et du NADH. Le pyruvate entre ensuite dans les mitochondries, où il est métabolisé par le cycle de TCA et la phosphorylation oxydative et produit de l'ATP et du CO₂, tout en consommant de l'oxygène. Le pyruvate peut aussi être réduit en lactate et libéré dans l'espace extracellulaire par les transporteurs de monocarboxylates (MCT) (Belanger, Allaman et al. 2011).

C-2-2 Détection et effets centraux

C-2-2-a Populations neuronales sensibles au glucose

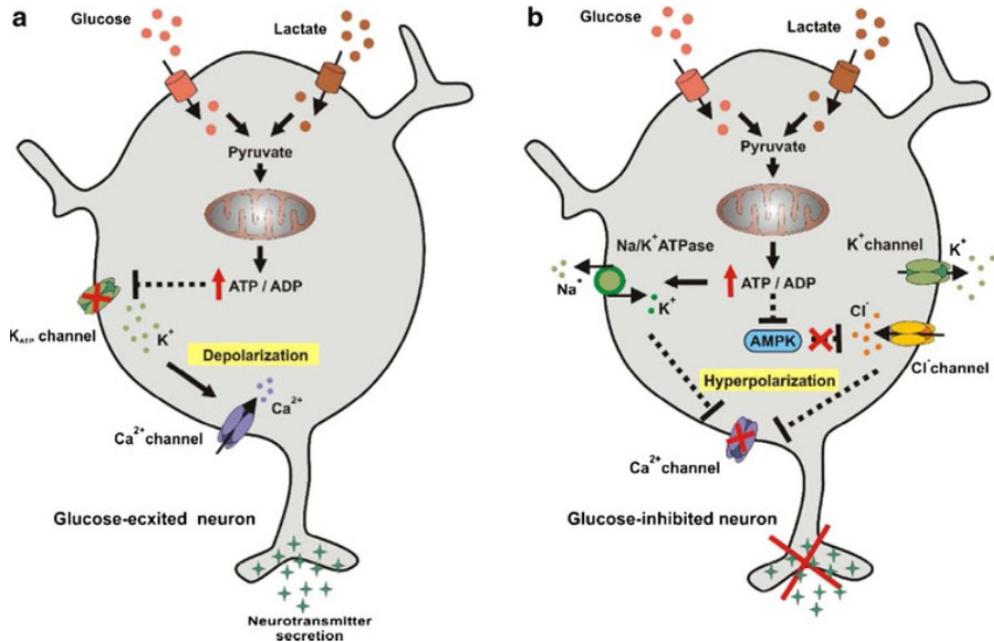
C-2-2-a-i Neurons « Gluco-Excité » GE et « Gluco-Inhibé » GI

La détection des variations des concentrations circulantes du glucose implique la présence des cellules spécialisées capables de détecter ces variations, et permettent en retour d'ajuster la glycémie et la prise alimentaire. Ces cellules sont appelées « glucose-sensor ». Elles sont localisées à la fois au niveau de la veine porte, l'intestin, le pancréas endocrine, les corps carotidiens, et le système nerveux central (Marty, Dallaporta et al. 2007). Les premières expériences démontrant l'implication du cerveau dans le contrôle de la glycémie ont été réalisées par le célèbre physiologiste Claude Bernard en 1854, qui observa que le diabète pouvait être induit chez le lapin par une « piqûre » au niveau du quatrième ventricule cérébral (piqûre diabétique). Depuis, de nombreuses études ont mis en évidence la présence de neurones spécialisés dans la détection des concentrations circulantes du glucose (Routh 2010). En fonction de leur réponse à la variation de la concentration extracellulaire en glucose, deux types de neurones sensibles au glucose ont été

caractérisés au niveau du SNC, plus spécifiquement au niveau de l'hypothalamus. Les premiers, dont l'activité électrique est proportionnelle à la concentration extracellulaire en glucose sont appelés « Gluco-Excité » ou GE. A l'opposé, les neurones « Gluco-Inhibé » ou GI présentent une activité inversement proportionnelle à la concentration du glucose (Marty, Dallaporta et al. 2007). Cependant, l'existence des neurones GE et GI n'est pas restreinte à l'hypothalamus. Ils sont aussi présents dans d'autres régions cérébrales impliquées dans la régulation de la prise alimentaire incluant le NTS, le locus coeruleus et la substance noire (Penicaud, Leloup et al. 2002). Les mécanismes impliqués dans l'activation des neurones GE suite à une augmentation de la glycémie semblent similaires à ce qui a été décrit dans la cellule bêta pancréatique. En effet, l'augmentation de la concentration intracellulaire en ATP générée par le métabolisme du glucose, conduit à la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants (K_{ATP}), induisant une dépolarisation de la membrane, un influx de calcium (Ca^{2+}) et la sécrétion des neurotransmetteurs ou neuropeptides. Dans les neurones GI, l'augmentation de l'ATP due à l'élévation de la glycémie, induit une suppression de la sécrétion des neurotransmetteurs via une hyperpolarisation membranaire (Jordan, Konner et al. 2010) (Figure 5).

C-2-2-a-ii Cellules gliales

Outre les différents rôles déjà discutés, les cellules gliales notamment les astrocytes, sont aussi impliqués dans les mécanismes de détection du glucose (Guillod-Maximin, Lorsignol et al. 2004). Pour les astrocytes, ce rôle est consolidé par leur localisation entre les vaisseaux sanguins et les neurones ainsi qu'au niveau des ventricules. D'autre part, les tanocytes, cellules dont les corps cellulaires bordent la base du troisième ventricule, et les prolongements atteignent la ME, semblent aussi être impliqués dans le mécanisme de la détection central du glucose. Il a été notamment démontré qu'en réponse à une augmentation des concentrations du glucose, les concentrations de Ca^{2+} intracellulaire augmentent également au sein des tanocytes (Frayling, Britton et al. 2011). De plus, les tanocytes expriment Glut-2 et la glucokinase, ce qui consolide fortement leur rôle dans la détection du glucose (Millan, Martinez et al. 2010).



Source : Jordan, Konner et al 2010

Figure 5: Mécanismes de détection du glucose dans les neurones hypothalamiques.

a- Dans les neurones GE, une augmentation des concentrations extracellulaires du glucose et/ ou du lactate induit une augmentation du ratio ATP/ADP conduisant à la fermeture des canaux potassiques ATP dépendants suivie par une dépolarisation de la membrane plasmique et une entrée des ions Ca^{2+} à travers les canaux voltage-dépendants. L'activité neuronale est ainsi stimulée et conduit à la sécrétion des neurotransmetteurs.

b- Dans les neurones GI, l'augmentation du ratio ATP/ADP induit l'activation de la pompe $Na^+-K^+-ATPase$ et/ ou l'inhibition de l'AMPK. Ceci entraîne l'ouverture des canaux Cl^- et l'hyperpolarisation de la membrane plasmique, et par conséquent, conduit à la suppression de la sécrétion de neurotransmetteurs.

C-2-2-a-iii Couplage métabolique entre les neurones et les astrocytes.

Les astrocytes et les neurones, ont tous deux la capacité d'utiliser le glucose et/ ou le lactate (Zielke, Zielke et al. 2009). L'utilisation *in vivo* de la méthode du ^{14}C 2-DG associée à des méthodes de trajectographie cellulaire et d'immunohistochimie a montré que 50% du glucose entrant dans le cerveau est directement métabolisé par les neurones, tandis que l'autre moitié est prise et phosphorylée par les astrocytes (Nehlig, Wittendorp-Rechenmann et al. 2004).

Historiquement, deux grandes hypothèses ont été émises concernant le métabolisme du glucose au niveau central. D'une part, on retrouve l'hypothèse dite classique, et d'autre part l'hypothèse de la navette du lactate (ANLS).

Selon l'hypothèse classique, l'augmentation de l'activité de la pompe $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ dans les cellules cérébrales, suite à l'activation neuronale, provoque une augmentation de l'utilisation de l'ATP, augmentant ainsi les taux de la glycolyse et du métabolisme oxydatif à la fois dans les neurones et les astrocytes, qui tous les deux, vont produire et utiliser le lactate. Ce dernier serait donc produit dans le cerveau temporairement quand le taux de l'activité glycolytique dépasse celui du métabolisme oxydatif (Prichard, Rothman et al. 1991). Cependant, cette hypothèse ne prend pas en considération les voies aérobiques ou anaérobiques du métabolisme du glucose, plus encore, le lactate ne serait utilisé que lorsque le taux de la glycolyse est faible.

En revanche, l'hypothèse d'ANLS propose que l'augmentation de l'activité neuronale induirait une augmentation de la glycolyse anaérobique uniquement dans les astrocytes sans augmenter la voie de la glycolyse neuronale. Les astrocytes vont donc produire du lactate destiné à être transporté vers les neurones en activité pour alimenter leur métabolisme oxydatif (Magistretti and Pellerin 1999). En effet, le glycogène emmagasiné à partir du glucose par les astrocytes, peut être converti rapidement en pyruvate et lactate et métabolisé dans le *cycle de Krebs*, utilisé pour la biosynthèse du glutamate, et éventuellement pour reproduire du glucose. À la fois, le glucose et le lactate seront

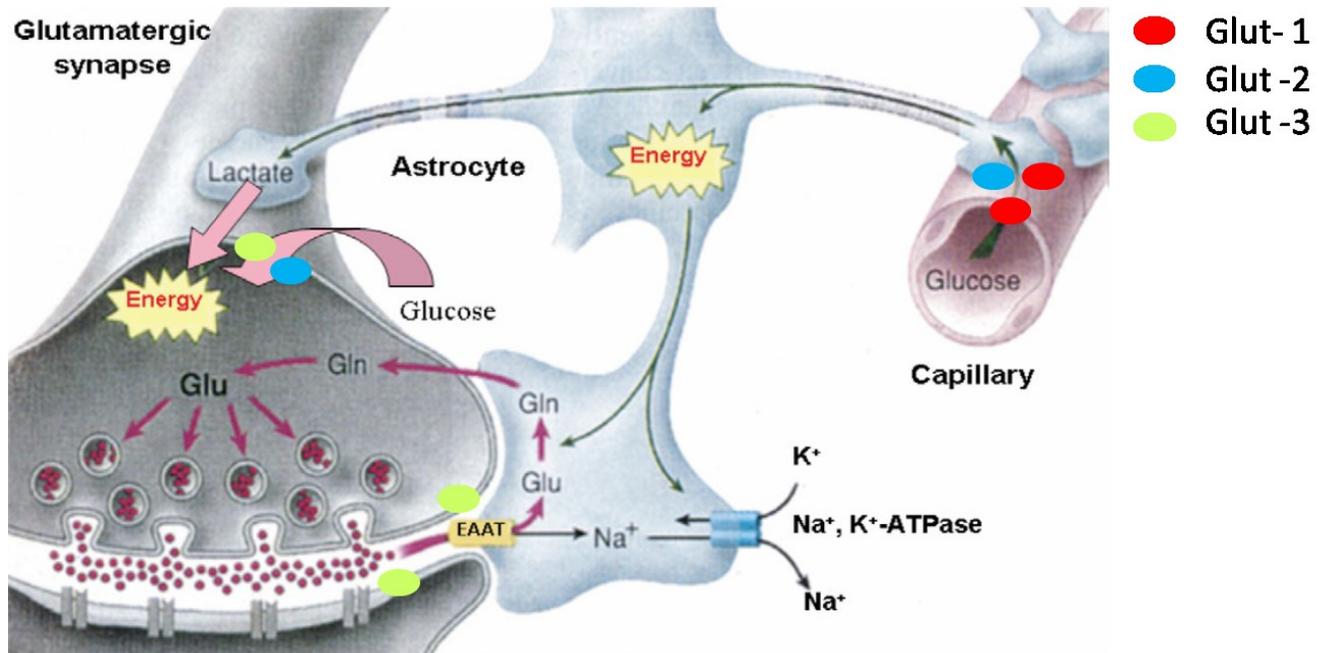
Revue bibliographique

exportés afin d'être utilisés par les neurones (Vilchez, Ros et al. 2007, Suzuki, Stern et al. 2011) (Fig. 6).

Quoique des études des caractéristiques cinétiques des enzymes métaboliques et des changements observés dans les métabolites prêtaient peu de soutien au concept de base de l'ANLS (Chih and Roberts Jr 2003), D'autres études supportent cette dernière. Ainsi, il a été montré que les deux types cellulaires, neurones et astrocytes, possèdent deux profils différents d'expression des gènes clés régulant le métabolisme énergétique (Lovatt, Sonnewald et al. 2007) (Herrero-Mendez, Almeida et al. 2009). En conséquence, il a été démontré que les neurones sont principalement oxydatifs, alors que les astrocytes sont principalement glycolytiques, ce qui appuie fortement l'existence d'un couplage métabolique neuro-astrocytaire. Un couplage dont l'importance a été démontrée, notamment, via une perfusion directe du lactate dans le VMH durant un clamp hypoglycémique. Cette dernière a entraîné une suppression de la sécrétion du glucagon mimant ainsi l'effet du glucose (Borg, Tamborlane et al. 2003).

D'autre part, il a été démontré que dans l'hypothalamus, les mécanismes de détection des niveaux circulants du glucose dépendaient du taux de glucose converti en lactate par les astrocytes (Lam, Gutierrez-Juarez et al. 2005). Des données récentes obtenues à partir de cerveaux de rats, suggèrent que la capacité des astrocytes à absorber du lactate à partir du fluide extracellulaire ou via l'ANLS était 2 à 4 fois plus rapide et plus élevée comparée à celle des neurones (Gandhi, Cruz et al. 2009). Le réseau astrocytaire était capable de disperser le lactate dans l'ensemble du syncytium le long de la vascularisation jusqu' aux pieds astrocytaires, pour le libérer dans le sang ou dans d'autres régions du cerveau via le liquide péri-vasculaire (Gandhi, Cruz et al. 2009).

Bien que la production du lactate astrocytaire, qui va servir comme source d'énergie pour les neurones, ait été proposée par *Pellerin et Magistretti* (Pellerin et Magistretti, 1994), ce n'est que récemment qu'une étude in vivo a démontré le rôle protecteur du lactate, comme source d'énergie primaire, dans le maintien de l'activité neuronale en perfusant du lactate lors d'hypoglycémie induite par l'insuline. Il a été notamment démontré d'une part que



Adapté de : Magistretti P J J Exp Biol 2006;209:2304-2311

Figure 6 : Couplage métabolique entre neurones et astrocytes

Le glucose est absorbé directement par les neurones ou via les astrocytes qui vont le dégrader pour produire du lactate. Ce dernier conduit à la production du glutamate qui sera libéré au niveau des synapses glutamatergiques. L'action du glutamate se termine via sa réabsorption par les astrocytes, il sera co-transporté avec l'ion Na⁺ entraînant une augmentation de la concentration intracellulaire de ce dernier. Ceci conduit à l'activation de la pompe Na⁺-K-ATPase et le glutamate est alors converti en glutamine.

Gln, glutamine; Glu, Glutamate; Glut, Glucose transporter EAAT. Excitatory Amino Acid Transporter 1.

Revue bibliographique

le cerveau oxyde rapidement le lactate d'une manière dépendante de son activité. Et d'autre part, qu'il réduisait son utilisation du glucose d'une façon dépendante de l'augmentation de la concentration du lactate (Wyss, Jolivet et al. 2011). Ceci suggère donc que le cerveau préfère le lactate au glucose comme substrat énergétique lorsque les deux substrats sont disponibles.

Un autre aspect important de l'ANLS est la maintenance de l'excitabilité neuronale qui consiste à l'élimination rapide des neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique mettant fin à la transmission synaptique. Ce processus est d'autant plus critique pour éviter toute excitotoxicité neuronale due à une sur-stimulation du glutamate. Ce dernier, est principalement capté par les transporteurs du glutamate 1 (GLT-1) ainsi que les transporteurs Glutamate-aspartate (GLAST) connus chez les humains sous le nom de EAAT1 et EAAT2 (Bak, Schousboe et al. 2006).

C-2-2-b Acteurs de la détection du glucose

C-2-2-b-i Transporteurs de glucose : Gluts

Indépendamment de leur rôle dans le métabolisme du glucose, certains Gluts notamment Glut-1 et Glut-2 semblent agir en tant que récepteur via une signalisation intracellulaire. Ainsi, les souris chez qui Glut-2 a été tronqué en C-terminal de façon à perdre son activité en tant que récepteur tout en gardant son activité de transporteur, montrent une augmentation de la prise alimentaire, ainsi qu'une altération de l'activation de c-Fos par le glucose au niveau des neurones de l'ARC (Stolarczyk, Guissard et al. 2010). Récemment, il a été suggéré que Glut-2 pourrait constituer un lien entre la détection de l'hypoglycémie et la réponse contre-régulatrice dans les neurones sensibles au glucose du NTS (Lamy, Sanno et al. 2014). D'autre part, *Lam et al* ont montré qu'une hyperglycémie soutenue altère la détection hypothalamique du glucose et induit une baisse de la production hépatique de glucose via des changements de Glut-1 dans les cellules astrogliales hypothalamiques. Ceci confirme ainsi son rôle dans la détection hypothalamique du glucose (Chari, Yang et al. 2011). Toutefois, des études d'électrophysiologie ont démontré que le pourcentage des neurones glucosensibles au niveau de l'ARC et/ou du NTS ne représente que 20 à 30 % de

Revue bibliographique

l'ensemble de la population neuronale présente dans ces noyaux (Levin 2006). Dans l'ARC, seulement 30% des neurones glucosensibles expriment Glut-2, qui malgré sa présence, ne semble pas être impliqué dans le mécanisme de détection du glucose (Kang, Routh et al. 2004).

Le désaccord entre ces différentes études, peut être expliqué par la différence des modèles utilisés, *in vivo* vs *ex vivo*. D'autres études doivent donc être réalisées afin de mieux élucider le rôle des Gluts dans la détection du glucose au niveau central.

C-2-2-b-ii La glucokinase (GK)

La plupart des neurones expriment l'hexokinase-I (HK-I), enzyme saturée en présence de concentrations physiologiques de glucose et inhibée par son produit, le glucose-6-Phosphate (Sutherland, McReynolds et al. 2005). De ce fait, Il a été suggéré que la glucokinase peut être impliquée dans le mécanisme de détection du glucose par les neurones glucosensibles. En effet, la GK est exprimée au niveau cérébral dans plusieurs régions incluant le MBH et le LH, et est retrouvée dans différents types cellulaires incluant les neurones GE et GI, ainsi que les cellules gliales (Lynch, Tompkins et al. 2000, Dunn-Meynell, Routh et al. 2002). L'inhibition de la GK par l'alloxane, agent pharmacologique dont la structure ressemble à celle du glucose, affecte de ~ 75% les oscillations calciques dans les neurones GE et GI exprimant la GK (Kang, Routh et al. 2004). Plus encore, la désactivation de la GK via des ARNs interférents dans des neurones ou des cultures primaires de VMH et/ou de l'ARC, induit une réduction de la réponse des neurones GE et GI aux augmentations des concentrations du glucose. Inversement l'activation pharmacologique de la GK conduit à une augmentation dose dépendante des oscillations calciques des neurones GE (Kang, Dunn-Meynell et al. 2006). L'ensemble de ces résultats suggère fortement que la GK est impliquée dans la détection hypothalamique du glucose. Toutefois, étant donné que les astrocytes sont aussi impliqués dans la détection du glucose, il serait intéressant de tester si la GK joue ce même rôle au sein des astrocytes.

Revue bibliographique

C-2-2-b-iii L'AMP-activated kinase (AMPK)

-Expression et régulation

L'AMPK (AMP-activated kinase) est une sérine/thréonine kinase composée d'une sous unité catalytique ($\alpha 1$ ou $\alpha 2$) et de deux sous unités régulatrices ($\beta 1$ ou $\beta 2$ et $\gamma 1$, $\gamma 2$ ou $\gamma 3$). Elle est activée en réponse à une diminution du ratio AMP:ATP par la phosphorylation de la sous unité α sur la thréonine 172. Ce processus est catalysé par la protéine Liver kinase B1 (LKB1) ou la protéine kinase Ca²⁺/Calmoduline dépendante α ou β (CaMKK α ou CaMKK β). L'AMPK est aussi activée de manière allostérique par l'AMP en augmentant sa phosphorylation via l'inhibition de la protéine phosphatase 2C (PP2C) (Blanco Martinez de Morentin, Gonzalez et al. 2011).

Les mécanismes induisant l'activation de l'AMPK via l'augmentation de l'AMP, sont connus sous le nom de mécanismes classiques «canoniques». Cependant des travaux récents suggèrent que d'autres stimuli tels que les ROS (Reactive oxygen species) et les dommages à l'ADN, peuvent activer l'AMPK via des voies «non-canoniques» n'impliquant pas des changements dans les niveaux d'AMP. Globalement, les mécanismes impliqués dans ces voies ne sont pas encore élucidés (Hardie, Ross et al. 2012).

Au niveau périphérique, l'AMPK est exprimée dans tous les tissus et organes. Elle est impliquée dans le contrôle de plusieurs mécanismes physiologiques, dont le métabolisme intracellulaire incluant le métabolisme glucidique, des lipides, la synthèse protéique ainsi que la fonction mitochondriale (Hardie, Ross et al. 2012). L'activation de l'AMPK conduit d'une part à la stimulation des voies cataboliques de la synthèse d'ATP telles que l'absorption et le métabolisme du glucose et des acides gras. D'autre part, les voies anaboliques consommatrices d'ATP sont régulées à la baisse, en outre, la synthèse des acides gras, du cholestérol, du glycogène, et des protéines (Spasic, Callaerts et al. 2009). Elle est aussi impliquée dans d'autres mécanismes, telles que la croissance et la prolifération cellulaire (Jones, Plas et al. 2005), ainsi que la résistance à l'insuline (Iglesias, Ye et al. 2002).

Au niveau central, l'AMPK est exprimée dans la plupart des régions cérébrales tout au long du développement (Turnley, Stapleton et al. 1999). Elle présente une forte expression

notamment dans les noyaux hypothalamiques contrôlant la balance énergétique incluant l'ARC, VMH, PVN et LH (Minokoshi, Alquier et al. 2004, Lage, Dieguez et al. 2008). L'isoforme AMPK α 2 est fortement exprimée dans les neurones et les astrocytes activés, tandis que la sous-unité non catalytique γ 1 est fortement exprimée dans les neurones et absente dans les astrocytes (Turnley, Stapleton et al. 1999). Bien que l'AMPK ait fait l'objet de nombreuses études, l'exploration de son rôle dans un contexte neuronal n'a débuté que depuis quelques années seulement. Dans le paragraphe qui suit, je vais discuter certaines fonctions décrites de l'AMPK, notamment dans le contexte de détection du glucose au niveau central.

-Rôle de l'AMPK

Au niveau périphérique, il a été largement démontré que l'activation de l'AMPK est associée à plusieurs effets bénéfiques sur le métabolisme, l'inflammation ainsi que d'autres paramètres, notamment dans le foie, le muscle, le tissu adipeux et la cellule β pancréatique (Viollet and Andreelli 2011).

Au niveau hypothalamique, la modulation de l'activité de l'AMPK fait partie des changements adaptatifs observés pendant la régulation physiologique de la prise alimentaire. Le jeûne active l'AMPK (Lopez, Lage et al. 2008) dans de nombreuses régions hypothalamiques, tandis que la réalimentation ainsi que l'hyperglycémie l'inhibe (Minokoshi, Alquier et al. 2004). Différentes études effectuées chez les rongeurs ont montré que l'activation de l'AMPK augmentait la prise alimentaire et le poids corporel (Andersson, Filipsson et al. 2004, Minokoshi, Alquier et al. 2004). Inversement, ces deux paramètres diminuaient en réponse à l'inhibition de l'AMPK (Kim and Lee 2005). Par ailleurs, l'activation hypothalamique de l'AMPK augmente l'expression du NPY et d'AGRP, tandis que son inhibition diminue leur expression, induisant l'inhibition de la prise alimentaire (Seo, Ju et al. 2008).

Tel que cela a été discuté précédemment, plusieurs travaux ont tiré le trait sous le rôle du « glucosensing » neuronal dans la régulation de l'homéostasie énergétique

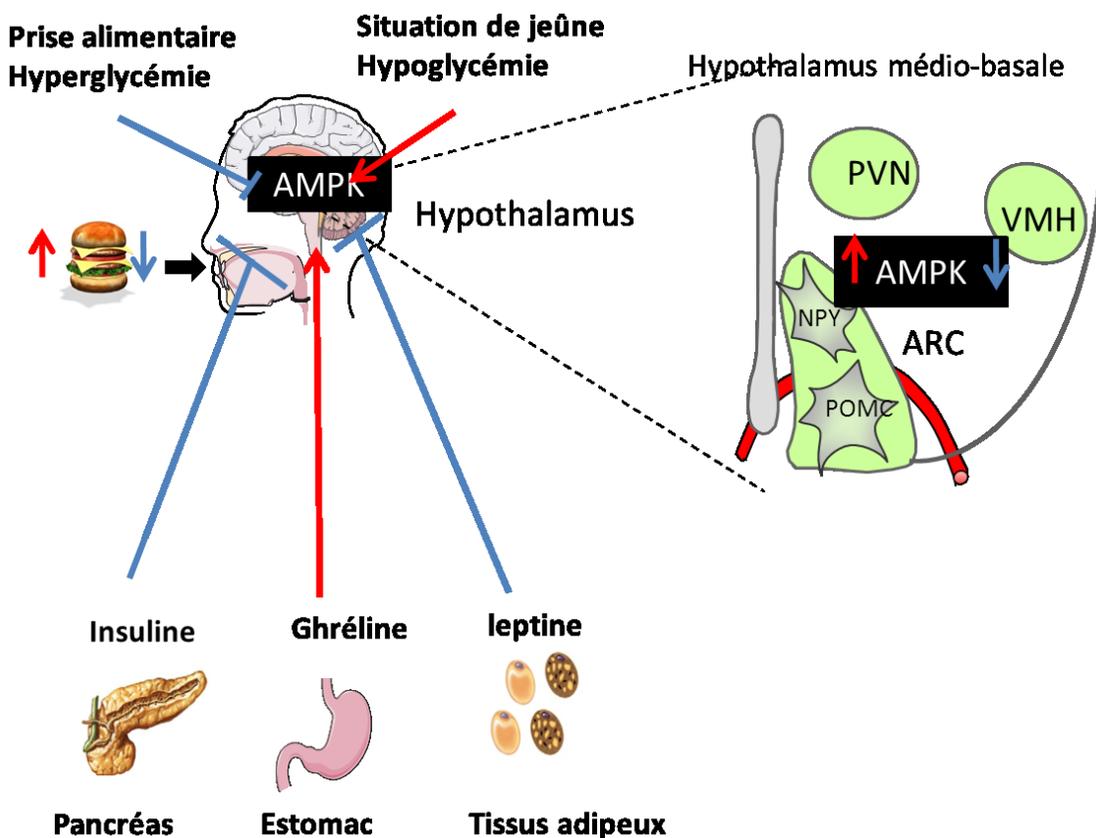


Figure 7: Régulation hormonale de l'AMPK hypothalamique et contrôle de la prise alimentaire :

Les signaux orexigènes tels que l'hypoglycémie, le jeûne ou la ghréline sécrétée par l'estomac stimule la prise alimentaire en activant l'AMPK dans le MBH plus spécifiquement dans les neurones NPY. Inversement, les signaux anorexigènes tels que l'hyperglycémie, l'insuline et la leptine, sécrétées respectivement par le pancréas et le tissu adipeux, activent les neurones POMC générant ainsi un second signal anorexigène et diminuent l'activité AMPK dans ces neurones. La diminution de l'activité AMPK stimule la suppression de NPY/AGRP et diminue à son tour l'activité de l'AMPK dans le PVN.

Revue bibliographique

(Levin, Routh et al. 2004). Dans ce contexte, *Claret et al*, ont testé l'effet de la délétion sélective de l'AMPK sur la détection du glucose dans ces cellules. Ils constataient que la délétion de l'isoforme AMPK $\alpha 2$ dans les neurones AgRP conduisait à une diminution du poids corporel, alors que sa délétion sélective dans les neurones POMC entraînait une augmentation du poids corporel et de la masse adipeuse (Claret, Smith et al. 2007). Parallèlement, les neurones POMC déficients pour AMPK $\alpha 2$ ne répondaient pas à l'augmentation du niveau de glucose extracellulaire. Ces données suggéraient donc le rôle de l'AMPK dans la détection du glucose au sein des neurones POMC et AgRP pour maintenir l'équilibre énergétique à long terme (Claret, Smith et al. 2007). D'une manière similaire aux tissus périphériques, l'inhibition de l'AMPK au niveau hypothalamique par le glucose, active l'enzyme Acetyl-CoA Carboxylase (ACC), qui génère le malonyl-CoA à partir de l'acétyl-CoA produit, lui-même, par le métabolisme du glucose. Ce dernier induit une diminution de la prise alimentaire et de la production hépatique du glucose (Wolfgang, Cha et al. 2007) (Yang, Lam et al. 2010). Ainsi, le réseau de signalisation AMPK/ACC/ malonyl-CoA semble jouer un rôle important dans le contrôle hypothalamique de la prise alimentaire et la production endogène du glucose en réponse à des modifications de la glycémie.

L'AMPK est aussi sujet à régulation par les hormones du métabolisme, telles que l'insuline, la leptine, et le ghréline (Figure 7). Par conséquent, il a été démontré que l'effet de la ghréline sur la prise alimentaire implique l'activation de l'AMPK, cet effet est perdu chez les souris déficientes pour le récepteur de la ghréline GHSR (Andersson, Filipsson et al. 2004) (Stark, Ashley et al. 2013). A l'opposé, les hormones anorexigènes telles que la leptine et l'insuline inhibent l'activité de l'AMPK dans certains noyaux hypothalamiques incluant l'ARC et le PVN. De plus, l'activation constitutive de l'AMPK dans l'hypothalamus prévient l'effet de la leptine sur la prise alimentaire et le poids corporel (Minokoshi, Alquier et al. 2004).

Globalement, plusieurs effets favorables sur le métabolisme intracellulaire, ont été associés à l'activation de l'AMPK au niveau central, malgré cela, plusieurs questions demeurent sans réponse concernant les mécanismes impliqués dans sa régulation. Par exemple, on ignore toujours si l'AMPK agit plus spécifiquement au niveau des neurones ou inclut aussi les astrocytes, et si sa régulation se fait de la même façon ou diffère selon le type cellulaire.

C-3 Les acides gras

Les acides gras sous leur forme libre ou estérifiée en lipides complexes, constituent une source importante d'énergie pour l'organisme. Ils se comportent également comme des molécules de signalisation tant au niveau périphérique que central. En assurant une variété de fonctions biologiques, ils sont ainsi impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique (Wang, Storlien et al. 1999, Cascio, Schiera et al. 2012).

Deux paramètres principaux incluant le nombre de carbones constituant la chaîne d'hydrocarbone et la présence de double liaison, permettent de classifier les acides gras en plusieurs types. En fonction du nombre de carbone, on différencie les acides gras à courte chaîne (moins de 6 atomes de carbone), à chaîne moyenne (6 à 12 atomes de carbone), à longue chaîne (LCFA) (12 à 24 atomes de carbone), et finalement les acides gras à très longue chaîne comptant plus de 24 atomes de carbone (Turner, Cooney et al. 2014). Les acides gras à longue chaîne et très longue chaîne sont variables selon leur degré de saturation. Ce deuxième critère, correspondant à la présence et au nombre de doubles liaisons dans leur chaîne et permet de distinguer deux types d'acides gras:

1- Les acides gras saturés, ne comportent pas de double liaison dans la chaîne carbonée. Selon la longueur de leur chaîne de carbone, les acides gras saturés peuvent avoir des effets différents sur le niveau des lipides et des lipoprotéines membranaires. De plus, les acides gras saturés contenant 12 à 16 carbones tendent à augmenter les niveaux du cholestérol dans le sang (Hu, Manson et al. 2001). Le premier acide gras produit au cours de la lipogenèse est l'acide palmitique appelé aussi palmitate (16 carbones). Ce dernier est synthétisé à partir du malonyl-CoA produit via ACC sous l'action de la Fatty Acid Synthase (FAS).

2- Les acides gras insaturés, comprennent une ou plusieurs doubles liaisons. Dans cette catégorie, on retrouve les acides gras mono-insaturés (MUFA) dont la structure contient une seule double liaison comme l'acide oléique (C18:1) et les acides gras polyinsaturés (PUFA) contenant plus d'une double liaison (Turner, Cooney et al. 2014). Selon la position de la première double liaison à partir de la fonction méthyle de la chaîne d'acide gras, les PUFA sont divisés en deux familles: les n-6 dont on note principalement l'acide linoléique

Revue bibliographique

(AL), omega-6 ($\omega 6$), et la famille des n-3 avec notamment l'acide linoléique (ALA), omega-3 ($\omega 3$). Ces deux acides gras essentiels doivent être apportés dans l'alimentation afin de maintenir un métabolisme normal. L'acide linoléique produit principalement l'acide arachidonique (AA), alors que l'acide α -linoléique donne lieu principalement à l'acide eicosapentaénoïque (EPA), et à l'acide docosahexaénoïque (DHA) (Hussain, Schmitt et al. 2013).

Malgré cette classification simplifiée, les acides gras forment des complexes très variés leur permettant, de ce fait, d'exercer directement ou via leurs métabolites, des rôles et des effets très différents. Entre autre, on trouve, les glycérides constitués d'un résidu de glycérol et d'un, deux ou trois acides gras donnant naissance respectivement à des mono-di ou triglycérides. Les phospholipides, quant à eux, sont des constituants principaux de la membrane cellulaire (Shaikh, Kinnun et al. 2014). Cette famille englobe également les plasmalogènes, suggérés comme étant des antioxydants endogènes efficaces (Brosche and Platt 1998). Toujours au niveau des membranes plasmiques, on trouve un autre complexe lipidique qui est les sphingolipides, jouant un rôle important dans la transmission du signal et la reconnaissance des cellules (Ogretmen and Hannun 2004). L'hydrolyse des sphingolipides produit, entre autre, les céramides dont les niveaux des concentrations plasmatiques corrèlent avec la résistance à l'insuline chez les personnes obèse et diabétique (Haus, Kashyap et al. 2009).

De plus en plus d'évidences démontrent que des métabolites neuroactifs des acides gras, jouent un rôle important dans les fonctions cérébrales telles que le sommeil, la transmission et la plasticité synaptique, mais peuvent aussi être impliqués dans certains troubles neurologiques (Chen and Bazan 2005).

Dans une étude récente visant à évaluer les effets de la qualité et la quantité de plusieurs régimes riches en gras, des souris ont été nourries avec différentes concentrations et types d'acides gras. Ces différentes combinaisons, ont non seulement modifié le profil lipidique dans le cerveau, mais ont également modifié la mémoire spatiale ainsi que l'apprentissage chez ces animaux (Yu, Bi et al. 2010).

D'autre part, plusieurs PUFA peuvent être métabolisés pour produire d'autres composés ayant des fonctions biologiques importantes. Ainsi, l'AA et l'EPA sont convertis par la

phospholipase A2, la cyclo-oxygénase (COX) et la lipo-oxygénase (LOX) pour produire des métabolites tels que les Prostaglandines, les thromboxanes et les leucotriènes connus pour leur rôle pro inflammatoire (Lorente-Cebrian, Costa et al. 2013).

À son tour, le DHA est un précurseur de certains médiateurs lipidiques tels que les docosanoïdes, incluant les résolvines, les neuroprotectines et les marésines (Bazan 2007). En effet, la neuroprotectine D1 (NPD1), synthétisée de manière endogène par les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien, protège ces dernières de l'apoptose induite par le stress oxydatif. Ceci suggère qu'elle peut constituer une vraie cible pour améliorer la survie des photorécepteurs dans les maladies dégénératives rétiniennes (Mukherjee, Marcheselli et al. 2004). Les résolvines et les marésines, sont des métabolites à action anti-inflammatoire contrerégulant activement l'action des éicosanoïdes, médiateurs pro-inflammatoires (Serhan, Dalli et al. 2014).

C-3-1 Transport et métabolisme.

Le cerveau est capable de synthétiser seulement quelques acides gras non essentiels. Malgré cela, il est riche en divers types d'acides gras incluant les acides gras saturés, mono- et polyinsaturés. De ce fait, les acides gras essentiels et certains acides gras non essentiels doivent entrer dans le cerveau depuis le sang à travers la BHE (Dhopeshwarkar and Mead 1973). Les mécanismes impliqués dans le transport des acides gras à travers la BHE ne sont pas totalement élucidés. Néanmoins les jonctions serrées hautement complexes qui existent entre les cellules endothéliales de la BHE, limitent la diffusion paracellulaire et forcent le passage des molécules à travers la voie transcellulaire (Benarroch 2011). Par ailleurs, les acides gras circulants sont regroupés sous forme de micelles ou complexés à l'albumine, ces deux formes ne leur permettent pas de traverser la membrane plasmique (Mitchell and Hatch 2011). Ils doivent donc se dissocier et se retrouver sous forme d'acides gras libres pour pouvoir traverser la membrane et accéder au côté cytoplasmique, où ils seront métabolisés (Black and DiRusso 2003). D'autre part, les acides gras se trouvent aussi sous forme estérifiée en triglycérides (TAG) principalement dans les lipoprotéines, dont les taux sont régulés par la Lipoprotéine Lipase (LPL). Cette enzyme est responsable

Revue bibliographique

de l'hydrolyse des lipoprotéines riches en TAG au niveau périphérique (Wang and Eckel 2009). L'expression de l'ARNm de LPL ainsi que son activité enzymatique ont été détectées dans plusieurs régions cérébrales (Wang and Eckel 2012). De plus, chez les souris déficientes en LPL spécifiquement au niveau neuronal, les niveaux des PUFA diminuent significativement dans l'hypothalamus. Ces souris deviennent hyperphagiques et obèses, suggérant ainsi le rôle de LPL dans la détection centrale des acides gras (Wang, Astarita et al. 2011).

Par analogie avec ce qui a été décrit dans les tissus périphériques, deux mécanismes ont été proposés pour le transport des acides gras à travers la BHE, soit par diffusion passive ou par diffusion facilitée. Cependant, leurs contributions respectives ainsi que les mécanismes impliqués sont peu connus. En effet, le mécanisme de la diffusion passive, connu aussi sous le nom de flip-flop, à travers la membrane plasmique est utilisé préférentiellement par les acides gras à chaîne courte et moyenne qui traversent facilement la bicouche lipidique grâce à leur coefficient de perméabilité élevé. Les LCFA sont moins solubles, et présentent plus de difficultés à utiliser ce type de transport membranaire, aussi, la forme non-ionisée des acides gras se déplace à travers la membrane plus rapidement que la forme ionisée (Hamilton 1999, Hamilton and Brunaldi 2007).

La diffusion passive peut-être facilitée par la présence de transporteurs membranaires. Ce type de transport est plutôt spécifique aux LCFA (Abumrad, Park et al. 1984). Il est saturable en présence de faible ratio d'acide gras/ albumine et compatible avec le ratio physiologique (0,74 acide gras/ albumine) (Richieri and Kleinfeld 1995).

Les mécanismes responsables du passage des LCFA notamment les PUFA à travers la BHE, restent encore controversés, cependant deux modèles ont été proposés. Dans le premier modèle proposé par *Edmond et al*, les récepteurs aux lipoprotéines seraient responsables du transport des PUFA dans le cerveau. En effet, les lipoprotéines dans le sang vont être liés aux récepteurs existants sur la face luminale de la cellule endothéliale, le complexe va être transporté à l'intérieur de la cellule, et hydrolysé via la lipolyse pour libérer les acides gras. Ces derniers, vont être pris en charge par d'autres protéines de transports, telles que les FATP ou les MCT, qui vont leur permettre de traverser la membrane transluminale et

Revue bibliographique

atteindre le cerveau (Edmond 2001). Cependant, ce modèle comporte plusieurs étapes qui peuvent être ralenties, notamment la lipolyse des lipoprotéines, ce qui le rend incompatible avec le passage rapide des acides gras dans le cerveau, pour fournir à la cellule la quantité suffisante des LCFA (Mitchell and Hatch 2011).

Le deuxième modèle proposé par *Hamilton et al*, décrit que les acides gras se trouvant principalement dans le complexe acides gras/ albumine, diffusent d'une manière passive et sans présence de transporteur à travers la BHE. Selon ce modèle, les acides gras traversent la membrane luminale et transluminale des cellules endothéliales de la BHE ainsi que la membrane plasmique des cellules cérébrales par simple mécanisme de flip flop. Par la suite, l'enzyme Acyl CoA Synthétase prend en charge une partie des acides gras. Les acides gras estérifiés se trouvent donc piégés et ne peuvent plus sortir de la cellule. À cette étape, commence la sélectivité des acides gras par FATP qui manifeste une préférence pour certains acides gras. Une sélectivité qui continue en fonction des spécificités des enzymes impliquées dans les voies métaboliques (Hamilton and Brunaldi 2007). Cependant, il a été montré *in vivo*, que les PUFA non estérifiés liés à l'albumine peuvent également utiliser des transporteurs actifs tels que la translocase d'acide gras, CD36, pour pénétrer dans le cerveau (Hamilton and Brunaldi 2007). Par ailleurs, il a été démontré que les n3-PUFA, en l'occurrence, le DHA et l'EPA, possèdent une grande capacité à traverser la BHE sans être saturés. En effet, l'augmentation de la concentration des deux acides gras polyinsaturés ne modifie pas leur diffusion à traverser la BHE pendant le temps de leur perfusion. Cependant, leur passage à travers la BHE peut être affecté par l'exposition chronique à une diète riche en DHA (Ouellet, Emond et al. 2009).

Dans une nouvelle étude, il a été montré que bien que les taux d'EPA et de DHA qui accèdent au cerveau soient relativement similaires, une large différence a été observée concernant leurs concentrations cérébrales, suggérant ainsi, l'existence de différence dans leur métabolisme incluant leur bêta oxydation (Chen and Bazinet 2014).

Dans le cadre des connaissances actuelles, la manière avec laquelle les acides gras traversent la BHE, reste encore débattue et pas totalement élucidée. D'autres études seront nécessaires afin d'établir un modèle exact de transport de ces molécules dans le cerveau.

Revue bibliographique

Par ailleurs, les transporteurs d'acides gras comptent quatre familles de protéines dont la famille des FATPs (Fatty Acids Transport Proteins), des FABPs (Fatty Acid Binding Proteins), des FAT/CD36 (Fatty Acid Translocase/CD36) et enfin des caveolin-1. Contrairement aux tissus périphériques où ces transporteurs ont été largement étudiés, leur contribution dans le cerveau est mal connue, notamment les cavéolins, dont l'implication cérébrale n'est pas encore établit. Dans la section qui suit, je vais présenter brièvement quelques caractéristiques décrites de ces transporteurs dans le cerveau.

C-3-1-a FATPs (Fatty Acids Transport Proteins)

Les FATPs, sont des protéines de 71kDa, situées sur la membrane plasmique ainsi que sur certaines membranes intracellulaires (Schaffer and Lodish 1994). Elles ont la spécificité de lier les LCFA sans avoir de préférence envers la saturation de ces derniers, tel qu'il a été démontré pour le palmitate et l'oléate, liés de la même façon par FATP-4 au niveau de l'intestin (Stahl, Hirsch et al. 1999). Certains FATPs, en outre, FATP-1 et FATP-4 ont été identifiés comme des protéines bifonctionnelles, assurant à la fois le transport des acides gras à longue chaîne dans les cellules et leur estérification en acyl-CoAs (LC acyl-CoA) (Coe, Smith et al. 1999) (Herrmann, Buchkremer et al. 2001). On compte six isoformes appartenant à la famille de FATP 1-6, leur expression est relativement tissu spécifique. Les deux isoformes prédominantes au sein du cerveau sont FATP-1 et FATP-4 (Fitscher, Riedel et al. 1998).

FATP-1, facilite la circulation des acides gras dans les cellules et leur métabolisme. Des études *in vitro* réalisées sur les cellules 293 (dérivées originellement de rein embryonnaire humain), montrent que la surexpression de FATP-1 augmente la vitesse d'afflux des acides gras et la synthèse des TAG (Hatch, Smith et al. 2002). D'autre part, des cultures primaires de cellules endothéliales de la BHE montrent que la baisse d'activité de FATP-1 induit une réduction du transport de l'oléate à travers la monocouche des cellules de la BHE (Mitchell, Edmundson et al. 2009). Toujours sur le même modèle cellulaire, l'inactivation du gène de CD36 induit une réduction dans le transport à la fois des acides gras à chaîne courte, moyenne et longue, saturés et insaturés, tandis que l'inactivation du gène FATP-1 et FATP-4 réduit plus spécifiquement le transport des LCFA, tels que l'oléate et l'acide linoléique,

(Mitchell, On et al. 2011). Ces résultats *in vitro* suggèrent que FATP-1 et FATP-4 pourraient avoir un rôle sélectif dans le transport des acide gras à longue chaîne à travers la BHE (Mitchell, On et al. 2011).

C-3-1-b FAT/CD36

FAT/CD36, appelé initialement translocase des acides gras (FAT), est une glycoprotéine membranaire de 88kD identifiée et isolée grâce à son inhibition réversible de l'absorption d'acide gras par le sulfo-succinate acide oléique (SSO). La distribution de FAT/CD36 est fortement dépendante de l'activité métabolique tissulaire pour les LCFA. Par exemple, CD36 est fortement exprimée au sein du tissu adipeux, des muscles et des intestins, alors que son expression est faible dans le foie (Abumrad, el-Maghrabi et al. 1993). Au sein du cerveau, CD36 est fortement exprimée dans les cellules endothéliales des microvaisseaux. Son expression a été aussi rapportée dans des cultures microgliales néonatales murines et humaines (Husemann, Loike et al. 2002). De plus, à l'aide de technique d'immunocoloration très sensible, *Coraci et al* ont identifié l'expression microgliale de CD36 dans le cerveau adulte humain (Coraci, Husemann et al. 2002). *Levin et al* ont montré que certains groupes de neurones dans l'hypothalamus étaient capables d'augmenter ou de diminuer leur activité en réponse à l'acide oléique. L'inhibition de CD36 par SSO réduit l'effet de l'oléate de 45% (Le Foll, Irani et al. 2009). De plus, les souris déficientes pour CD36 montrent une diminution des niveaux des acides gras mono-insaturés dans plusieurs lots de phospholipides au niveau cérébral (Song, Elbert et al. 2010). Ainsi, l'ensemble de ces données suggèrent l'implication de CD36 dans le transport et potentiellement la détection centrale des acides gras.

C-3-1-c FABPs (Fatty Acid Binding Proteins)

La présence des FABPs dans le cerveau a été mise en évidence par *Bass et al* (Bass, Raghupathy et al. 1984). On compte deux familles de protéines FABPs possédants différentes localisations à l'intérieur du compartiment cellulaire. Le FABPpm est une protéine de 40 kDa, associée à la membrane plasmique, son mécanisme d'action est inconnu. Cependant, il a été proposé que son rôle est de lier les acides gras libres et de les transférer aux FATPs (Dutta-Roy 2000). La deuxième famille des FABPs est composée de

Revue bibliographique

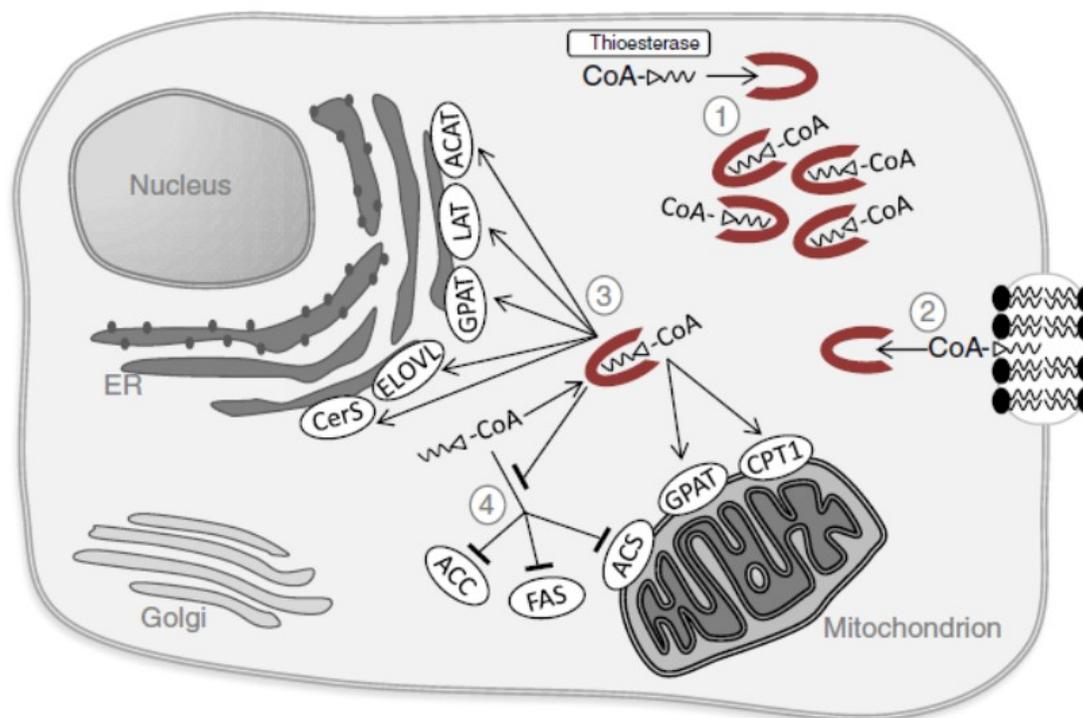
plusieurs petites protéines cytosoliques, de 14 à 15 kDa (Mitchell and Hatch 2011). Parmi les 10 membres de cette famille, trois d'entre eux, se sont révélés impliqués dans l'élaboration et la fonction du cerveau adulte : FABP-3, FABP-5 et FABP-7.

FABP-3, est exprimé durant la phase tardive du développement cérébral, suggérant son rôle dans la formation des neurites et la maturation des synapses. Il semble également soutenir la fonction des neurones dans le cerveau adulte (Sellner, Chu et al. 1995, Owada, Yoshimoto et al. 1996).

FABP-5, est une isoforme essentiellement exprimée dans les neurones avant et après la naissance suggérant un rôle dans la différenciation neuronale (Liu, Almaguel et al. 2008). La délétion de FABP-5 chez des souris ne montre pas de phénotype particulier, ce qui laisse penser que d'autres formes de FABPs rentrent en jeu pour compenser son absence (Owada, Suzuki et al. 2002).

FABP-7, est exprimé dans les cellules gliales radiales et les astrocytes particulièrement au niveau du cortex cérébral et de l'hippocampe adulte (Schmid, Yokota et al. 2006). Les souris déficientes pour FABP-7 montrent une diminution du nombre des astrocytes, des cellules souches neurales, et des cellules progénitrices précoces, ce qui suggère que FABP-7 joue un rôle important dans la neurogenèse (Watanabe, Toyota et al. 2007).

D'autre part, il a été montré *in vitro* que FABP-7 lie préférentiellement les acides gras polyinsaturés, tel que le DHA. Il lie également l'acide arachidonique mais avec une plus faible affinité. L'analyse thermodynamique et structurale du FABP-7 montre que cette préférence est due à une différence de conformation structurale lors de la formation du complexe protéine-ligand. Ces données suggèrent que la présence ou l'absence des ligands tels que les acides gras, est un facteur déterminant de la fonction de FABP-7 dans les astrocytes (Balendiran, Schnutgen et al. 2000).



Source: (Molecular and cell biology of lipids-2014)

Figure 8: Fonctions proposées d'ACBP.

Sur la base des études *in vitro*, plusieurs fonctions ont été proposées pour ACBP (illustrées en rouge), à savoir, la protection des acyl-CoAs de l'hydrolyse (1), l'extraction des acyl-CoAs à partir des membranes (2), présentation des acyl-CoAs aux phospholipides, glycérolipides et cholestérol, la synthèse de céramide, la β -oxydation ainsi que l'élongation des acides gras (3), et finalement la protection des enzymes FAS, ACC et ACS de l'inhibition effectuée par les acyl-CoAs (4). Abréviations: ACAT, l'acyl-CoA: cholestérol acyltransférase; ACC, l'acyl-CoA carboxylase; ACS, l'acyl-CoA synthétase; Cers, céramide synthase; CPT-1, carnitine palmitoyltransférase 1; ELOVL, l'élongation des acides gras à chaîne très longue; FAS, la synthèse des acides gras; GPAT, le glycérol-3-phosphat-acyltransférase; LAT, acyltransférase lysophosphatidique.

Revue bibliographique

Globalement, le métabolisme intracellulaire des acides gras semble jouer un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie énergétique (Wakil and Abu-Elheiga 2009).

Au niveau périphérique, les LCFA rentrent dans la composition des membranes biologiques mais se comportent aussi comme substrats métaboliques. Ainsi, les acyl-CoAs intracellulaires modulent de nombreuses fonctions cellulaires incluant la régulation d'activité enzymatique, la transcription des gènes, le trafic de vésicules intracellulaires et les processus d'acylation des protéines (Nolan, Madiraju et al. 2006). De plus, les LC-acyl-CoAs sont des ligands endogènes des récepteurs nucléaires qui contrôlent la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose et des lipides tels que PPAR α et HNF4 (Nakamura, Yudell et al. 2014).

Au niveau central, de nombreuses études s'accordent à suggérer que les effets centraux des acides gras sur la balance énergétique impliquent leur signalisation et métabolisme intracellulaire, notamment les niveaux intracellulaires des acyl-CoAs (Clement, Cruciani-Guglielmacci et al. 2002) (Tu, Thupari et al. 2005) (Aja, Landree et al. 2008) (Proulx, Cota et al. 2008). Ainsi, le taux et le métabolisme intracellulaire des acides gras sont étroitement régulés, notamment par des protéines de liaison intracellulaire aux acyl-CoAs. Celles-ci permettent de créer un pool d'acyl-CoAs en les protégeant de l'hydrolyse par les acyl-CoA hydrolases. Parmi les protéines liant les acyl-CoAs intracellulaires, on note les protéines de liaison aux acides gras dans le foie (L-FABP), les stérols protéines porteuses 2 (SCP2) et la protéine de liaison aux acyl-CoA (ACBP), trouvée dans le cytoplasme de la cellule au niveau périphérique. Cette dernière est considérée comme la principale protéine intracellulaire liant les acyl-CoAs (Faergeman and Knudsen 1997).

C-3-1-d Acyl-CoA Binding Protein (ACBP)

C-3-1-d-i Expression et rôle d'ACBP

ACBP est une protéine de 10 kDa qui lie les acyl-CoAs intracellulaires avec une grande spécificité et affinité de manière non covalente et réversible (Faergeman and Knudsen 1997). ACBP a été initialement identifiée dans le cerveau de rat en 1983 sous le nom de DBI (diazépam-binding inhibitor), en tant que modulateur négatif des récepteurs GABA, mimant ainsi les effets des endozepines endogènes (Costa, Corda et al. 1983), puis potentiellement en tant que neurotransmetteur (Alho, Costa et al. 1985). Le clivage protéolytique d'ACBP, conduit à la génération de deux peptides majeurs biologiquement actifs dont le peptide octadecaneuropeptide (ODN) et triakontatetranuropeptide (TTN) (Costa and Guidotti 1991).

Globalement, un grand nombre d'études confirme la présence d'ACBP dans presque tous les tissus qui ont été étudiés avec un niveau élevé dans les tissus où le métabolisme des lipides est très actif, tels que le tissu adipeux et le foie (Faergeman, Wadum et al. 2007). La surexpression d'ACBP dans le foie de souris entraîne une augmentation de l'estérification de LCFA-CoA en TAG et phospholipides (Huang, Atshaves et al. 2005). Inversement les souris déficientes pour ACBP affichent un phénotype caractérisé par une peau visible et des poils gras accompagnés du développement d'alopécie s'accroissant avec l'âge, ainsi qu'une altération de leur barrière épidermique, due à des modifications de la composition lipidique au niveau de la peau (Bloksgaard, Bek et al. 2012).

Grâce aux études de fractionnement subcellulaire et de microscopie électronique, ACBP a été localisée au niveau cytosolique avec accès au compartiment nucléaire. Sa distribution cytosolique peut être associée à des protéines, des vésicules cytoplasmiques, et des vésicules synaptiques (Faergeman, Wadum et al. 2007). Cependant, on ignore si c'est ACBP, la protéine entière, qui occupe ces différentes localisations, ou via ses deux peptides générés par son clivage protéolytique.

D'autre part, sur la base des études *in vitro*, plusieurs rôles ont été attribués à la protéine ACBP. En outre, elle protège les acyl-CoAs de l'hydrolyse, permettant ainsi le maintien d'une réserve intracellulaire de ces derniers. ACBP est aussi impliquée dans la régulation

Revue bibliographique

du transport des acyl-CoAs et de leur métabolisme. Ainsi elle est capable d'extraire les acyl-CoAs de la membrane plasmique pour les délivrer à l'enzyme carnitine palmitoyl-transférase (CPT-1), afin de faciliter leur oxydation au niveau mitochondrial (Cohen Simonsen, Bernchou Jensen et al. 2003). Elle assure aussi le transport des acyl CoAs vers des organites tels que les microsomes pour la synthèse des esters de cholestérol (Figure 8) (Bloksgaard, Neess et al. 2014). Par ailleurs, il a été montré que l'administration IV ou l'ajout d'ACBP dans le milieu d'incubation, supprime la sécrétion d'insuline à partir de la cellule bêta pancréatique (Ostenson, Ahren et al. 1994).

Dans le cerveau, l'expression d'ACBP diffère en fonction des régions cérébrales, son taux le plus élevé a été notamment noté dans l'ARC de l'hypothalamus, (Costa and Guidotti 1991, Faergeman, Wadum et al. 2007).

Au niveau cellulaire, ACBP est exprimée d'une manière importante dans les cellules gliales plus spécifiquement les astrocytes, et d'une manière moins importante dans les neurones (Tonon, Desy et al. 1990) (Katsura, Ohkuma et al. 1995) (Loomis, Behrens et al. 2010).

D'une façon intéressante, il a été montré que l'administration ICV d'ODN induit un puissant effet anorexigène, augmente l'expression de l'ARNm de POMC et diminue l'expression d'ARNm de NPY dans l'ARC, suggérant ainsi qu'ACBP exerce un effet anorexigène en modulant l'expression des neuropeptides contrôlant la prise alimentaire (Compere, Li et al. 2003). Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels ODN module la prise alimentaire restent inconnus.

Bien que la co-localisation d'ACBP et de FABP a été observée dans des cellules gliales, suggérant son implication dans le métabolisme énergétique des astrocytes (Yanase, Shimizu et al. 2002), le rôle d'ACBP dans le métabolisme cérébral intracellulaire des acides gras n'a pas été étudié.

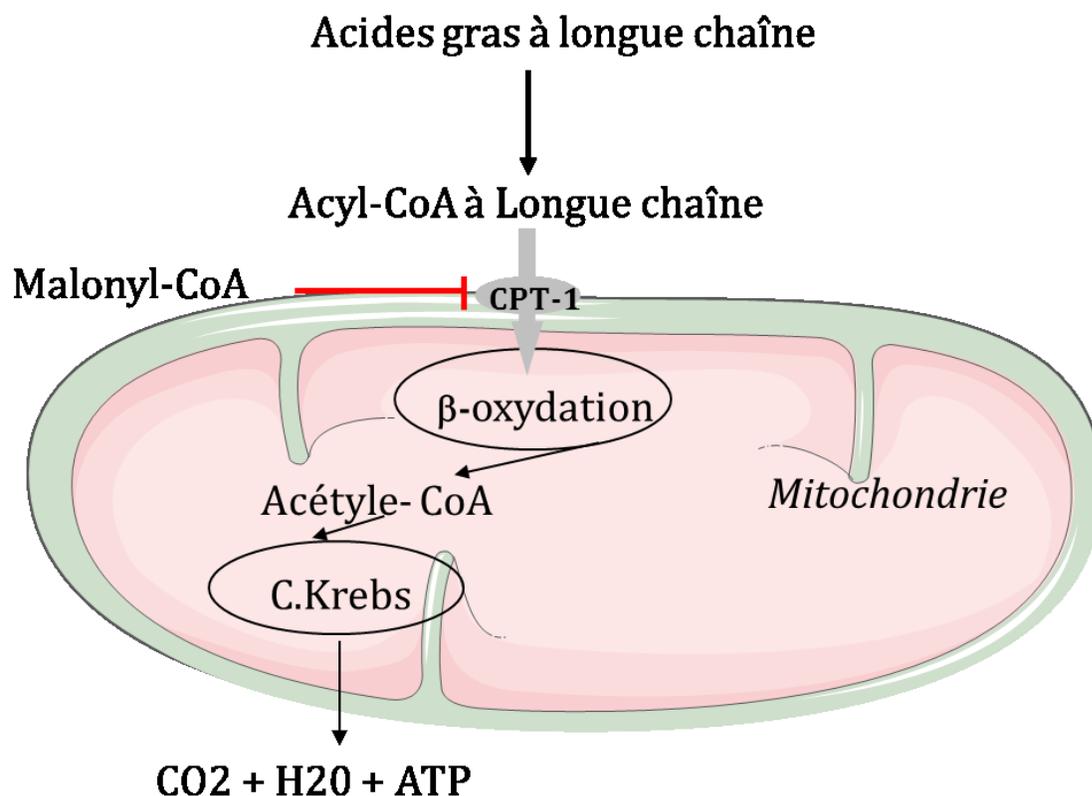


Figure 9: Représentation schématique de la voie de l'oxydation mitochondriale (β oxydation) des acides gras à longue chaîne.

Le malonyl-CoA produit par l'Acétyl-Coa Carboxylase (ACC) à partir de l'acétyl-CoA (généré par le métabolisme du glucose) est un inhibiteur allostérique de CPT-1, enzyme localisée au niveau de la membrane externe de la mitochondrie et responsable du transport des acyl-CoA dans la mitochondrie afin d'être oxydés.

Dans la mitochondrie les acyl-CoA vont subir l'oxydation pour produire de l'acétyl-CoA qui à son tour sera métabolisé via le cycle de Krebs pour produire l'énergie nécessaire.

C-3-1-d-ii Oxydation mitochondriale des acides gras ou β -oxydation

L'oxydation mitochondriale des acides gras ou β -oxydation est un mécanisme clé dans le maintien de l'homéostasie énergétique. Son importance chez les humains est illustrée par l'existence d'un groupe de maladies causées par une déficience dans la β -oxydation (Tein 2013). Bien que les acides gras peuvent également subir l' α - et l' ω -oxydation, leur contribution en terme de production d'énergie chez l'homme ne semble pas être significative (Wanders, Jansen et al. 2003). La β -oxydation fournit jusqu'à 80% d'énergie pour le cœur, le foie et le muscle squelettique à tout moment et représente une réponse physiologique des tissus en cas d'épuisement d'énergie (Eaton, Bartlett et al. 1996). Il est bien établi que l'oxydation de la majeure partie des acides gras qui proviennent de l'alimentation, notamment, l'acide palmitique, l'acide oléique, et l'acide linoléique est mitochondriale. Toutefois, le peroxyosome, joue un rôle aussi indispensable au niveau de l'oxydation des acides gras. Il catalyse l'oxydation d'une autre classe d'acides gras qui n'est pas traitée par les mitochondries, incluant les acides gras à très longue chaîne, l'acide biliaire intermédiaire ainsi que d'autres acides gras (Wanders and Waterham 2006).

Les acides gras oxydés au niveau de la mitochondrie, proviennent de différentes sources incluant l'alimentation, la synthèse de novo, et la libération par le tissu adipeux via la lipolyse, conduisant à la production des acides gras libres. Ces derniers, vont servir de substrats énergétiques et permettent la synthèse de corps cétoniques au niveau hépatique (3-hydroxybutyrate et acétoacétate), qui seront utilisés comme source d'énergie alternative en particulier pour le cerveau (Fukao 2003).

Le processus de β -oxydation lui-même, implique l'action d'une variété d'enzymes et de protéines présentes dans la mitochondrie. (Wanders, Ruiten et al. 2010). Parmi les enzymes clés impliquées dans le contrôle de la β -oxydation, on trouve l'enzyme CPT-1. Cette dernière est localisée sur la face externe de la membrane externe mitochondriale, et est essentielle pour le transport des LC-acyl-CoAs à l'intérieur de la mitochondrie (Figure 9). En effet, Elle catalyse la trans-esterification des acyl-CoA et des carnitines libres en acyl-L-carnitine, et le complexe est transloqué par la suite vers l'intérieur de la mitochondrie à l'aide de l'enzyme Carnitine Acyl-L-Carnitine Translocase (CACT) (Kerner and Hoppel

2000). La dégradation de l'acyl-CoA par l'intermédiaire de l'hélice de Lynen produit l'acétyl-CoA, qui est soit converti en corps cétoniques ou oxydé dans le cycle TCA pour produire du CO₂, H₂O et de l'ATP (Wanders, Ruiter et al. 2010).

En périphérie, CPT-1, notamment les isoformes musculaire CPT-1b et hépatique CPT-1a, sont régulées allostériquement par le malonyl-CoA produit à partir du métabolisme du glucose. Au niveau du cerveau, on trouve CPT-1a et l'isoforme cérébrale CPT-1c (Wolfgang, Cha et al. 2008). Des études d'immunohistochimie ont révélé un enrichissement de l'expression de CPT-1c particulièrement dans l'hypothalamus incluant le PVN, le VMH et l'ARC, ainsi qu'au niveau de l'amygdale, et l'hippocampe avec une localisation particulière dans les neurones (Price, van der Leij et al. 2002) (Dai, Wolfgang et al. 2007). À l'inverse de CPT-1a, la fonction biochimique de CPT-1c n'est pas encore bien établie. En effet, des études initiales avaient conclu que CPT-1c était dépourvue de son activité d'acyltransférase, cependant, les souris déficientes pour CPT-1c montraient une diminution du taux d'oxydation des acides gras, (Price, van der Leij et al. 2002) (Wolfgang, Kurama et al. 2006). Plus tard, il a été montré que CPT-1c possède une faible activité palmitoyl-CoA transférase dans les neurones, particulièrement au niveau du réticulum endoplasmique (Sierra, Gratacos et al. 2008). Récemment des études ont montré que CPT-1c favorise la biosynthèse de céramide dans l'hypothalamus (Ramirez, Martins et al. 2013). Bien que l'ensemble de ces études s'accordent et consolident l'idée que l'isoforme cérébrale CPT-1c n'est pas impliquée dans l'oxydation des LCFA, on ne sait pas quelle forme de CPT-1 est réellement impliquée dans la régulation de la β -oxydation cérébrale.

C-3-1-d-iii ACBP et β -oxydation des acides gras

Plusieurs éléments suggèrent l'implication d'ACBP dans l'oxydation mitochondriale des acides gras, il a été notamment montré qu'ACBP avait un effet protecteur pour ACC contre l'inhibition par les LC-acyl-CoA en se liant à ces derniers avec un ratio d'Acyl-CoA/ACBP <0,9 (Rasmussen, Faergeman et al. 1994). Des études de biochimie ont suggéré qu'outre les acyl-CoAs libres, le complexe ACBP-acyl-CoA représente le substrat préférentiel de la protéine CPT-1. En effet, l'activité de l'enzyme CPT-1 corrélait avec la concentration du complexe ACBP-acyl-CoA et non pas le taux des acyl-CoAs libres (Abo-Hashema, Cake et

al. 2001). Des données récentes obtenues chez le ver *C. elegans* dépourvu d'ACBP, montrent une diminution importante de la β -oxydation des acides gras insaturés (Elle, Simonsen et al. 2011). Des études sur les souris déficientes pour ACBP, montrent une réduction des taux des acyl-CoAs hépatiques et une altération du programme transcriptionnel de la lipogenèse, induisant un retard d'adaptation métabolique au moment du sevrage (Neess, Bloksgaard et al. 2011). Ainsi, ces données supportent un rôle clé d'ACBP dans le métabolisme intracellulaire des LCFA et LC-acyl-CoA. Cependant, le rôle d'ACBP dans le métabolisme central des acides gras n'a jamais été étudié.

C-3-2-Détection et effets centraux

Dès 1975, *Oomura et al*, démontraient que les acides gras activaient des neurones du LH au niveau hypothalamique, suggérant leur rôle en tant que molécules de signalisation cellulaire (Oomura, Nakamura et al. 1975). À ce jour, malgré le fait que de nombreuses études ont établi les effets centraux des acides gras sur la prise alimentaire et l'homéostasie glucidique, les mécanismes impliqués dans la détection cérébrale des acides gras, en général, sont encore mal connus. En effet, il a été montré d'une part, grâce à des colorations d'immunohistochimie pour le marqueur d'activation neuronal c-Fos, qu'une perfusion centrale de lipides active les neurones situés dans le LH et inhibe ceux présents au niveau du MBH (Cruciani-Guglielmacci, Hervalet et al. 2004). De plus, le marquage de coupes de cerveaux de rats ayant reçu par gavage intra-gastrique une solution d'intralipides, montre une forte induction de l'expression de c-Fos dans le NTS et l'hypothalamus incluant le PVN, l'ARC et le VMH (Lo, Ma et al. 2007). D'autre part, les acides gras sont connus en périphérie pour réguler la conductance de plusieurs canaux ioniques incluant les ions Cl^- , GABA A, K^+ , Ca^{2+} et K_{ATP} potassiques ATP dépendants, ainsi que la pompe $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ (Jordan, Konner et al. 2010), suggérant que des effets similaires au niveau central pourraient être impliqués dans la modulation de l'activité neuronale.

Par ailleurs, *Obici et al* démontraient que l'injection ICV d'acide oléique chez le rat ou l'inhibition hypothalamique de l'activité de CPT-1 étaient suffisantes pour provoquer une diminution de la production hépatique du glucose et de la prise alimentaire. Ces données suggèrent ainsi qu'une légère variation de la concentration plasmatique des acides gras

Revue bibliographique

libres, ainsi que des changements dans le taux d'oxydation des acides gras dans les neurones hypothalamiques, pouvaient être détectés par le système nerveux central (Obici, Feng et al. 2002) (Obici, Feng et al. 2003). L'effet central de l'acide oléique sur le métabolisme hépatique est réversible par l'inhibition pharmacologique ou génétique des canaux K_{ATP} (Pocai, Lam et al. 2005). Par ailleurs, il a été montré que l'acide oléique stimule les neurones POMC via l'inhibition des canaux K_{ATP} . Cet effet est perdu suite à l'inhibition pharmacologique de CPT-1, suggérant ainsi que les effets anorexigènes de l'oléate au sein des neurones POMC impliquent la β -oxydation (Jo, Su et al. 2009). Inversement, il a été montré récemment que l'inhibition hypothalamique de la β -oxydation via l'inhibition de l'enzyme CPT-1 par l'étomoxir, induit un effet transitoire sur l'inhibition de la prise alimentaire, et par conséquent ne semble pas être nécessaire pour la régulation de la prise alimentaire par les acides gras (Mouille, Le Foll et al. 2013).

L'explication éventuelle de ces résultats inverses pourrait, entre autre, être liée au manque de spécificité cellulaire des outils pharmacologiques tel que l'étomoxir. Seule une mesure directe de la β -oxydation dans ces neurones hypothalamiques pourrait expliquer ces contradictions.

Bien que le métabolisme intracellulaire des acides gras et l'activation des canaux K_{ATP} semblent être nécessaires aux effets centraux des acides gras, une partie de leur réponse dans les neurones du VMH est médiée par l'interaction avec la protéine (FAT)/ CD36. En effet, outre le rôle rapporté de CD36 dans la détection centrale des acides gras (Le Foll, Irani et al. 2009), des travaux récents de *Magnan et al* démontrent que la perfusion à courte durée des intralipides au niveau cérébral par l'intermédiaire de l'artère carotidien diminue la prise alimentaire au cours de la période prandiale chez le rat. L'inhibition de CD36 via des ARN interférents dans les noyaux du VMH, prévient l'effet de la perfusion des intralipides sur la prise alimentaire (Mouille, Le Foll et al. 2013).

Une des questions les plus pertinentes et qui présente une limitation des études *in vivo*, est de savoir dans quel type cellulaire les acides gras agissent. Afin de répondre à cette question, des mesures de l'activité des neurones en réponse aux acides gras ont été réalisées, en utilisant la technique du patch clamp sur des sections de cerveaux de rats en présence de 2,5 mM de glucose dans le cerveau. Ainsi, il a été mis en évidence que l'acide oléique active 13% des neurones de l'ARC et en inhibe 6%. En présence de faible

concentration de glucose (0,1mM), l'acide oléique inhibe 30% des neurones de l'ARC, ces derniers ne faisaient pas partie de ceux qui ont été excités en présence de 2,5mM de glucose. Ceci démontre que l'effet des acides gras sur différentes populations de neurones est dépendant de la concentration du glucose (Wang, Cruciani-Guglielmacci et al. 2006). Cependant, la nature des neurones répondant aux acides gras est essentiellement inconnue.

V- Métabolisme des acides gras et le contrôle hypothalamique de l'homéostasie énergétique:

De plus en plus d'évidences soutiennent le rôle du métabolisme central des acides gras dans le contrôle central de l'homéostasie énergétique. Il a été notamment montré que les enzymes impliquées dans le métabolisme des acides gras, telles que ACC, FAS, MCD, et CPT-1, sont exprimées dans différents noyaux hypothalamiques, incluant l'ARC, le VMH, et le DMH (Sorensen, Travers et al. 2002). De plus, des études de double marquage ont montré la co-localisation entre la FAS et les neurones NPY/AGRP de l'ARC (Kim, Miller et al. 2002). L'administration ICV des agents pharmacologiques C75 et cérulénine, inhibiteurs de FAS, provoquait une réduction de la prise alimentaire, de l'expression du NPY, et une diminution significative du poids corporel (Loftus, Jaworsky et al. 2000), ainsi qu'une diminution de l'expression des neuropeptides POMC et de leurs récepteurs au niveau hypothalamique (Shimokawa, Kumar et al. 2002).

L'ensemble de ces études, a permis d'établir un lien entre la synthèse des acides gras dans le système nerveux central et le comportement alimentaire.

Afin de mieux élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets centraux des acides gras, des études ciblant les intermédiaires métaboliques, ainsi que les enzymes impliquées dans le métabolisme des acides gras, ont été réalisées. En outre, il a été montré que l'administration ICV de C75 à des souris à jeûne supprime la prise alimentaire et augmente rapidement le taux hypothalamique de malonyl-CoA (Hu, Cha et al. 2003). L'inhibition d'ACC via des outils pharmacologiques prévient cet effet (Hu, Dai et al. 2005). De plus, la surexpression de l'enzyme MCD via un vecteur au niveau du VMH, réduit les taux du malonyl-CoA, et restaure les effets de l'inhibition de la FAS (Hu, Dai et al. 2005). Les changements des niveaux hypothalamiques de malonyl-CoA corrélaient avec les effets de

Revue bibliographique

C75 sur l'expression des neuropeptides suggérant ainsi que le malonyl-CoA, est à la fois un indicateur du statut énergétique, et un médiateur du comportement alimentaire (Hu, Cha et al. 2003).

Malgré l'ensemble des corrélations observées, les mécanismes moléculaires sous-jacents aux effets anorexigènes dus à l'inhibition de la FAS ne sont pas complètement compris. De plus, on ne sait pas comment les changements des taux hypothalamiques du malonyl-CoA sont liés aux changements de l'expression des neuropeptides. Plus important, on ignore si le malonyl-CoA exerce son effet directement ou indirectement via l'inhibition de l'enzyme CPT-1, et par conséquent, l'accumulation hypothalamique des LC acyl-CoAs.

Dans ce contexte, il a été montré que l'administration ICV de l'acide oléique diminue la prise alimentaire et supprime la production endogène du glucose (Obici, Feng et al. 2002). Les mêmes effets sont obtenus suite à l'inhibition hypothalamique de CPT-1 (Obici, Feng et al. 2003). Ces effets centraux métaboliques et anorexigènes des acides gras sont affectés après 3 jours de régime riche en gras (Morgan, Obici et al. 2004). De plus, une combinaison à la fois de la perfusion de lipides au niveau systémique et de l'administration au niveau central de la Triacsine C, inhibiteur pharmacologique de l'enzyme acyl-CoA synthétase (ACS), impliquée dans l'estérification des acides gras en acyl-CoA, conduit à une augmentation de la production hépatique du glucose (Lam, Pociu et al. 2005). Toujours sous un régime riche en gras, l'inhibition de l'activité CPT-1a, était capable de normaliser les niveaux hypothalamiques des LC acyl-CoAs et inhiber la prise alimentaire, ainsi que la production hépatique du glucose (Pociu, Lam et al. 2006). Ainsi, ces résultats permettent de conclure qu'un défaut dans la détection hypothalamique des LC-acyl-CoAs cytosoliques, perturbe l'homéostasie glucidique, et que l'inhibition centrale de l'oxydation des acides gras, est suffisante pour restaurer les mécanismes de détection au niveau de l'hypothalamus.

Cependant, une étude récente, vient contredire les effets observés jusqu'à maintenant de CPT-1, en démontrant que la stimulation pharmacologique de cette dernière, diminue la prise alimentaire et le poids corporel (Aja, Landree et al. 2008). Une fois de plus, nous sommes en présence de résultats inverses aux résultats décrits précédemment. Cette discordance est possiblement due aux outils pharmacologiques et moléculaires utilisés

dans les différentes études pour moduler les niveaux des différents métabolites ainsi que le manque de spécificité concernant le type cellulaire ciblé par ces manipulations.

D'autre part, il a été montré *in vitro* que le traitement de cultures primaires de neurones avec l'inhibiteur de FAS, le C75, augmente l'activité de CPT-1 et réduit celle de l'AMPK (Landree, Hanlon et al. 2004). *In vivo*, alors que l'administration ICV de C75 réduit les niveaux de phosphorylation de l'AMPK dans l'ARC, l'administration de l'AICAR restaure les niveaux hypothalamiques de la phosphorylation de l'AMPK ainsi que l'anorexie induite par C75. De plus, l'AICAR diminue rapidement les concentrations hypothalamiques de malonyl-CoA (Kim, Miller et al. 2004) (Hu, Dai et al. 2005).

De même, il a été suggéré que les fluctuations hypothalamiques du taux du malonyl-CoA entre les différents statuts nutritionnels induisent des changements dans l'état de phosphorylation et d'activité de l'enzyme ACC gouvernée elle-même par les changements de l'état de phosphorylation et d'activité de l'AMPK (Kahn, Alquier et al. 2005). Bien que l'ensemble de ces études nous laisse suggérer que le réseau de signalisation hypothalamique AMPK / ACC / malonyl-CoA, joue un rôle clé dans le contrôle central de l'homéostasie énergétique et que cela pourrait impliquer un couplage entre le métabolisme des acides gras et celui du glucose (figure 10), cela n'a jamais été encore démontré.

De plus, les mécanismes impliqués en aval du malonyl-CoA, ne sont pas encore bien élucidés. Ainsi, nous ignorons si le glucose affecte la partition des LCFA-CoA entre l'oxydation et l'estérification dans l'hypothalamus, et si ce processus dépend de l'AMPK. Une mesure directe de l'oxydation et l'estérification des LC acyl-CoAs dans le MBH serait donc le moyen le plus efficace pour déterminer si la régulation du réseau de signalisation AMPK /ACC /malonyl-CoA par le glucose affecte l'oxydation et/ou le taux d'estérification des LC acyl-CoA.

L'importance de la question abordée dans notre étude relève du fait que d'une part, en situation physiologique postprandiale ou en situation pathologique telle que le diabète de type II, les cellules cérébrales sont simultanément exposées à des concentrations élevées de glucose et des acides gras (Prentki and Nolan 2006). De plus, la plupart des études mesurant les taux du malonyl-CoA et des LC acyl-CoAs sur l'ensemble de l'hypothalamus ou des lysats de noyaux, ne permettent pas de différencier la contribution de différents types de cellules dans le métabolisme des LC acyl-CoAs. En conséquence, il est difficile de savoir

Revue bibliographique

si la régulation du métabolisme des LC acyl-CoAs par le glucose se passe dans les neurones et/ ou dans les cellules gliales hypothalamiques, notamment les astrocytes.

Cette question est pertinente car de plus en plus d'études suggèrent que les astrocytes hypothalamiques jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme du glucose et des lipides, et par conséquent de l'homéostasie énergétique (Yi, Habegger et al. 2011). Éclaircir les mécanismes impliqués dans cette régulation permettra potentiellement d'explorer de nouvelles approches pour le traitement de maladies métaboliques telles que l'obésité et le diabète.

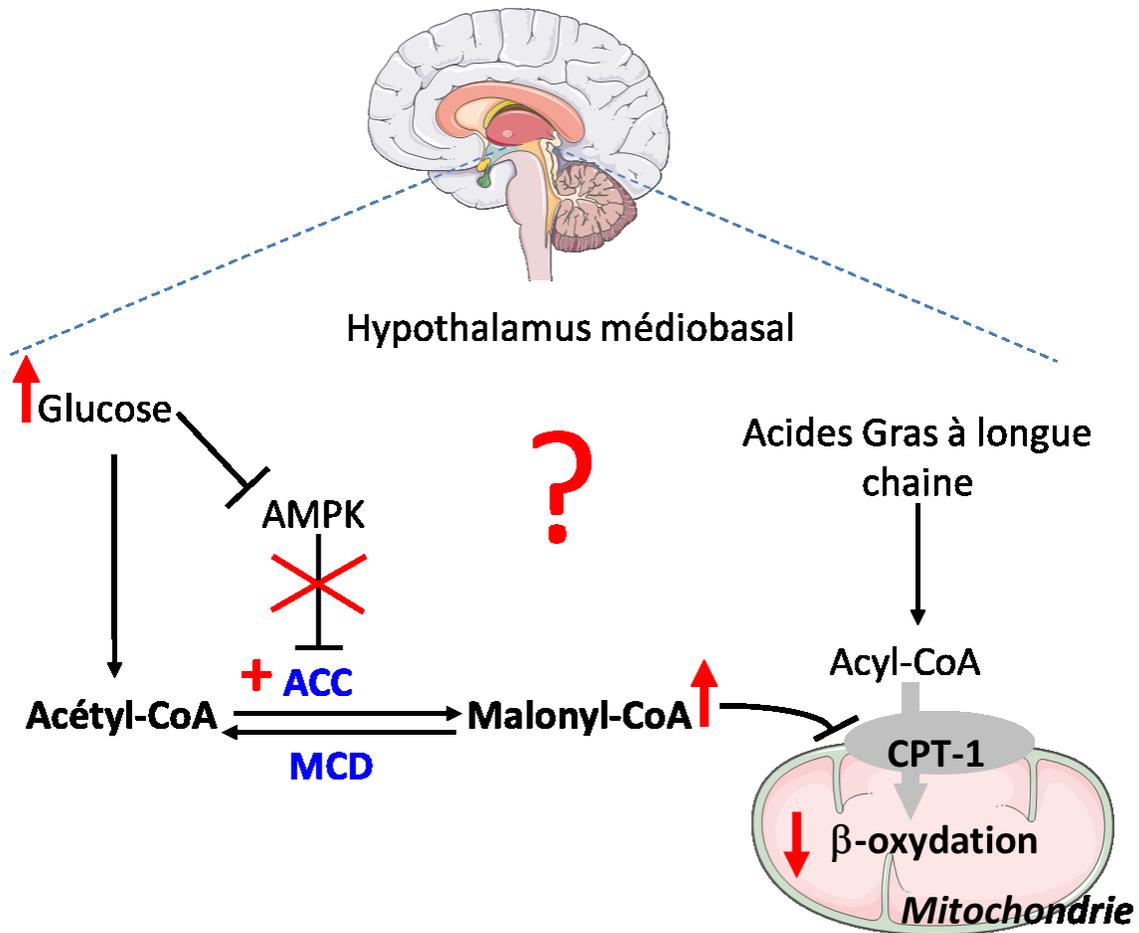


Figure 10: Hypothèse de l'implication du réseau de signalisation AMPK/ ACC/ malonyl-CoA dans le métabolisme du glucose et des acides gras au niveau de l'hypothalamus médio-basal.

L'inhibition de l'AMPK par le glucose entraînerait une activation d'ACC et par conséquent une augmentation des concentrations intracellulaires en malonyl-CoA, qui inhiberait à son tour l'enzyme CPT-1. L'inhibition de CPT-1 empêcherait l'entrée des acides gras dans la mitochondrie et leur oxydation.

VI- Modèles expérimentaux pour l'étude des fonctions hypothalamiques

Plusieurs modèles expérimentaux existent actuellement pour étudier les mécanismes impliqués dans les différentes fonctions de l'hypothalamus, incluant des lignées cellulaires et cultures primaires hypothalamiques, des explants de cerveau *ex vivo*, ainsi que des modèles animaux *in vivo*. Certes, l'approche *in vivo* constitue le meilleur modèle, néanmoins, ce modèle présente des limitations, quant au manque de spécificité envers les différentes populations des cellules cérébrales. Il est donc difficile dans notre cas, d'étudier, avec ce modèle, les mécanismes moléculaires impliqués dans le métabolisme intracellulaire des acides gras dans un type cellulaire bien spécifique.

Globalement, le modèle des coupes de cerveau, *ex vivo*, représente une alternative avantageuse, en ce qui concerne les circuits locaux et la cytoarchitecture des tissus, qui restent en grande partie préservés. Ce modèle représente un très bon outil, notamment, pour les études électrophysiologiques. Cependant, à l'instar du modèle *in vivo*, il reste difficile d'identifier une population cérébrale bien spécifique, sauf dans le cas par exemple, d'explants provenant de souris transgéniques exprimant des neuropeptides fluorescents (Pinto, Roseberry et al. 2004). Il est également possible que les connexions entre les neurones peuvent être perdues, induisant une perte potentielle des canaux importants ou des récepteurs ce qui peut biaiser dans certains cas les résultats obtenus.

Afin de contourner la complexité des modèles *in vivo* et *ex vivo*, les cultures cellulaires représentent un bon outil pour comprendre et étudier les mécanismes moléculaires, notamment, grâce à l'absence de connexions du réseau intégré et la signalisation neuronale, raison aussi à cause de laquelle, l'interprétation de certains résultats et conclusions, doit être effectuée avec prudence.

Deux différents modèles de cultures cellulaires neuronales existent, d'une part, les cultures primaires de neurones qui sont difficiles à maintenir, ont une courte durée de vie, et représentent une population hétérogène de neurones. D'autre part, les lignées neuronales qui représentent une population homogène illimitée de neurones spécifiques.

Les lignées neuronales hypothalamiques : GNRH

L'une des premières lignées neuronales de l'hypothalamus complètement différenciées, est celle développée par Mellon et al. en 1990 à partir de tumeur de souris transgénique, générées par l'injection d'une construction comportant la séquence codante de l'antigène T

Revue bibliographique

du virus SV40 (SV40-T Ag) sous le contrôle du promoteur du gène GnRH, qui deviendrait par la suite la lignée cellulaire GT1 (Mellon, Windle et al. 1990), et à partir de laquelle, trois autres populations de lignées neuronales nommées GT1-1, GT1-3 et GT1-7 ont été développées. Ces cellules sont devenues l'un des modèles cellulaires neuronales les plus utilisés dans les études liées non seulement au GnRH, mais aussi à d'autres fonctions neuronales. Actuellement, il existe quatre lignées cellulaires hypothalamiques exprimant GnRH qui sont GT1, GN, GNV et GRT. La lignée cellulaire Gn a été développée en utilisant la même méthode que GT1, alors que la lignée GNV développée par *salvi et al* (Salvi, Castillo et al. 2006), a été générée à partir de cultures hypothalamiques adultes et représente un phénotype de neurones adultes. Enfin on retrouve GRT, la plus récente des lignées exprimant GnRH, développée par *Wolf et al*, à partir de souris transgéniques dont le promoteur de GnRH conduit un gène hybride T-Ag.

Nous avons choisi d'utiliser la lignée GT1-7 dans notre étude car elle exprime également le neuropeptide AGRP.

Les lignées hypothalamiques SCN (SupraChiasmatic Nucleus)

La création de lignées neuronales hypothalamiques a aussi suscité l'intérêt des chercheurs dans le domaine des rythmes circadiens. Dans ce contexte, *Earnest et al* ont développé la première lignée des cellules SCN, qu'ils ont isolé à partir d'hypothalamus d'embryon de rat (Earnest, Liang et al. 1999). Deux autres lignées ont été générées récemment, la N14.5, isolée à partir des cellules de la région ventrale du SCN de rats transgéniques thermosensibles (ts), dont le gène SV40 T-Ag est activé seulement à 33_c (Matsushita, Amagai et al. 2006), et la lignée RS182, exprimant en plus le promoteur (Per1) du gène luciférase (Kawaguchi, Shinozaki et al. 2007).

Les lignées hypothalamiques mHypoE

L'utilisation de SV40-T Ag pour infecter des cultures primaires hypothalamiques de cellules embryonnaires de souris, a permis de générer d'autres lignées neuronales hypothalamiques connues sous le nom de mHypoE. Ces lignées cellulaires sont

caractérisées par l'expression de manière endogène des récepteurs d'hormones et de neuropeptides impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique et la reproduction. Parmi ces neuropeptides et récepteurs on note NPY, AgRP, POMC, CART, MCH, CRH, le récepteur de l'insuline, la leptine, ainsi que le récepteur de la mélanocortine MC3/ 4R (Dalvi, Nazarians-Armavil et al. 2011).

Dans le cadre de notre étude, notre choix s'était dirigé vers la lignée cellulaire (mHypoE-N46) représentée comme une lignée exprimant plus spécifiquement le neuropeptide NPY. Bien que ces modèles hypothalamiques embryonnaires soient extrêmement utiles dans la compréhension des mécanismes moléculaires neuronaux, il n'est pas encore complètement établi, si les mécanismes de base impliqués dans les fonctions de ces neurones, reflètent parfaitement ceux des neurones adultes.

Les lignées hypothalamiques mHypoA

Par ailleurs, des cultures de cellules primaires à partir d'hypothalamus de souris adulte, ont été traitées par le facteur de croissance CNTF, afin d'induire la neurogénèse, ainsi que la division cellulaire. Les cellules ont été infectées par SV40 T-Ag pour générer des lignées neuronales adultes mHypoA (Belsham, Fick et al. 2009). L'utilisation de ces lignes contribuerait à comprendre les mécanismes intracellulaires dans des neurones matures.

Finalement, bien que les cellules gliales aient suscité beaucoup d'attention et d'intérêt, l'étude de leur fonctionnement a été principalement basée sur des modèles de culture primaires.

À notre connaissance, et à ce jour, il n'existe pas de lignée astrocytaire hypothalamique. La génération de telles lignées pourrait apporter une grande aide au niveau expérimentale afin de comprendre les différents mécanismes impliqués dans le contrôle de la balance énergétique dans les astrocytes.

Objectifs et approches expérimentales

Objectifs

Dans un contexte où l'apport nutritif riche en graisse augmente, Caractériser et comprendre la régulation du métabolisme intracellulaire des acides gras au niveau central est devenu essentiel. A cette fin, l'ensemble des travaux réalisés le long de cette thèse englobe deux projets distincts :

La première étude réalisée s'intéresse à la caractérisation et à la régulation du métabolisme hypothalamique des acides gras par le glucose.

Les objectifs principaux de cette étude étaient d'abord, de tester l'existence d'une interaction entre le métabolisme du glucose et des acides gras dans l'hypothalamus, définir le(s) type(s) cellulaire(s) dans lequel(s) cette interaction métabolique est présente (neurones et/ou astrocytes) et finalement démontrer si des différences potentielles de cette interaction existent en fonction du type d'acides gras (saturés versus insaturés).

Les travaux réalisés dans le cadre de cette étude ont nécessité que je développe au sein du laboratoire différents modèles d'études et techniques permettant de mesurer le métabolisme intracellulaire du glucose et des acides gras (grâce à des traceurs radioactifs), ainsi que la sécrétion de neuropeptides, d'une part *in vitro* sur des lignées de neurones hypothalamiques et des cultures primaires d'astrocytes et d'autre part, *ex vivo* sur des explants hypothalamiques de rats et de souris. Nous avons pu mettre en évidence pour la première fois que le glucose régule le métabolisme des acides gras dans l'hypothalamus dépendamment du type cellulaire et du type d'acides gras. De plus, nos données montrent que les astrocytes de l'hypothalamus ont des caractéristiques métaboliques différentes des astrocytes corticaux, supportant ainsi leur rôle dans les effets centraux du glucose et des acides gras.

Toujours en se focalisant sur le métabolisme des acides gras dans le MBH et leur rôle dans l'homéostasie énergétique, le deuxième projet s'intéresse plus précisément à la protéine ACBP et son implication dans le métabolisme des acides gras au sein du MBH. Ainsi, le but de cette étude est de déterminer, si au sein du cerveau, ACBP contrôle le devenir métabolique des acides gras. Pour cela, j'ai adapté, via l'utilisation de souris déficientes en ACBP, les modèles et les techniques utilisés dans le cadre du premier projet pour répondre à ces questions.

Objectifs

Nos résultats obtenus montrent que la délétion d'ACBP modifie le profil des LCFA-CoA dans le cerveau, altère le métabolisme de l'oléate incluant son oxydation et estérification, mais pas celui du palmitate, dans les explants du MBH et les cellules gliales hypothalamiques. Ces travaux suggèrent que l'effet d'ACBP sur la régulation du métabolisme des LCFA est dépendant du type de ces derniers, et établissent pour la première fois un nouveau rôle de la protéine ACBP dans la régulation du métabolisme intracellulaire des acides gras au niveau central.

Ces travaux ont mené à la publication d'un article original ainsi qu'à la soumission d'un deuxième manuscrit au moment du dépôt de la thèse :

Bouchra Taïb*, Khalil Bouyakdan*, Cécile Hryhorczuk, Demetra Rodaros, Stephanie Fulton and Thierry Alquier.

Glucose Regulates Hypothalamic Long-chain Fatty Acid Metabolism via AMP-activated Kinase (AMPK) in Neurons and Astrocytes.

Publié dans le journal: Journal of Biological Chemistry, volume 288•number 52•December27, 2013

Khalil Bouyakdan*, Bouchra Taïb*, Lionel Budry, Shangang Zhao, Demetra Rodaros, Ditte Neess, Susanne Mandrup, Nils. J. Faergeman, and Thierry Alquier

A novel role for DBI/ACBP as a regulator of long-chain fatty acid metabolism in astrocytes

Soumis au journal : J Neurochem, juin 2014.

*: equal contribution

Chapitre I

Le glucose régule le métabolisme hypothalamique des acides gras à longue-chaîne via l'AMP-activated Kinase (AMPK) dans les neurones et les astrocytes.

Chapitre I

Mise en contexte:

Le premier volet de cette thèse, s'intéresse particulièrement à la régulation du métabolisme intracellulaire des acides gras par le glucose, connu pour moduler négativement la prise alimentaire et l'activité de l'AMPK dans l'hypothalamus.

Nos objectifs principaux étaient de

- 1- Tester l'existence d'une interaction entre le métabolisme du glucose et des acides gras dans l'hypothalamus *in vitro* et *ex vivo*.
- 2- Identifier le type cellulaire, neurones versus astrocytes, faisant l'objet de cette régulation.
- 3- Vérifier si l'effet du glucose est limité à l'hypothalamus ou s'étend aussi à d'autres régions dans le cerveau.

Nous avons donc commencé dans un premier temps par établir si le métabolisme du palmitate et celui de l'oléate sont régulés différemment par le glucose *in vitro* sur des lignées de neurones hypothalamiques (lignées GT1-7 et N-46), exprimant respectivement les neuropeptides AgRP et NPY ainsi que des cultures primaires astrocytaires, et d'autre part, *ex vivo* sur des explants hypothalamiques de rats.

Les résultats principaux issus de cette étude ont mis en évidence que :

- 1- le glucose diminue l'oxydation des acides gras, démontrant pour la première fois l'existence d'un couplage métabolique entre le métabolisme du glucose et celui des acides gras au niveau cérébral *in vitro* et *ex vivo*.
- 2- cette régulation dépend à la fois du type cellulaire (neurones versus astrocytes), du type d'acides gras (saturé versus insaturé) et de la région cérébrale (hypothalamus versus cortex).
- 3- la protéine AMP-activated Kinase (AMPK) est impliquée dans le couplage métabolique entre le glucose et les acides gras au niveau hypothalamique.

Chapitre I

L'ensemble des résultats obtenus a soulevé plusieurs points de discussions :

Premièrement est ce que la régulation de l'oxydation des acides gras par le glucose observé dans nos données, s'étend aussi au niveau de leur estérification, impliquant ainsi une régulation de la partition du métabolisme des LCFA par le glucose dans l'hypothalamus et le cortex ?

Le cas échéant, est ce que la différence de la régulation du métabolisme entre les différents types cellulaires est due à une différence des caractéristiques métaboliques de chaque type cellulaire ?

Nous allons reprendre les différents points présentés ici ultérieurement au cours de la discussion générale.

Chapitre I

Titre: Glucose regulates hypothalamic long-chain fatty acid metabolism via AMP-activated Kinase (AMPK) in neurons and astrocytes

Auteurs: Bouchra Taïb*, Khalil Bouyakdan*, Cécile Hryhorczuk, Demetra Rodaros, Stephanie Fulton and Thierry Alquier

Publié dans le journal Journal of Biological Chemistry, 2013.

Contribution des auteurs :

Bouchra TAIB : Auteure principale. A élaboré les hypothèses, conçu et réalisé les expériences, a analysé les données et rédigé le manuscrit.

Khalil bouyakdan : Coauteur principal. A participé à la conception et la réalisation des expériences de mesure du métabolisme in vitro et l'étude du profil génique des enzymes du métabolisme.

Cécile Hryhorczuk : Coauteur. A réalisé le marquage d'immunohistochimie dans les neurones.

Demetra Rodaros: Coauteure. A apporté de l'aide technique pour la réalisation des expériences ex vivo.

Dr Stéphanie Fulton: Coauteure et collaborateur. Contribution intellectuelle.

Dr Thierry Alquier: Directeur de thèse. A dirigé tout le projet et rédigé le manuscrit.

*: Coauteurs principaux à contribution égale

Chapitre I

Glucose regulates hypothalamic long-chain fatty acid metabolism via AMP-activated Kinase (AMPK) in neurons and astrocytes.

Bouchra Taïb^{a,b,1}, Khalil Bouyakdan^{a,c,1}, Cécile Hryhorczuk^{a,d}, Demetra Rodaros^a, Stephanie Fulton^{a,e} and Thierry Alquier^{a,b,c,f,2}

^aMontreal Diabetes Research Center, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), and Departments of ^bPathology and Cell Biology, ^cBiochemistry, ^dPhysiology, ^eNutrition and ^fMedicine, University of Montreal, Montreal, QC, Canada H3T 1J4.

¹Authors contributed equally to this work.

Running title: Glucose regulates fatty acid metabolism in the hypothalamus

Keywords: Hypothalamus, astrocytes, neural metabolism, AMPK, fatty acid oxidation, fatty acid esterification, palmitate, oleate.

Chapitre I

CAPSULE

Background: Hypothalamic long-chain fatty acids (LCFA) and glucose are critical for energy balance, but it is not known if their metabolism is coupled.

Results: Glucose regulates hypothalamic metabolism of palmitate via AMP-activated kinase.

Conclusion: Glucose and LCFA metabolism is coupled in a cell-type and LCFA dependent manner.

Significance: This is the first evidence for glucose regulation of LCFA metabolic fate in the hypothalamus.

ABSTRACT

Hypothalamic controls of energy balance rely on the detection of circulating nutrients such as glucose and long-chain fatty acids (LCFA) by the medio-basal hypothalamus (MBH). LCFA metabolism in the MBH plays a key role in the control of food intake and glucose homeostasis, yet it is not known if glucose regulates LCFA oxidation and esterification in the MBH and, if so, which hypothalamic cell type(s) and intracellular signaling mechanisms are involved. The aim of this study is to determine the impact of glucose on LCFA metabolism, assess the role of AMP-activated Kinase (AMPK) and to establish if changes in LCFA metabolism and its regulation by glucose vary as a function of the kind of LCFA, cell type and brain region. We show that glucose inhibits palmitate oxidation via AMPK in hypothalamic neuronal cell lines, primary hypothalamic astrocyte cultures and MBH slices *ex vivo* but not in cortical astrocytes and slice preparations. In contrast, oleate oxidation was not affected by glucose or AMPK inhibition in MBH slices. In addition, our results show that glucose increases palmitate, but not oleate, esterification into neutral lipids in neurons and MBH slices but not in hypothalamic astrocytes. These findings reveal for the first time the metabolic fate of different LCFA in the MBH, demonstrate AMPK-dependent glucose regulation of LCFA oxidation in both astrocytes and neurons and establish metabolic coupling of glucose and LCFA as a distinguishing feature of hypothalamic nuclei critical for the control of energy balance.

INTRODUCTION

The hypothalamus controls energy homeostasis by integrating hormonal and nutrient signals such as long-chain fatty acids (LCFA) and glucose (Morton, Cummings et al. 2006). The modulation of glucose homeostasis and food intake by glucose and LCFA relies on the intracellular metabolism of these nutrients. Esterification and oxidative metabolism of LCFA has been shown to mediate the effects of LCFA on glucose and energy homeostasis (Cruciani-Guglielmacci, Hervalet et al. 2004, Lam, Pocai et al. 2005, Pocai, Lam et al. 2006, Benani, Troy et al. 2007), and the actions of glucose in the brain mainly

Chapitre I

involve changes in the AMP/ATP ratio (Jordan, Konner et al. 2010). In peripheral tissues, glucose regulates the partitioning of LCFA-CoA between oxidation and esterification, a process fundamental to glucose regulation of insulin release by the pancreatic beta cell (Prentki, Matschinsky et al. 2013). Despite this knowledge, it is not known if glucose and LCFA metabolism is coupled in the hypothalamus, nor which cell types and intracellular signalling pathways are involved.

The coupling of glucose and LCFA metabolism in peripheral tissues is known to require specific glucose-derived metabolites and enzymes (Ruderman, Saha et al. 2003). Intracellular metabolism of glucose inhibits the activity of a key energy sensing enzyme, AMP-activated kinase (AMPK). Several studies have established the importance of AMPK in the medio-basal hypothalamus (MBH) in glucose sensing (Claret, Smith et al. 2007, Murphy, Fakira et al. 2009), action (Yang, Lam et al. 2010) and the counterregulatory response to hypoglycemia (Alquier, Kawashima et al. 2007, McCrimmon, Shaw et al. 2008). Glucose inhibition of hypothalamic AMPK leads to the activation of acetyl-CoA carboxylase (ACC), thereby leading to the generation of malonyl-CoA from glucose-derived acetyl-CoA (Hu, Cha et al. 2003, Wolfgang, Cha et al. 2007). In peripheral tissues it is known that malonyl-CoA inhibits LCFA-CoA mitochondrial oxidation via inhibition of carnitine palmitoyl transferase-1a (CPT-1a), the isoform expressed in the liver, and CPT-1b, the muscle isoform (Ruderman, Saha et al. 2003). In the hypothalamus, CPT-1a and CPT-1c, the brain-specific isoform, are expressed but only CPT-1a possesses the prototypical mitochondrial acyltransferase activity (Gao, Moran et al. 2013). While inhibition of CPT-1a and LCFA-CoA oxidation by malonyl-CoA has been suggested in the brain (Hu, Dai et al. 2005, He, Lam et al. 2006, Wolfgang, Cha et al. 2007, Andrews, Liu et al. 2008, Lopez, Lage et al. 2008), this model is not consistent with the results of some studies showing that increased malonyl-CoA do not affect LCFA-CoA levels in the hypothalamus (Gao, Kinzig et al. 2007, Gao, Keung et al. 2011, Gao, Casals et al. 2013). However, LCFA-CoA oxidation rates in response to glucose have never been measured in the hypothalamus.

Beyond changes in oxidative flux, it is also not known whether or not glucose affects LCFA-CoA partitioning between oxidation and esterification in the hypothalamus and if this process depends on AMPK. Hypothalamic neurons (Mountjoy and Rutter 2007) and glia (Guillod-Maximin, Lorsignol et al. 2004, Lam, Gutierrez-Juarez et al. 2005, Marty, Dallaporta et al. 2005, Orellana, Saez et al. 2012, Lanfray, Arthaud et al. 2013) are both able to sense glucose, and the importance of astroglia in central nutrient sensing has been recently emphasized (Yi, Habegger et al. 2011). It is unclear if glucose modulation of LCFA-CoA metabolism occurs in neurons and/or astrocytes and whether or not such a feature distinguishes hypothalamic nuclei from other brain regions. Finally, it remains to be elucidated if the type of LCFA (carbon chain length and saturation degree) differentially affects glucose-regulated LCFA metabolism. The goal of the present study was to: (1) determine whether or not glucose regulates

Chapitre I

LCFA metabolism in the hypothalamus; (2) establish if oleate and palmitate metabolism are differentially modulated by glucose; (3) identify the role of AMPK in glucose-regulated LCFA metabolism, and (4) identify which hypothalamic cell type(s) are involved. To this end, we have employed combination of *in vitro* models consisting of hypothalamic neurons, hypothalamic and cortical astrocytes cultures as well as *ex vivo* MBH and cortical slices to measure glucose metabolism, LCFA oxidation and esterification rates in response to glucose and pharmacological AMPK manipulation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents

Culture media and serum were from Wisent (Canada). Radioactive tracers were from Perkin Elmer and all other reagents were from Sigma (St. Louis, MO), unless otherwise noted. The NPY RIA kit was from Phoenix Pharmaceuticals (Burlingame, CA).

Animals

Four to five-week-old male Wistar rats and C57Bl/6 mice were purchased from Charles River (Québec, Canada). Animals were housed 2 per cage on a 12 h light/dark cycle at 21°C with free access to water and standard diet. All procedures were approved by the Institutional Committee for the Protection of Animals (CIPA) at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal.

Neuronal cell lines culture

GT1-7 (generous gift from Dr Pamela Mellon, San Diego, California, USA) and N46 neurons (Cellutions Biosystems, Toronto, ON, Canada) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 25 mM glucose and 1% penicillin/streptomycin at 37°C in 95% O₂-5% CO₂. Cells were used at ~70% confluence for every experiment. To assess the effect of glucose on the expression of esterification enzymes in N46 neurons, cells were starved during 12 h in DMEM 10% FBS at 1 mM glucose. Then, cells were maintained for 24 h in DMEM 10% FBS with 1 or 15 mM glucose.

Primary astrocytes culture and immunocytochemistry

Primary cultures of hypothalamic and cortical astrocytes were prepared from 1-day-old C57Bl/6 pups using a protocol adapted from the group of Magistretti (Gavillet, Allaman et al. 2008). Briefly, after decapitation the brains were removed, the hypothalami and cortices were dissected and transferred into 6 well plates containing 2 ml of DMEM. The tissues were dissociated by passing through syringe needles of

Chapitre I

decreasing diameter (22G followed by 25G) 6 times. The cells were plated in poly-ornithine-coated T25 flasks and maintained in DMEM containing 25 mM glucose and supplemented with 44 mM NaHCO₃, 1% antibiotic-antimycotic and 10% FBS at 37°C in 95% O₂-5% CO₂. Astrocytes were cultured for 14 to 21 days before use (~70% confluence).

Astrocytes cultured on coverslips were fixed in 4% formalin and blocked in presence of Phosphate-Buffered Saline (PBS) with 5% Bovine Serum Albumin (BSA) and 0.05% Triton. Cells were then incubated with a Glial-Fibrillary Acidic Protein (GFAP) primary antibody (1:1000, Dako, Canada) in 5% BSA and 0.05% Triton in PBS overnight at 4°C followed by secondary antibody incubation (1:1000, Alexa Fluor 568, A-11004, Invitrogen, USA) in 0.25 % BSA for 2 h at room temperature. The coverslips were mounted onto glass slides with Vectashield (Vector Laboratories, USA) containing DAPI (1.5 µg/ml). Cells were observed with a Zeiss fluorescent microscope.

RNA and real-time quantitative PCR

N46 and GT1-7 neurons and primary astrocytes grown in 6 well plates were rinsed with ice-cold PBS before RNA extraction using TRIzol method (Invitrogen). RNA concentration was quantified spectrophotometrically. 900 ng of total RNA was reverse transcribed by M-MULV reverse transcriptase (Invitrogen) with random hexamers following the manufacturer's conditions. The reaction mix was then diluted 5 fold before use

Quantitative gene expression was measured from 1:10 cDNA dilutions. Real-time PCR was performed using the QuantiFast SYBR green PCR kit (Qiagen) according to the manufacturer's guidelines on a Corbett Rotor-Gene 6000. Data were analyzed using the standard curve method and normalized to 18 S expression levels. The list and sequence of primers is provided in Table 1.

Hypothalamic and cortical slices

The slice protocol was adapted from a protocol previously described (Kawashima, Alquier et al. 2012). Following decapitation, the brain was rapidly removed and immersed in ice-cold cutting solution of the following composition (in mM): NaH₂PO₄-H₂O, 1.25; KCl, 2.5; MgCl₂-6H₂O, 7; CaCl₂-2H₂O, 0.5; NaHCO₃, 28; D-glucose, 8; L(+)-Ascorbate, 1; Na-Pyruvate, 3; Hepes, 5 and sucrose 200, pH 7.25 and osmolarity 310-320 mOsM, oxygenated with 95% O₂-5% CO₂. Four 300 µm thick sections containing the hypothalamus were cut from each rat using a Vibratome while being continuously immersed in ice-cold cutting solution. The MBH, which includes the arcuate nucleus plus the ventro- and dorso-median hypothalamus, and the medio-lateral area of the motor and somatosensory cortex were dissected on each section as previously described (Alquier, Kawashima et al. 2007, Kawashima, Alquier et al. 2012).

Chapitre I

Slices were allowed to recover during 1 h at room temperature in artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM): NaCl, 118; KCl, 3; NaH₂PO₄-H₂O, 1.2; MgCl₂-6H₂O, 1; CaCl₂-2H₂O, 1.5; Hepes, 5; NaHCO₃, 25; D-glucose 5 and sucrose 15, pH 7.25 and osmolarity 310-320 mOsM, oxygenated with 95 % O₂-5 % CO₂. Slices dissected from each hemisphere were pooled together in two distinct incubation chambers to allow two treatment conditions per animal. Slices were then pre-incubated at 37°C for 30 min in aCSF 1 mM glucose before treatment under constant oxygenation.

For Neuropeptide Y (NPY) secretion in MBH slices, slices were incubated in aCSF 1 mM glucose containing 0.1 mM palmitate pre-complexed to 0.1% BSA for 1 h 40 min. The media was then collected and replaced by aCSF 1 mM glucose, 0.1 mM palmitate pre-complexed to 0.1% BSA and 50 mM KCl for 20 min after which the media was collected. NPY radioimmunoassay was performed following the manufacturer's recommendation. At the end of slice experiments, samples were washed in cold PBS, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until subsequent homogenization for protein extraction.

Muscle and liver slices

The soleus muscle and liver were dissected on animals after decapitation. A 500 µm thick section of the liver was cut using a slicing matrix. The entire soleus and the liver section were pre-incubated at 37°C for 30 min in Krebs-Ringer bicarbonate HEPES buffer (KRBH), pH 7.3 supplemented by 0.1% BSA and 1 mM glucose under constant oxygenation.

LCFA oxidation in cultured neurons and astrocytes

The measurement of LCFA oxidation in neurons and primary astrocytes cultures was performed using a protocol adapted from a methodology already described for cultured beta cells (Roduit, Nolan et al. 2004). Briefly, cells grown in T25 flasks were starved for 2 h in DMEM 1mM glucose followed by a 30 min pre-incubation in the same media plus 0.5% fatty acid-free BSA. Cells were then incubated during 2 h in presence of different glucose concentrations (1, 8 and 15 mM), 0.3 mM palmitate or oleate pre-complexed to 0.5% BSA, [1-¹⁴C]-Palmitate or [1-¹⁴C]-Oleate (0.1 µCi/ml), ± 200 µM etomoxir, 25 µM Compound C (CpC, Calbiochem) or 1 mM 5-amino-1-β-D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide (AICAR, Toronto Research Chemicals, Canada). AICAR was dissolved in sterile water. 0.25% DMSO was used as a vehicle for CpC and 0.25% DMSO was added in all the conditions. The flasks were sealed at the beginning of the incubation with a stopper containing a filter (Whatman GF/B paper) pre-soaked in 5% KOH. The incubation was stopped by the injection of 0.2 ml 40% perchloric acid into each flask via a needle through the cap to acidify the medium and liberate the CO₂. After overnight isotopic equilibration at room temperature, filters were removed and the trapped ¹⁴CO₂ and ¹⁴C-Acid Soluble Products

Chapitre I

generated by the oxidation of ^{14}C -Palmitate or ^{14}C -Oleate were counted to calculate total palmitate and oleate oxidation. The results were normalized by cell protein content.

Glucose utilization and oxidation in cultured neurons and astrocytes

Neurons and primary astrocytes grown in T25 flasks were starved in DMEM 1mM glucose for 2h and pre-incubated in DMEM 1 mM glucose containing 0.5% BSA during 30 min as described for LCFA oxidation. Cells were then incubated in presence of different glucose concentrations (1, 8 and 15mM), 0.3 mM palmitate pre-complexed to 0.5% BSA, D-[U- ^{14}C]-glucose (0.2 $\mu\text{Ci/ml}$) and D-[5- ^3H]-glucose (0.5 $\mu\text{Ci/ml}$). The reaction was stopped by the addition of 0.2 ml of 40% perchloric acid. $^{14}\text{CO}_2$ generated was counted to estimate glucose oxidation while $^3\text{H}_2\text{O}$ was counted to estimate glucose utilization. The results were normalized by cell protein content.

LCFA oxidation and glucose utilization in brain slices, muscle and liver

Since brain slices have to be constantly oxygenated, ^{14}C -labeled oleate and palmitate tracers could not be used to measure LCFA oxidation via the release of $^{14}\text{CO}_2$. Therefore, ^3H -tracers were employed to estimate the amount of $^3\text{H}_2\text{O}$ generated and released in the media. Cortical and MBH slices were pre-incubated in aCSF 1 mM glucose containing 0.1 % BSA for 30 min followed by a 2 h incubation with different concentrations of glucose (0.5, 1, 5, and 10 mM), 0.1 mM palmitate or oleate pre-complexed to 0.13% BSA, [9,10(n)- ^3H]-palmitate or [9,10(n)- ^3H]-oleate (2 $\mu\text{Ci/ml}$) or D-[5- ^3H]-glucose (0.5 $\mu\text{Ci/ml}$) \pm etomoxir (200 μM) or CpC (25 μM) at 37°C under constant oxygenation with 95 % O_2 -5 % CO_2 . 0.25% DMSO was used as a vehicle for CpC and 0.25% DMSO was added in all conditions. Palmitate oxidation was measured in a 500 μm thick liver section and the entire soleus muscle in similar conditions except that incubations were performed in KRBH. For glucose utilization measurements, slices were incubated at 1 or 10 mM glucose in presence of 0.1 mM palmitate pre-complexed to 0.1% BSA. At the end of the incubation, the medium was collected and acidified with concentrated HCl (10% of vol). Samples were placed in scintillation vials containing cold water and were incubated 24 h at 50°C under constant agitation. After equilibration, $^3\text{H}_2\text{O}$ was counted to calculate palmitate or oleate oxidation or glucose utilization. The results were normalized by slice protein content.

LCFA esterification in cells and brain slices

Oleate and palmitate esterification into neutral lipids was measured using ^{14}C -labeled tracers and thin layer chromatography (TLC). Cells (neurons and astrocytes) grown in T25 flasks were starved for 2 h in DMEM 1 mM glucose followed by a pre-incubation of 30 min in the same media plus 0.5% BSA. Cells were then incubated during 2 h in presence of different glucose concentrations (1 and 15 mM), 0.3 mM

Chapitre I

palmitate or oleate pre-complexed to 0.5% BSA, [1-¹⁴C]-Palmitate or [1-¹⁴C]-Oleate (0.1 µCi/ml). MBH slices were pre-incubated in aCSF 1 mM glucose for 30 min and then incubated during 2 h with different concentrations of glucose (1 and 10mM), 0.1 mM palmitate or oleate pre-complexed to 0.13% BSA and [1-¹⁴C]-Palmitate or [1-¹⁴C]-Oleate (2 µCi/ml) at 37°C under constant bubbling with 95 % O₂-5 % CO₂.

At the end of the incubation, cells and explants were collected, washed with cold PBS and rapidly frozen in 0.5 ml (cells) or 0.2 ml (slices) methanol: HCl (100:1) in liquid nitrogen. Total lipids were extracted using the Folch method. Briefly, samples were homogenized using a pestle and loaded into pre-chilled glass tubes containing 2 ml chloroform then washed with 0.5 ml methanol and HCl. Water with 0.9% NaCl was added and samples were vigorously vortexed for 15 sec and centrifuged at 900g during 15 min at 4°C. After centrifugation, the lower phase (organic) was transferred into pre-chilled glass tubes and dried under N₂. Each sample was suspended in 50 µl chloroform and loaded on the TLC plates (Whatman). The samples were delivered by small drops and 10 µl of the esterification mix was loaded to quantify total palmitate or oleate tracer radioactivity. Total lipids were separated using a solvent for neutral lipids (petroleum ether/ether/acetic acid; 70:30:1) for separation of total phospholipids from mono-, di- and triacylglycerols. Plates were imaged using a phosphor screen (GE Healthcare) after 9 to 10 days exposure and the signal quantified using a Typhoon scanner (GE Healthcare). Results were normalized by slice and cell protein content.

Treatment for Western Blot analysis

Western blotting was performed to examine changes in AMPK (Thr 172) and ACC (Ser 79) phosphorylation in response to glucose, AICAR or CpC in cultured cells or brain slices. Cells were starved in DMEM 1 mM glucose and incubated during 15 min in DMEM 1 or 15 mM glucose ± CpC (25 µM) or AICAR (1 mM). AICAR was dissolved in sterile water. 0.25% DMSO was used as a vehicle for CpC and 0.25% DMSO was added in all the conditions. Cortical and MBH slices were pre-incubated in aCSF 1 mM glucose and incubated in aCSF 1 or 10 mM glucose during 15 min. After a wash with cold PBS, samples were lysed in ice-cold lysis buffer containing 1M Tris-HCl (pH 7.5), 1M NaCl, 400 mM Na₂ EDTA, 100 mM EGTA (pH 7.5), Triton X-100, Sodium Pyrophosphate, 100 mM beta-glycerophosphate, 100 mM Na₃VO₄, 10 mg/ml Leupeptin, supplemented with 1% protease inhibitor cocktail (Cell Signaling), 1 mM PMSF and aprotinin. Total protein (20µg) was resolved on a 7.5 % acrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Biorad) blocked with 5% non-fat milk in Tris-buffered saline containing 0.2% Tween 20 (TBS-T) for 1 h. Blots were then incubated with a P-AMPK or P-ACC primary antibody (1:1000, Cell Signaling) overnight at 4°C followed by secondary antibody incubation (HRP-goat anti rabbit, 1:10000, Biorad) during 1 h at room temperature. The membranes were then stripped and incubated with an AMPK or ACC primary antibody (1:1000, Cell

Chapitre I

Signaling). Chemiluminescence (Western Lightning, PerkinElmer Life Sciences) was quantified on scanned films using densitometry.

Statistics

Data are expressed as means \pm SEM. Intergroup comparisons were performed by one-way ANOVA with Bonferroni post-tests or by Student's *t*-test when comparing two conditions. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Glucose and LCFA oxidation are coupled via AMPK in hypothalamic neurons

GT1-7 and N46 hypothalamic neuronal cell lines were chosen for intracellular metabolism studies based on previous reports demonstrating “glucose-sensing” capacities (Sanz, Roncero et al. 2007, Madadi, Dalvi et al. 2008, Beall, Hamilton et al. 2012). GT1-7 neurons mainly express the Agouti-Related Protein (AgRP) neuropeptide while N46 cells express both AgRP and Neuropeptide Y (NPY) (Fig 1A). Expression of Proopiomelanocortin was extremely low compared to AgRP and NPY. The glucose transporter GLUT2 and glucokinase (GK) were not detected in GT1-7 and N46 neurons. However, key enzymes involved in malonyl-CoA metabolism including ACC; Malonyl-CoA decarboxylase (MCD), the malonyl-CoA degrading enzyme; Fatty acid synthase (FAS) which catalyzes palmitate synthesis from malonyl-CoA; as well as enzymes of LCFA (CPT-1) and glucose (Pyruvate dehydrogenase) oxidation (Fig 1B) were expressed in GT1-7 and N46 neurons. Expression levels of CPT-1a were similar in GT1-7 and N46 neurons and were about 2 fold higher than CPT-1b. CPT-1c was the most abundant CPT-1 isoform in GT1-7 cells.

Palmitate oxidation was measured in response to increasing glucose concentrations in both GT1-7 and N46 hypothalamic neurons. First, the CPT-1 inhibitor etomoxir significantly decreased palmitate oxidation by 38% and 70% in GT1-7 and N46 neurons respectively (Fig 2A and D). Second, increasing glucose concentrations decreased palmitate oxidation in both hypothalamic cell lines (Fig 2A and D). However, the effect of glucose was more pronounced in N46 neurons and reached a maximum at 8 mM glucose compared to GT1-7 cells. To determine whether the effect of glucose was related to differences in glucose metabolism, its utilization and oxidation were measured in GT1-7 and N46 neurons. Glucose utilization and oxidation were increased by ~ 2 fold in response to 8 and 15 mM glucose in N46 neurons (Fig 2E and F). Despite a similar trend, glucose utilization and oxidation were significantly increased by ~ 1.6 and ~ 1.4 fold respectively only at 15 mM glucose in GT1-7 neurons (Fig 2B and C). These results suggest that the higher rate of glucose metabolism in N46 neurons inhibits palmitate oxidation at lower

Chapitre I

glucose concentrations when compared to GT1-7 neurons. Altogether, these results show that palmitate oxidation is decreased in response to glucose in hypothalamic neurons.

To investigate the involvement of AMPK in glucose inhibition of palmitate oxidation, N46 neurons were treated with or without the AMPK inhibitor, Compound C (CpC, 25 μ M) at low glucose (1mM) or in presence or absence of AICAR, the AMPK activator (1 mM), at high glucose (15 mM). Western blot analysis revealed that AMPK phosphorylation was significantly decreased by CpC and high glucose compared to low glucose conditions whereas AICAR blocked the effect of high glucose (Fig 2G and H). In line with the effect on AMPK activity, CpC decreased palmitate oxidation at low glucose while AICAR prevented glucose inhibition of palmitate oxidation (Fig 2I). These results demonstrate that the inhibition of palmitate oxidation by glucose is dependent on AMPK activity. The oxidation of the monounsaturated LCFA oleate was also measured in N46 neurons to assess potential difference between LCFA. Interestingly, basal oleate oxidation was significantly lower compared to palmitate (9.8 ± 0.6 vs. 7.2 ± 0.1 nmol/mg/h, $p < 0.01$) but was inhibited by glucose similarly to palmitate (Fig 2J).

Glucose inhibits palmitate oxidation via AMPK in hypothalamic but not cortical astrocytes

Astrocytes are the most abundant cells in the central nervous system and are well known to oxidize LCFA (Edmond 1992). Therefore, we decided to investigate whether glucose regulates LCFA oxidation in astrocytes and whether there are potential differences in glucose action depending on the nature of the astrocytes. To this end, we developed and validated mouse astrocyte cultures generated from cortices or hypothalami isolated from newborn mice (P1).

The purity of the culture was assessed by immunocytochemistry using Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) as a marker for astrocytes. Our results showed that ~88% of cells in both cortical and hypothalamic cultures were GFAP positive (Fig 3A). We found that less than 1% of cells were Iba1 positive (microglial marker) and no staining for NeuN (neuronal marker) was observed (data not shown). The expression profile of key enzymes of LCFA metabolism was assessed in primary astrocytes by qPCR. GLUT2 and GK mRNA were not detected in astrocytes cultures. CPT-1a and 1c were the main isoforms expressed in astrocytes with higher CPT-1c levels observed in hypothalamic astrocytes (Fig 3B). CPT-1a, ACC1, MCD, FAS and Pyruvate dehydrogenase (PDHa1 and a2) expression levels were significantly higher in cortical vs. hypothalamic astrocytes (Fig 3B).

Palmitate oxidation was measured in response to glucose in hypothalamic and cortical astrocytes as described for hypothalamic neurons. Oxidation rates were decreased by ~ 75% in response to etomoxir in both astrocyte cultures (Fig 4A). No differences were observed in basal palmitate oxidation between hypothalamic and cortical astrocytes. However, palmitate oxidation was inhibited by glucose specifically in hypothalamic astrocytes (Fig 4A). Interestingly, the differential response to glucose was not related to

Chapitre I

differences in glucose utilization and oxidation in hypothalamic vs. cortical astrocytes (Fig 4B and C). To determine the implication of AMPK in glucose inhibition of palmitate oxidation, cortical and hypothalamic astrocytes were treated with AICAR in presence of high glucose (15 mM). Western blot analysis revealed that glucose decreased P-AMPK and P-ACC in hypothalamic astrocytes compared to low glucose conditions, an effect that was prevented by AICAR (Fig 4D and E). In cortical astrocytes, P-AMPK and P-ACC levels remained unchanged in response to glucose. In contrast, AICAR increased both P-AMPK and P-ACC in cortical astrocytes (Fig 4D and E). The inhibitory effect of glucose on palmitate oxidation was prevented by AICAR treatment in hypothalamic astrocytes whereas AICAR had no effect on palmitate oxidation in cortical astrocytes (Fig 4F).

Glucose and palmitate oxidation are coupled in hypothalamic but not cortical slices

The metabolic coupling between glucose and LCFA was investigated in a physiological model of acute brain slices *ex vivo*. LCFA oxidation was measured in MBH (consisting of the arcuate nucleus plus the ventro- and dorso- median-hypothalamus) and cortical slices from male Wistar rats using palmitate and oleate radioactive tracers. The viability of MBH slices was tested by measuring NPY secretion in response to KCl after incubation in the oxidation media. KCl induced a ~ 5 fold increase in NPY secretion indicating that the MBH slices were viable (Fig 5A). Notably, we found that palmitate oxidation rate was significantly higher in the MBH compared to the liver and soleus muscle (Fig 5B). In addition, palmitate oxidation in the MBH and cortex was significantly decreased by ~ 90% in response to etomoxir indicating that palmitate oxidation is mainly CPT-1 dependent (Fig 5C). Interestingly, palmitate oxidation was significantly decreased in response to glucose in the MBH while oxidation remained unchanged with increasing glucose concentrations in cortical slices (Fig 5D and E). Glucose utilization was significantly higher in MBH compared to cortical slices at low glucose (Fig 5F). However, the fold increase in glucose utilization in response to glucose (~ 2 fold) was similar in both areas. In line with the effect of glucose on palmitate oxidation in the MBH, we found that phosphorylation of AMPK was significantly decreased by glucose in the MBH while it remained unchanged in cortical slices (Fig 5G and H). We also investigated whether glucose affects oleate oxidation in MBH slices. Basal oleate oxidation at 1 mM glucose was similar to palmitate. However, in contrast to palmitate, glucose had no effect on oleate oxidation (Fig 5I) suggesting that its oxidation is not regulated by glucose and AMPK. To address this question, palmitate and oleate oxidation were measured at low glucose with or without CpC. While CpC significantly decreased palmitate oxidation, oleate oxidation remained unchanged (Fig 5J) supporting the idea that oleate oxidation is independent on AMPK activity. Importantly, oleate oxidation was not altered by etomoxir suggesting that its oxidation is CPT-1 independent (Fig 5K).

Chapitre I

Glucose increases palmitate but not oleate esterification in N46 neurons and slices

To determine whether inhibition of LCFA oxidation translates into increased LCFA esterification, the incorporation of LCFA into neutral lipids was measured in N46 neurons, hypothalamic astrocytes cultures and MBH slices. We found that in the three models, palmitate and oleate were mainly esterified in triacylglycerol (TAG) and phospholipids (PL) (Fig 6). In basal conditions, oleate esterification in TAG and PL was significantly higher compared to palmitate while its esterification in diacylglycerol (DAG) was reduced in comparison to palmitate in neurons and slices (Fig 6A and C). Oleate esterification was not affected by glucose whereas palmitate esterification in DAG and TAG was increased in response to glucose (Fig 6A and C). Interestingly, glucose did not affect palmitate esterification in hypothalamic astrocytes (Fig 6B).

In line with increased palmitate esterification in DAG and TAG in response to glucose in neuronal cells, we found that N46 neurons expressed different isoforms of enzymes involved in TAG biosynthesis through the glycerol phosphate pathway (Takeuchi and Reue 2009) including glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 (GPAT1) but not GPAT2, 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase 1 to 8 (AGPAT) and diacylglycerol acyltransferase 1 and 2 (DGAT). Interestingly, the expression of AGPAT 1, 5, 7 and 8 and DGAT1 was significantly increased in response to high glucose (Fig 7).

DISCUSSION

The main objectives of this study were to examine whether glucose regulates LCFA intracellular metabolism via AMPK-dependent mechanisms and assess potential differences in LCFA metabolism and its regulation by glucose in different brain areas, cell types and for different LCFA. Using complementary models, we demonstrate for the first time that glucose and palmitate metabolism is coupled in hypothalamic neuronal cell lines, primary astrocytes and slices. The inhibition of palmitate oxidation by glucose resulted in increased palmitate esterification into neutral lipids in neurons and MBH slices. Glucose inhibition of palmitate oxidation in hypothalamic neurons and astrocytes was prevented by AMPK activation whereas AMPK inhibition decreased palmitate oxidation at low glucose. Taken together, these results establish the existence of an AMPK-dependent coupling between glucose and palmitate metabolism in the hypothalamus.

Importantly, the effect of glucose was specific to the hypothalamus since phosphorylation of AMPK and palmitate oxidation in cortical astrocyte cultures or slices remained unchanged in response to glucose. The absence of glucose effect on cortical P-AMPK is in agreement with previous reports showing that high glucose, hypoglycemia or neuroglucopenia does not modulate AMPK activity in cortical areas (Minokoshi, Alquier et al. 2004, Han, Namkoong et al. 2005, Alquier, Kawashima et al. 2007). Interestingly, the lack of response to glucose was not related to a lower capacity to metabolize

Chapitre I

glucose since the fold increase in glucose utilization and oxidation rates in response to glucose were similar in hypothalamic vs. cortical astrocytes and in MBH vs. cortical slices. This suggests a dissociation between glucose metabolism and AMPK activity that may involve differences in ATP generation and/or in the expression of the α 1-AMPK isoform in cortical vs. hypothalamic regions which is less sensitive to glucose compared to the α 2 isoform (Kim, Park et al. 2004, Minokoshi, Alquier et al. 2004, Alquier, Kawashima et al. 2007). Although it is difficult to speculate on mRNA levels, there is also a possibility that the increased expression of FAS and MCD in cortical astrocytes translates into lower levels of malonyl-CoA generated in response to glucose in cortical vs. hypothalamic astrocytes. Additional studies aimed at measuring glucose-derived metabolites in astrocytes will be required to address this hypothesis.

To our knowledge, this is the first report showing that glucose regulates P-AMPK and LCFA oxidation in primary hypothalamic but not cortical astrocytes suggesting that hypothalamic astrocytes, similarly to hypothalamic neurons, have glucose sensing properties. These findings are in line with growing literature showing that hypothalamic glial cells are involved in central glucose sensing and action (Guillod-Maximin, Lorsignol et al. 2004, Lam, Gutierrez-Juarez et al. 2005, Marty, Dallaporta et al. 2005, Orellana, Saez et al. 2012, Lanfray, Arthaud et al. 2013). It is important to mention that we did not observe an increase in palmitate oxidation in response to AICAR in cortical astrocytes. These results are in contrast with a study by Blazquez et al. (Blazquez, Woods et al. 1999) showing that AICAR increases ketogenesis in cortical astrocytes suggesting that AMPK activation increases palmitate oxidation. The reason for this discrepancy is unclear but could involve differences in animal species (rat vs. mouse in the current study), conditions of culture and treatment and/or the possibility that palmitate oxidation is already maximal at low glucose and cannot be further enhanced by AICAR in our culture model. This hypothesis is supported by the fact that despite increased P-AMPK and P-ACC in response to AICAR, palmitate oxidation remained unchanged in cortical astrocytes.

Our study also highlights important differences in palmitate oxidation rates between hypothalamic neurons vs. astrocytes as well as MBH vs. cortical slices. In agreement with previous reports suggesting that LCFA oxidation in the brain mainly occurs in astrocytes (Edmond, Robbins et al. 1987, Edmond 1992), we found that palmitate oxidation is significantly higher in astrocytes compared to GT1-7 and N46 neurons. Interestingly, despite higher CPT-1a expression level in cortical astrocytes, palmitate oxidation rate was similar in hypothalamic and cortical astrocytes and was decreased to the same extent by etomoxir suggesting a similar oxidative capacity at low glucose concentration. In agreement with the literature (Gao, Moran et al. 2013), we found that CPT-1a and 1c were the most abundant CPT-1 isoforms expressed in brain cells. However, the expression of CPT-1c in cultured astrocytes is not consistent with earlier studies showing a neuronal localization in the adult mouse brain

Chapitre I

(Dai, Wolfgang et al. 2007, Sierra, Gratacos et al. 2008). This discrepancy could be related to the age of the animals used to generate astrocytes (P1) and/or the culture conditions.

In contrast to CPT-1a, the biochemical function of CPT-1c is not well defined. The initial studies concluded that CPT-1c did not have the prototypical acyltransferase activity (Price, van der Leij et al. 2002, Wolfgang, Kurama et al. 2006) but a later study identified a weak palmitoyl-CoA transferase activity in the endoplasmic reticulum of neurons (Sierra, Gratacos et al. 2008) suggesting that CPT-1c is not involved in LCFA oxidation. This hypothesis is supported by recent results showing that CPT-1c promotes ceramide biosynthesis in the hypothalamus (Gao, Zhu et al. 2011, Ramirez, Martins et al. 2013). These data and the expression profile of CPT-1 isoforms in our models strongly suggest that LCFA oxidation in hypothalamic cells is mainly dependent on CPT-1a.

In tissues preparation *ex vivo*, palmitate oxidation was about 2 and 3 fold higher in the MBH compared to the liver and soleus muscle respectively. These results are consistent with previous *ex vivo* studies showing higher palmitate oxidation rates in hypothalamic areas compared to the liver (Kasser, Harris et al. 1985, Beverly and Martin 1991).

In addition, in slices preparation, palmitate oxidation was about 3 fold higher in the MBH compared to cortical slices suggesting a higher LCFA oxidative capacity. In line with this finding, we observed a similar difference in palmitate oxidation between MBH and cortical slices obtained from mouse brain (data not shown). While the reason for this difference is unknown, this could be related to a lower number of astrocytes in cortical vs. hypothalamic areas (Emsley and Macklis 2006) and/or differences in the expression of protein and enzymes involved in LCFA metabolism (LCFA transporters, acyl-CoA synthase and CPT-1) that may affect LCFA uptake. Nonetheless, our results are consistent with previous reports showing regional differences in palmitate oxidation and incorporation in rat (Kimes, Sweeney et al. 1983, Beverly and Martin 1991) or human brain (Karmi, Iozzo et al. 2010) and high level of palmitate incorporation in the arcuate nucleus compared to non-hypothalamic areas (Kimes, Sweeney et al. 1983) after systemic administration of radiolabeled palmitate tracers. In addition, in agreement with the former study *in vivo* (Kimes, Sweeney et al. 1983), we found here that palmitate oxidation rate in MBH and cortical slices was proportional to the rate of glucose utilization.

One limitation of our study is that malonyl-CoA levels were not measured in the different models in response to glucose. However, the decreased AMPK phosphorylation (in N46, hypothalamic astrocytes and slices) and the concomitant decrease in ACC phosphorylation in GT1-7 neurons (data not shown) and hypothalamic astrocytes in response to glucose strongly support that inhibition of palmitate oxidation is mediated via inhibition of CPT-1 by malonyl-CoA.

The degree of saturation and carbon chain length of LCFA are known to affect their metabolic fate, thus we hypothesized that oleate metabolism might be different compared to palmitate. In N46

Chapitre I

neurons, we found that oleate oxidation at low glucose was significantly lower than palmitate oxidation. However, oleate oxidation was inhibited by glucose similarly to palmitate. These findings were not replicated in MBH slices where basal oleate oxidation was similar to palmitate oxidation and remained unchanged in response to glucose suggesting that oleate oxidation is not regulated by glucose and AMPK in MBH slices. This hypothesis was confirmed by experiments showing that palmitate but not oleate oxidation was significantly decreased by CpC in MBH slices. Importantly, oleate oxidation remained unchanged in response to CPT-1 inhibition by etomoxir. This strongly suggest that palmitate oxidation is mainly mitochondrial and CPT-1 dependent while oleate is preferentially oxidized in peroxisomes where oxidation is CPT-1 independent (Islinger, Grille et al. 2012) and therefore not altered by changes in glucose concentration or AMPK activity.

All together our results demonstrate that palmitate oxidation rate is inhibited by glucose in all the models tested whereas oleate oxidation was not affected by glucose in slices. To get further insights on the effect of glucose on LCFA partitioning, we measured LCFA esterification into neutral lipids. Our results show that oleate esterification into neutral lipids was not significantly affected by glucose. In contrast, glucose increased palmitate esterification into DAG and TAG in both N46 neurons and slices as well as esterification into PL in cultured neurons. In agreement with these results, we found several isoforms of enzymes involved in DAG and TAG biosynthesis expressed in N46 neurons and up regulated in response to glucose as previously described in adipocytes and hepatocytes (Meegalla, Billheimer et al. 2002, Coleman and Lee 2004).

In hypothalamic astrocytes, despite a trend towards increased palmitate esterification into DAG in response to glucose ($p=0.07$), MAG, TAG and PL remained unchanged. Interestingly, GPAT1 and all the AGPAT and DGAT isoforms detected in N46 neurons were also expressed in hypothalamic astrocytes (data not shown) suggesting that the lack of glucose effect on DAG and TAG esterification in astrocytes is not related to differences in enzyme expression.

Combined with results showing high palmitate oxidation rates in astrocytes, this suggests that LCFA metabolism is mainly channelled towards mitochondrial oxidation in astrocytes. However, since it was not measured, we cannot rule out that oleate esterification and/or oxidation is differently regulated by glucose when compared to palmitate in astrocytes.

Our findings demonstrate that glucose-induced LCFA esterification is dependent on both LCFA and cell type. To our knowledge, this is the first study showing that glucose acutely increases LCFA esterification into DAG and TAG in hypothalamic neurons and slices. This suggests that chronic hyperglycemia and/or hyperlipidemia could lead to accumulation of lipids that may have deleterious effect on insulin sensitivity. This hypothesis is supported by recent studies showing that high-fat feeding increases hypothalamic DAG and TAG content in mice (Borg, Omran et al. 2012) and that palmitate

Chapitre I

induces insulin resistance in the arcuate nucleus (Benoit, Kemp et al. 2009) and in N44 hypothalamic neurons (Mayer and Belsham 2010). Interestingly, activation of AMPK by AICAR prevented the deleterious effect of palmitate on insulin signalling in N44 neurons (45). In light of our findings in a similar neuronal cell line, it is tempting to speculate that AMPK activation might increase palmitate oxidation while inhibiting intracellular accumulation of lipid thereby protecting neurons from palmitate-induced lipotoxicity as already demonstrated in pancreatic beta cells (El-Assaad, Buteau et al. 2003).

An important question related to our *ex vivo* results in slices is whether they are representative of *in vivo* conditions. The range of glucose concentration was chosen based on extracellular brain glucose concentrations measured *in vivo*, from 0.5 mM in hypoglycemic conditions to ~5 mM in the postprandial state (Routh 2002), and on previous electrophysiology reports studying glucose sensing on brain slices (Fioramonti, Lorsignol et al. 2004, Wang, Cruciani-Guglielmacci et al. 2006). Therefore we believe that the results described in slices may reflect *in vivo* conditions. In contrast to glucose, extracellular concentrations of LCFA in the brain are unknown. Thus, LCFA concentrations were chosen within the physiological range of circulating LCFA levels (0.1 mM). Importantly, LCFA were always pre-complexed to albumin with a LCFA/albumin molar ratio of 1 to 5. Nonetheless, this concentration might be higher compared to central LCFA level and therefore have confounding effect on intracellular metabolism.

Taken together, our findings have important implications. First, they suggest that the dissociation observed between AMPK, malonyl-CoA and LCFA-CoA levels in previous reports (Gao, Kinzig et al. 2007, Gao, Keung et al. 2011, Gao, Casals et al. 2013) might be explained by differences in LCFA-CoA metabolism in neurons versus astrocytes and/or differences in the type of LCFA. In line with this idea, it was shown that central leptin administration increases palmitoyl-CoA level without affecting oleyl-CoA level in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (Gao, Kinzig et al. 2007). In addition, they suggest that the previously described effect of malonyl-CoA decarboxylase (MCD) overexpression in the MBH, the malonyl-CoA degrading enzyme, leading to increased food intake and adiposity (Hu, Dai et al. 2005, He, Lam et al. 2006) may involve modulation of malonyl-CoA and LCFA-CoA oxidation in astrocytes and/or neurons. Our data showing a high LCFA oxidative capacity in astrocyte cultures compared to neurons support the idea of a cellular coupling between astrocytes and neurons or the so called “metabolic-sensing unit” according to which changes in LCFA oxidation in astrocytes may generate metabolic signals such as ketone bodies that in turn modulate MBH neurons activity (Levin, Magnan et al. 2011). Clearly, further investigations aimed at modulating MCD or CPT-1 activity specifically in neuronal subpopulations or astrocytes are required to assess their respective contribution in LCFA metabolism and action in the MBH *in vivo*.

Chapitre I

Second, they support the concept that central LCFA action and sensing is dependent on the nutritional status and/or glucose concentrations. Indeed, central LCFA anorexigenic action and capacity to decrease glucose production are lost after three days of overfeeding (Morgan, Obici et al. 2004, Pocai, Lam et al. 2006). At the cellular level, studies have established that the effect of oleate on neuronal activity is dependent on extracellular glucose concentrations in primary culture of ventro-medial nucleus neurons (Le Foll, Irani et al. 2009) and in arcuate neurons in brain slices (Wang, Cruciani-Guglielmacci et al. 2006). However, in the current study, glucose did not affect oleate oxidation and esterification in MBH slices suggesting that the effect of glucose on oleate action is independent of a metabolic coupling between glucose and oleate. In agreement with this idea, etomoxir had a minor effect on oleate-induced calcium mobilization in ventro-medial nucleus neurons (Le Foll, Irani et al. 2009). Thus, how glucose affects oleate-sensing in MBH neurons is still unclear and further studies are needed to assess whether glucose modulates LCFA metabolism and action in the MBH.

Third, our results provide a metabolic basis for the different effect of centrally administered LCFA on feeding (Obici, Feng et al. 2002, Schwinkendorf, Tsatsos et al. 2010). Indeed, oleate but not palmitate has an anorectic action making it tempting to speculate that such differences could be related to the difference between palmitate and oleate metabolism observed in our study.

To summarize, this is the first study investigating the partitioning of saturated (palmitate) and monounsaturated (oleate) LCFA between oxidation and esterification in response to glucose in the MBH. Our results demonstrate that glucose regulates palmitate metabolism via AMPK in hypothalamic but not cortical areas. In contrast, the metabolism of the monounsaturated LCFA oleate was not responsive to glucose suggesting that the metabolic coupling is dependent on the type of LCFA. Finally, they support the role of hypothalamic astrocytes in central glucose and LCFA action. Further studies are needed to determine the functional role of the metabolic coupling between glucose and LCFA in the control of energy balance by the hypothalamus and in the etiology of obesity and type 2 diabetes.

REFERENCES

1. Morton, G. J., Cummings, D. E., Baskin, D. G., Barsh, G. S., and Schwartz, M. W. (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* **443**, 289-295
2. Cruciani-Guglielmacci, C., Hervalet, A., Douared, L., Sanders, N. M., Levin, B. E., Ktorza, A., and Magnan, C. (2004) Beta oxidation in the brain is required for the effects of non-esterified fatty acids on glucose-induced insulin secretion in rats. *Diabetologia* **47**, 2032-2038
3. Lam, T. K., Poci, A., Gutierrez-Juarez, R., Obici, S., Bryan, J., Aguilar-Bryan, L., Schwartz, G. J., and Rossetti, L. (2005) Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis. *Nat Med* **11**, 320-327
4. Poci, A., Lam, T. K., Obici, S., Gutierrez-Juarez, R., Muse, E. D., Arduini, A., and Rossetti, L. (2006) Restoration of hypothalamic lipid sensing normalizes energy and glucose homeostasis in overfed rats. *The Journal of clinical investigation* **116**, 1081-1091
5. Benani, A., Troy, S., Carmona, M. C., Fioramonti, X., Lorsignol, A., Leloup, C., Casteilla, L., and Penicaud, L. (2007) Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: redox regulation of food intake. *Diabetes* **56**, 152-160
6. Jordan, S. D., Konner, A. C., and Bruning, J. C. (2010) Sensing the fuels: glucose and lipid signaling in the CNS controlling energy homeostasis. *Cell Mol Life Sci* **67**, 3255-3273
7. Prentki, M., Matschinsky, F. M., and Madiraju, S. R. (2013) Metabolic Signaling in Fuel-Induced Insulin Secretion. *Cell Metab*
8. Ruderman, N. B., Saha, A. K., and Kraegen, E. W. (2003) Minireview: malonyl CoA, AMP-activated protein kinase, and adiposity. *Endocrinology* **144**, 5166-5171
9. Claret, M., Smith, M. A., Batterham, R. L., Selman, C., Choudhury, A. I., Fryer, L. G., Clements, M., Al-Qassab, H., Heffron, H., Xu, A. W., Speakman, J. R., Barsh, G. S., Viollet, B., Vaulont, S., Ashford, M. L., Carling, D., and Withers, D. J. (2007) AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *The Journal of clinical investigation* **117**, 2325-2336
10. Murphy, B. A., Fakira, K. A., Song, Z., Beuve, A., and Routh, V. H. (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
11. Yang, C. S., Lam, C. K., Chari, M., Cheung, G. W., Kokorovic, A., Gao, S., Leclerc, I., Rutter, G. A., and Lam, T. K. (2010) Hypothalamic AMP-activated protein kinase regulates glucose production. *Diabetes* **59**, 2435-2443
12. Alquier, T., Kawashima, J., Tsuji, Y., and Kahn, B. B. (2007) Role of hypothalamic adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase in the impaired counterregulatory response induced by repetitive neuroglucopenia. *Endocrinology* **148**, 1367-1375
13. McCrimmon, R. J., Shaw, M., Fan, X., Cheng, H., Ding, Y., Vella, M. C., Zhou, L., McNay, E. C., and Sherwin, R. S. (2008) Key role for AMP-activated protein kinase in the ventromedial hypothalamus in regulating counterregulatory hormone responses to acute hypoglycemia. *Diabetes* **57**, 444-450
14. Hu, Z., Cha, S. H., Chohann, S., and Lane, M. D. (2003) Hypothalamic malonyl-CoA as a mediator of feeding behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12624-12629
15. Wolfgang, M. J., Cha, S. H., Sidhaye, A., Chohann, S., Cline, G., Shulman, G. I., and Lane, M. D. (2007) Regulation of hypothalamic malonyl-CoA by central glucose and leptin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19285-19290
16. Gao, S., Moran, T. H., Lopaschuk, G. D., and Butler, A. A. (2013) Hypothalamic malonyl-CoA and the control of food intake. *Physiol Behav* **122C**, 17-24

Chapitre I

17. Hu, Z., Dai, Y., Prentki, M., Chohnan, S., and Lane, M. D. (2005) A role for hypothalamic malonyl-CoA in the control of food intake. *J Biol Chem* **280**, 39681-39683
18. He, W., Lam, T. K., Obici, S., and Rossetti, L. (2006) Molecular disruption of hypothalamic nutrient sensing induces obesity. *Nature neuroscience* **9**, 227-233
19. Andrews, Z. B., Liu, Z. W., Wallingford, N., Erion, D. M., Borok, E., Friedman, J. M., Tschop, M. H., Shanabrough, M., Cline, G., Shulman, G. I., Coppola, A., Gao, X. B., Horvath, T. L., and Diano, S. (2008) UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* **454**, 846-851
20. Lopez, M., Lage, R., Saha, A. K., Perez-Tilve, D., Vazquez, M. J., Varela, L., Sangiao-Alvarellos, S., Tovar, S., Raghay, K., Rodriguez-Cuenca, S., Deoliveira, R. M., Castaneda, T., Datta, R., Dong, J. Z., Culler, M., Sleeman, M. W., Alvarez, C. V., Gallego, R., Lelliott, C. J., Carling, D., Tschop, M. H., Dieguez, C., and Vidal-Puig, A. (2008) Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metab* **7**, 389-399
21. Gao, S., Kinzig, K. P., Aja, S., Scott, K. A., Keung, W., Kelly, S., Strynadka, K., Chohnan, S., Smith, W. W., Tamashiro, K. L., Ladenheim, E. E., Ronnett, G. V., Tu, Y., Birnbaum, M. J., Lopaschuk, G. D., and Moran, T. H. (2007) Leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase to inhibit food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 17358-17363
22. Gao, S., Keung, W., Serra, D., Wang, W., Carrasco, P., Casals, N., Hegardt, F. G., Moran, T. H., and Lopaschuk, G. D. (2011) Malonyl-CoA mediates leptin hypothalamic control of feeding independent of inhibition of CPT-1a. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **301**, R209-217
23. Gao, S., Casals, N., Keung, W., Moran, T. H., and Lopaschuk, G. D. (2013) Differential effects of central ghrelin on fatty acid metabolism in hypothalamic ventral medial and arcuate nuclei. *Physiol Behav* **118**, 165-170
24. Mountjoy, P. D., and Rutter, G. A. (2007) Glucose sensing by hypothalamic neurones and pancreatic islet cells: AMPle evidence for common mechanisms? *Exp Physiol* **92**, 311-319
25. Guillod-Maximin, E., Lorsignol, A., Alquier, T., and Penicaud, L. (2004) Acute intracarotid glucose injection towards the brain induces specific c-fos activation in hypothalamic nuclei: involvement of astrocytes in cerebral glucose-sensing in rats. *Journal of neuroendocrinology* **16**, 464-471
26. Lam, T. K., Gutierrez-Juarez, R., Poca, A., and Rossetti, L. (2005) Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. *Science* **309**, 943-947
27. Marty, N., Dallaporta, M., Foretz, M., Emery, M., Tarussio, D., Bady, I., Binnert, C., Beermann, F., and Thorens, B. (2005) Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors. *The Journal of clinical investigation* **115**, 3545-3553
28. Orellana, J. A., Saez, P. J., Cortes-Campos, C., Elizondo, R. J., Shoji, K. F., Contreras-Duarte, S., Figueroa, V., Velarde, V., Jiang, J. X., Nualart, F., Saez, J. C., and Garcia, M. A. (2012) Glucose increases intracellular free Ca(2+) in tanycytes via ATP released through connexin 43 hemichannels. *Glia* **60**, 53-68
29. Lanfray, D., Arthaud, S., Ouellet, J., Compere, V., Do Rego, J. L., Leprince, J., Lefranc, B., Castel, H., Bouchard, C., Monge-Roffarello, B., Richard, D., Pelletier, G., Vaudry, H., Tonon, M. C., and Morin, F. (2013) Gliotransmission and brain glucose sensing: critical role of endozepines. *Diabetes* **62**, 801-810
30. Yi, C. X., Habegger, K. M., Chowen, J. A., Stern, J., and Tschop, M. H. (2011) A role for astrocytes in the central control of metabolism. *Neuroendocrinology* **93**, 143-149
31. Gavillet, M., Allaman, I., and Magistretti, P. J. (2008) Modulation of astrocytic metabolic phenotype by proinflammatory cytokines. *Glia* **56**, 975-989

Chapitre I

32. Kawashima, J., Alquier, T., Tsuji, Y., Peroni, O. D., and Kahn, B. B. (2012) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase is not involved in hypothalamic AMP-activated protein kinase activation by neuroglucopenia. *PloS one* **7**, e36335
33. Roudit, R., Nolan, C., Alarcon, C., Moore, P., Barbeau, A., Delghingaro-Augusto, V., Przybykowski, E., Morin, J., Masse, F., Massie, B., Ruderman, N., Rhodes, C., Poitout, V., and Prentki, M. (2004) A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli. *Diabetes* **53**, 1007-1019
34. Sanz, C., Roncero, I., Vazquez, P., Navas, M. A., and Blazquez, E. (2007) Effects of glucose and insulin on glucokinase activity in rat hypothalamus. *J Endocrinol* **193**, 259-267
35. Madadi, G., Dalvi, P. S., and Belsham, D. D. (2008) Regulation of brain insulin mRNA by glucose and glucagon-like peptide 1. *Biochemical and biophysical research communications* **376**, 694-699
36. Beall, C., Hamilton, D. L., Gallagher, J., Logie, L., Wright, K., Soutar, M. P., Dadak, S., Ashford, F. B., Haythorne, E., Du, Q., Jovanovic, A., McCrimmon, R. J., and Ashford, M. L. (2012) Mouse hypothalamic GT1-7 cells demonstrate AMPK-dependent intrinsic glucose-sensing behaviour. *Diabetologia* **55**, 2432-2444
37. Edmond, J. (1992) Energy metabolism in developing brain cells. *Can J Physiol Pharmacol* **70 Suppl**, S118-129
38. Takeuchi, K., and Reue, K. (2009) Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**, E1195-1209
39. Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y. B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Fofelle, F., Ferre, P., Birnbaum, M. J., Stuck, B. J., and Kahn, B. B. (2004) AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* **428**, 569-574
40. Han, S. M., Namkoong, C., Jang, P. G., Park, I. S., Hong, S. W., Katakami, H., Chun, S., Kim, S. W., Park, J. Y., Lee, K. U., and Kim, M. S. (2005) Hypothalamic AMP-activated protein kinase mediates counter-regulatory responses to hypoglycaemia in rats. *Diabetologia* **48**, 2170-2178
41. Kim, M. S., Park, J. Y., Namkoong, C., Jang, P. G., Ryu, J. W., Song, H. S., Yun, J. Y., Namgoong, I. S., Ha, J., Park, I. S., Lee, I. K., Viollet, B., Youn, J. H., Lee, H. K., and Lee, K. U. (2004) Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Nat Med* **10**, 727-733
42. Blazquez, C., Woods, A., de Ceballos, M. L., Carling, D., and Guzman, M. (1999) The AMP-activated protein kinase is involved in the regulation of ketone body production by astrocytes. *Journal of neurochemistry* **73**, 1674-1682
43. Edmond, J., Robbins, R. A., Bergstrom, J. D., Cole, R. A., and de Vellis, J. (1987) Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture. *J Neurosci Res* **18**, 551-561
44. Dai, Y., Wolfgang, M. J., Cha, S. H., and Lane, M. D. (2007) Localization and effect of ectopic expression of CPT1c in CNS feeding centers. *Biochemical and biophysical research communications* **359**, 469-474
45. Sierra, A. Y., Gratacos, E., Carrasco, P., Clotet, J., Urena, J., Serra, D., Asins, G., Hegardt, F. G., and Casals, N. (2008) CPT1c is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyltransferase activity. *J Biol Chem* **283**, 6878-6885
46. Price, N., van der Leij, F., Jackson, V., Corstorphine, C., Thomson, R., Sorensen, A., and Zammit, V. (2002) A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics* **80**, 433-442

Chapitre I

47. Wolfgang, M. J., Kurama, T., Dai, Y., Suwa, A., Asaumi, M., Matsumoto, S., Cha, S. H., Shimokawa, T., and Lane, M. D. (2006) The brain-specific carnitine palmitoyltransferase-1c regulates energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7282-7287
48. Gao, S., Zhu, G., Gao, X., Wu, D., Carrasco, P., Casals, N., Hegardt, F. G., Moran, T. H., and Lopaschuk, G. D. (2011) Important roles of brain-specific carnitine palmitoyltransferase and ceramide metabolism in leptin hypothalamic control of feeding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 9691-9696
49. Ramirez, S., Martins, L., Jacas, J., Carrasco, P., Pozo, M., Clotet, J., Serra, D., Hegardt, F. G., Dieguez, C., Lopez, M., and Casals, N. (2013) Hypothalamic ceramide levels regulated by CPT1C mediate the orexigenic effect of ghrelin. *Diabetes* **62**, 2329-2337
50. Kasser, T. R., Harris, R. B., and Martin, R. J. (1985) Level of satiety: fatty acid and glucose metabolism in three brain sites associated with feeding. *The American journal of physiology* **248**, R447-452
51. Beverly, J. L., and Martin, R. J. (1991) Influence of fatty acid oxidation in lateral hypothalamus on food intake and body composition. *The American journal of physiology* **261**, R339-343
52. Emsley, J. G., and Macklis, J. D. (2006) Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glia Biol* **2**, 175-186
53. Kimes, A. S., Sweeney, D., London, E. D., and Rapoport, S. I. (1983) Palmitate incorporation into different brain regions in the awake rat. *Brain Res* **274**, 291-301
54. Karmi, A., Iozzo, P., Viljanen, A., Hirvonen, J., Fielding, B. A., Virtanen, K., Oikonen, V., Kempainen, J., Viljanen, T., Guiducci, L., Haaparanta-Solin, M., Nagren, K., Solin, O., and Nuutila, P. (2010) Increased brain fatty acid uptake in metabolic syndrome. *Diabetes* **59**, 2171-2177
55. Islinger, M., Grille, S., Fahimi, H. D., and Schrader, M. (2012) The peroxisome: an update on mysteries. *Histochem Cell Biol* **137**, 547-574
56. Meegalla, R. L., Billheimer, J. T., and Cheng, D. (2002) Concerted elevation of acyl-coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) activity through independent stimulation of mRNA expression of DGAT1 and DGAT2 by carbohydrate and insulin. *Biochemical and biophysical research communications* **298**, 317-323
57. Coleman, R. A., and Lee, D. P. (2004) Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res* **43**, 134-176
58. Borg, M. L., Omran, S. F., Weir, J., Meikle, P. J., and Watt, M. J. (2012) Consumption of a high-fat diet, but not regular endurance exercise training, regulates hypothalamic lipid accumulation in mice. *J Physiol* **590**, 4377-4389
59. Benoit, S. C., Kemp, C. J., Elias, C. F., Abplanalp, W., Herman, J. P., Migrenne, S., Lefevre, A. L., Cruciani-Guglielmacci, C., Magnan, C., Yu, F., Niswender, K., Irani, B. G., Holland, W. L., and Clegg, D. J. (2009) Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents. *The Journal of clinical investigation* **119**, 2577-2589
60. Mayer, C. M., and Belsham, D. D. (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
61. El-Assaad, W., Buteau, J., Peyot, M. L., Nolan, C., Roduit, R., Hardy, S., Joly, E., Dbaibo, G., Rosenberg, L., and Prentki, M. (2003) Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. *Endocrinology* **144**, 4154-4163
62. Routh, V. H. (2002) Glucose-sensing neurons: are they physiologically relevant? *Physiol Behav* **76**, 403-413

Chapitre I

63. Fioramonti, X., Lorsignol, A., Taupignon, A., and Penicaud, L. (2004) A new ATP-sensitive K⁺ channel-independent mechanism is involved in glucose-excited neurons of mouse arcuate nucleus. *Diabetes* **53**, 2767-2775
64. Wang, R., Cruciani-Guglielmacci, C., Migrenne, S., Magnan, C., Coterio, V. E., and Routh, V. H. (2006) Effects of oleic acid on distinct populations of neurons in the hypothalamic arcuate nucleus are dependent on extracellular glucose levels. *J Neurophysiol* **95**, 1491-1498
65. Levin, B. E., Magnan, C., Dunn-Meynell, A., and Le Foll, C. (2011) Metabolic sensing and the brain: who, what, where, and how? *Endocrinology* **152**, 2552-2557
66. Morgan, K., Obici, S., and Rossetti, L. (2004) Hypothalamic responses to long-chain fatty acids are nutritionally regulated. *J Biol Chem* **279**, 31139-31148
67. Le Foll, C., Irani, B. G., Magnan, C., Dunn-Meynell, A. A., and Levin, B. E. (2009) Characteristics and mechanisms of hypothalamic neuronal fatty acid sensing. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **297**, R655-664
68. Obici, S., Feng, Z., Morgan, K., Stein, D., Karkanias, G., and Rossetti, L. (2002) Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* **51**, 271-275
69. Schwinkendorf, D. R., Tsatsos, N. G., Gosnell, B. A., and Mashek, D. G. (2010) Effects of central administration of distinct fatty acids on hypothalamic neuropeptide expression and energy metabolism. *Int J Obes (Lond)* **35**, 336-344

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Mireille Bélanger for her precious help setting up the astrocyte cultures. We thank Drs Vincent Poitout, Marc Prentki, Murthy Madiraju and Xavier Fioramonti for critical discussion and reading of the manuscript and Dr Pamela Mellon for providing the GT1-7 neuronal cell line.

FOOT NOTES

*This project was supported by grants to TA from the Canadian Institutes of Health Research (MOP115042), Fonds de Recherche Quebec-Sante, Societe Francophone du Diabete, Diabete Quebec and Canadian Foundation for Innovation. BT was supported by a doctoral fellowship from Diabete Quebec and University of Montreal.

^aMontreal Diabetes Research Center, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Universite de Montreal (CRCHUM), and Departments of ^bPathology and Cell Biology, ^cBiochemistry, ^dPhysiology, ^eNutrition and ^fMedicine, University of Montreal, Montreal, QC, Canada

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Neuropeptides and metabolic enzymes expression profiles in GT1-7 and N46 hypothalamic neurons.

Neuropeptides (A) and enzymes (B) expression was determined by qPCR and mRNA levels were normalized to 18S levels. Agouti-related Protein (AgRP), Neuropeptide Y (NPY), proopiomelanocortin (POMC), carnitine-palmitoyl transferase 1 (CPT-1), Acetyl-CoA carboxylase (ACC), Fatty acid synthase (FAS), Malonyl-CoA decarboxylase (MCD), Pyruvate dehydrogenase 1 (PDH1). Results are shown as means \pm SEM. N= 3 to 5 performed in duplicate. Statistical analyses were performed with one-way ANOVA with Bonferroni post-tests. *, ** and ***, $p < 0.05$, 0.01 and 0.001 respectively.

Figure 2: Glucose inhibits LCFA oxidation via AMPK in hypothalamic neuronal cell lines.

Palmitate oxidation (A), glucose utilization (B) and oxidation (C) in response to increasing glucose concentrations or etomoxir ($200 \mu\text{M}$) in GT1-7 neurons. Palmitate oxidation (D), glucose utilization (E) and oxidation (F) in response to increasing glucose concentrations or etomoxir ($200 \mu\text{M}$) in N46 neurons. Western blot (G), quantitation of Thr172 Phospho-AMPK levels (H) and palmitate oxidation (I) in N46 neurons treated with glucose \pm Compound C (CpC, $25 \mu\text{M}$) or AICAR (1 mM). Oleate oxidation (J) in response to glucose in N46 neurons. Results are shown as means \pm SEM. N= 3 to 6 independent experiments with each condition performed in duplicate for intracellular metabolism measurements. N= 3-4 independent experiments for western blot analyses. Statistical analyses were performed with one-way ANOVA with Bonferroni post-tests except for oleate oxidation (unpaired Student *t*-test). *, ** and ***, $p < 0.05$, 0.01 and 0.001 respectively vs. 1 mM Glucose. ##, $p < 0.01$ vs. 15 mM glucose.

Figure 3: Glial Fibrillary Acidic Protein and metabolic enzymes expression profiles in hypothalamic and cortical astrocytes.

Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) and DAPI immunostaining (A) in cortical (left) and hypothalamic (right) astrocytes. (B) Enzymes expression was determined by qPCR and mRNA levels were normalized to 18S levels. Carnitine-palmitoyl transferase 1 (CPT-1), Acetyl-CoA carboxylase (ACC), Fatty acid synthase (FAS), Malonyl-CoA decarboxylase (MCD), Pyruvate dehydrogenase 1 (PDH1). Results are shown as means \pm SEM. N= 5 performed in duplicate. Statistical analyses were performed with one-way ANOVA with Bonferroni post-tests. *, ** and ***, $p < 0.05$, 0.01 and 0.001 respectively. ###, $p < 0.001$ vs. CPT-1a and 1b.

Figure 4: Glucose decreases palmitate oxidation via AMPK in hypothalamic but not cortical astrocytes.

Palmitate oxidation (A), glucose utilization (B) and oxidation (C) in response to glucose or etomoxir ($200 \mu\text{M}$) in hypothalamic and cortical astrocyte cultures. Western blot (D) and quantitation of Thr172 P-AMPK and Ser79 P-ACC levels (E) in hypothalamic and cortical astrocytes. Palmitate oxidation (F) in response to glucose \pm AICAR (1 mM) in hypothalamic and cortical astrocytes. Results are shown as means \pm SEM. N= 4 to 7 independent experiments with each condition performed in duplicate for intracellular metabolism measurements. N= 3 independent experiment for western blot analyses. Statistical analyses were performed with one-way ANOVA with Bonferroni post-tests. *, ** and ***, $p < 0.05$, 0.01 and 0.001 respectively vs. 1 mM Glucose.

Figure 5: Glucose inhibits palmitate but not oleate oxidation in hypothalamic slices.

Basal and KCl-stimulated NPY secretion in MBH slices (A). Palmitate oxidation (B) in MBH slices and peripheral tissues. Palmitate oxidation (C) in MBH and cortical slices \pm etomoxir (200

Chapitre I

μM). Palmitate oxidation in MBH (D) and cortical (E) slices in response to increasing concentrations of glucose. Glucose utilization (F) in MBH and cortical slices. Western blot (G) and quantitation of Thr172 Phospho-AMPK levels (H) in response to glucose in MBH and cortical slices. Oleate oxidation (I) in response to glucose in MBH slices. Palmitate and oleate oxidation (J) in MBH slices at 1 mM glucose treated or not with Compound C (CpC, 25 μM). Oleate oxidation (K) in MBH slices at 1 mM glucose \pm etomoxir (200 μM). Results are shown as means \pm SEM. N= 4-5 per condition for western blots, 5-6 per condition for glucose utilization and 8-14 animals per condition for palmitate and oleate oxidation. Statistical analyses were performed with one-way ANOVA with Bonferroni post-tests except for oleate oxidation and quantitation of AMPK phosphorylation (unpaired Student *t*-test). *, ** and ***, $p < 0.05$, 0.01 and 0.001 respectively vs. 0.5, 1mM Glucose or vehicle. \$\$, $p < 0.01$ vs. MBH.

Figure 6: Glucose regulation of hypothalamic LCFA esterification into neutral lipids.

LCFA esterification into Monoacylglycerol, MAG; diacylglycerol, DAG; triacylglycerol, TAG; non-esterified fatty acid, NEFA and phospholipids, PL. Esterification of palmitate and/or oleate in N46 neurons (A), hypothalamic astrocytes (B) and MBH slices (C) in response to glucose. Results are shown as means \pm SEM. N= 4 to 6 independent experiments with each condition performed in duplicate for esterification in cultured cells and N=11 to 14 animals per condition for esterification in slices. Statistical analyses were performed with one-way ANOVA with Bonferroni post-tests. * and ***, $p < 0.05$ and 0.001 respectively vs. 1mM Glucose. \$, \$\$ and \$\$\$, $p < 0.05$, 0.01 and 0.001 respectively vs. Palmitate.

Figure 7: Glucose increases the expression of esterification enzymes in N46 neurons.

Gene expression was determined by qPCR in N46 neurons following 24 h exposure to 1 or 15 mM glucose. mRNA levels were normalized to 18S levels. Glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT), 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase (AGPAT) and diacylglycerol acyltransferase (DGAT). Results presented are means \pm SEM from 3 separate studies performed in duplicate. Statistical analyses were performed with unpaired Student *t*-test. * and ***, $p < 0.05$ and 0.001 respectively vs. 1mM Glucose.

Chapitre I

TABLE 1 Primers used for real-time quantitative PCR

Gene	Forward	Reverse
NPY	<i>ctccgctctgcgacactaca</i>	<i>aatcagtgctcagggctgga</i>
AgRP	<i>tgctactcccgttcttcaa</i>	<i>ctttgcccaacaacatcca</i>
POMC	<i>aggcctgacacgtggaagat</i>	<i>aggcaccagctccacacat</i>
Cpt-1a	<i>gaggaccctgaggcatctat</i>	<i>gaatgctctgcgtttatgcc</i>
Cpt-1b	<i>ccggaaaggtatggccaactt</i>	<i>gaagaaaatgctgtcgcgcc</i>
Cpt1-c	<i>tccgatggggcagaagtaga</i>	<i>agtcattccagacacgccag</i>
Acc1	<i>atgtccgcactgactgtaacc</i>	<i>tccatagccgacttccatagc</i>
Acc2	<i>tctgatgaggaccctagtgc</i>	<i>acatgctgggcctcatagtag</i>
Fasn	<i>gtgatagccggtatgtcggg</i>	<i>tagagcccagccttccatct</i>
Med	<i>agaagatcagcagtggtgagg</i>	<i>agtcagagccacatgcagaac</i>
Gk	<i>atcttctgttccacggagagg</i>	<i>gatgttaaggatctgccttcg</i>
Glut2	<i>ccaggtccaatcccttggtt</i>	<i>cccaaggaagtccgcaatgt</i>
Pdha1	<i>accagagaggtatgggctcaa</i>	<i>aggcttctgaccatcacac</i>
Pdha2	<i>atcagcaacaacctcagcaat</i>	<i>ggttctggatcagtcgtagca</i>
Dgat1	<i>ggatctgaggtgccatcgtc</i>	<i>atcagcatcaccacacacca</i>
Dgat2	<i>catcatcgtggtgggaggtg</i>	<i>tgggaaccagatcagctccat</i>
Gpat1	<i>cggaactgaactggagaagtg</i>	<i>gatgaattgctggtgctcctt</i>
Gpat2	<i>aagactgagccggcatgttc</i>	<i>gtgacaggaccacacccttt</i>
Agpat1	<i>gacagagatacagccagccg</i>	<i>gtcatttctggtaacctca</i>
Agpat2	<i>tacccaaggctcggctctta</i>	<i>accagctgatgatgctcatgt</i>
Agpat3	<i>aggaaaacacctgtccacgg</i>	<i>actgagaacagccgtccaag</i>
Agpat4	<i>gtgcttgcgagatggtgtcc</i>	<i>atggggatcctccgaacgta</i>
Agpat5	<i>accggggtccagatattgct</i>	<i>gcatgtccgcaacaatccag</i>
Agpat6	<i>ctactacgcatggtgggac</i>	<i>ggtggcgatctttcacctca</i>
Agpat7	<i>cccggctactcaaatgtct</i>	<i>ttggcataaagggtggggctc</i>
Agpat8	<i>gcggtgtcagaatcatggtg</i>	<i>cggctgctaataccagcgata</i>

FIGURE 1

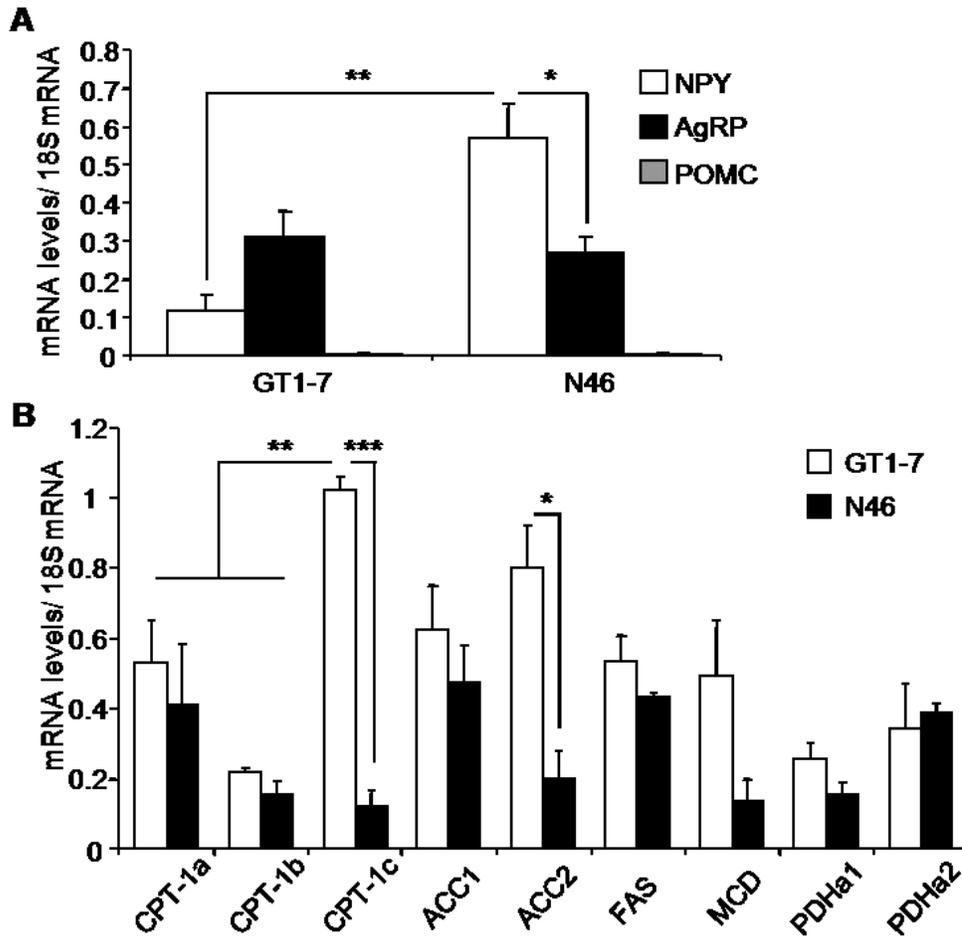


FIGURE 2

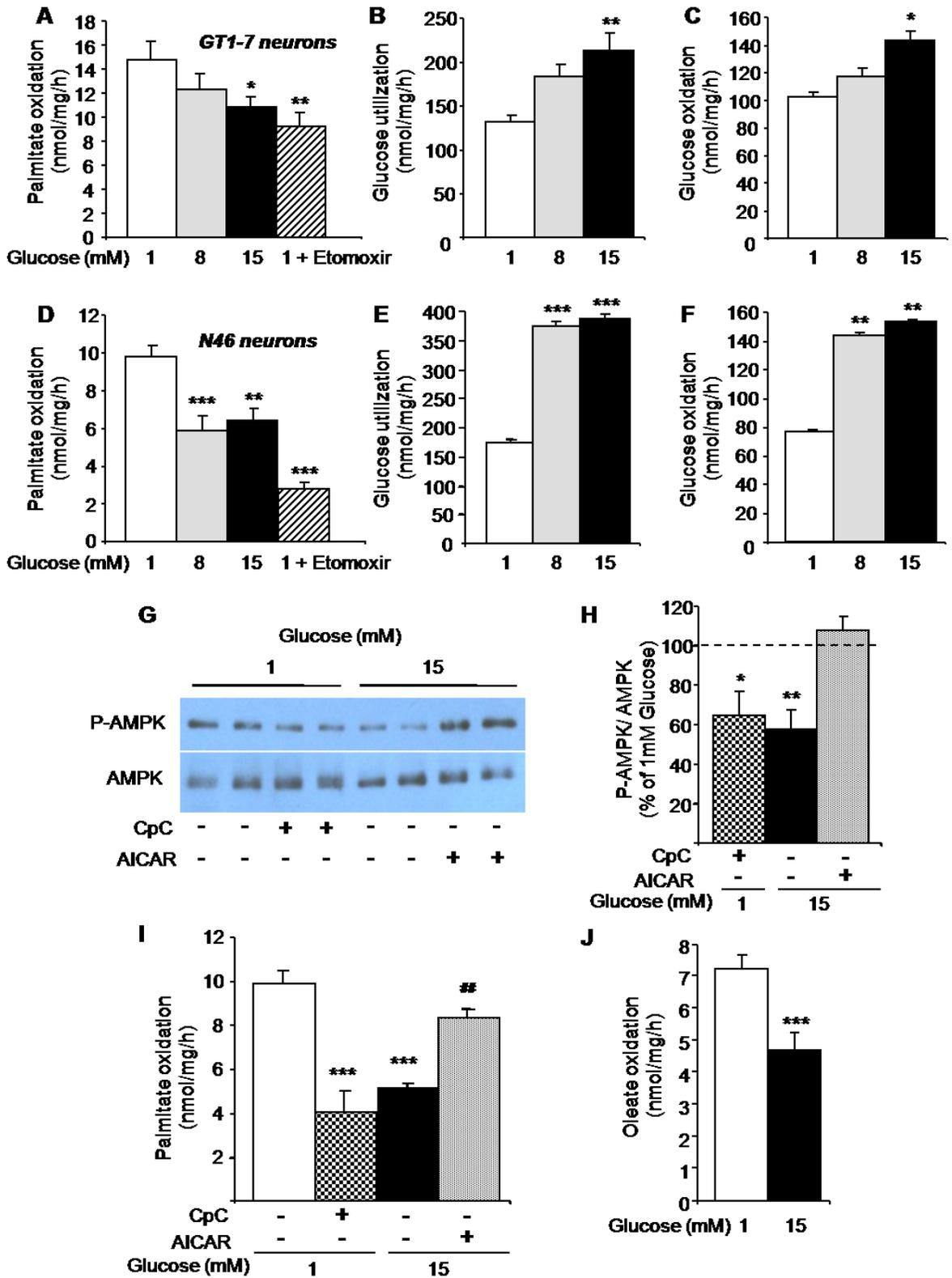


FIGURE 3

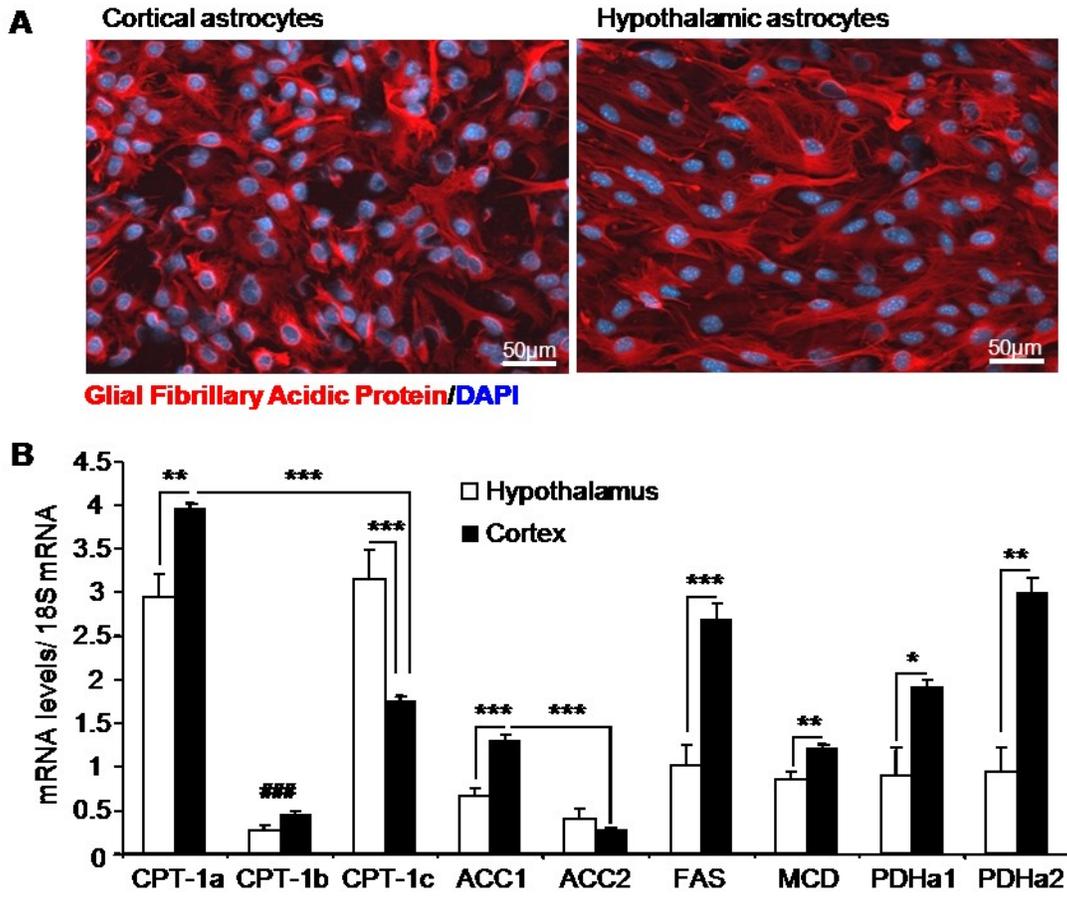
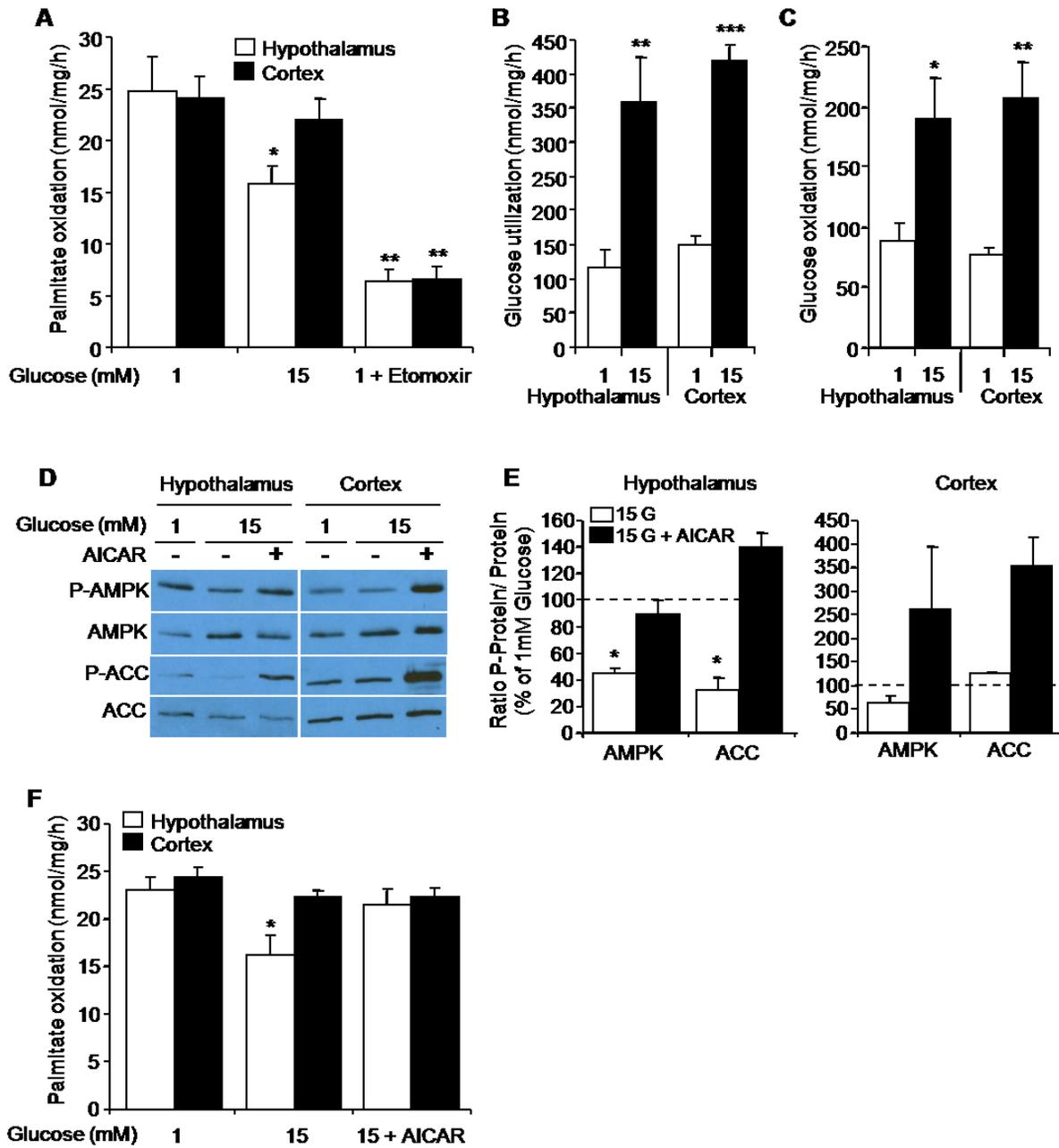


FIGURE 4



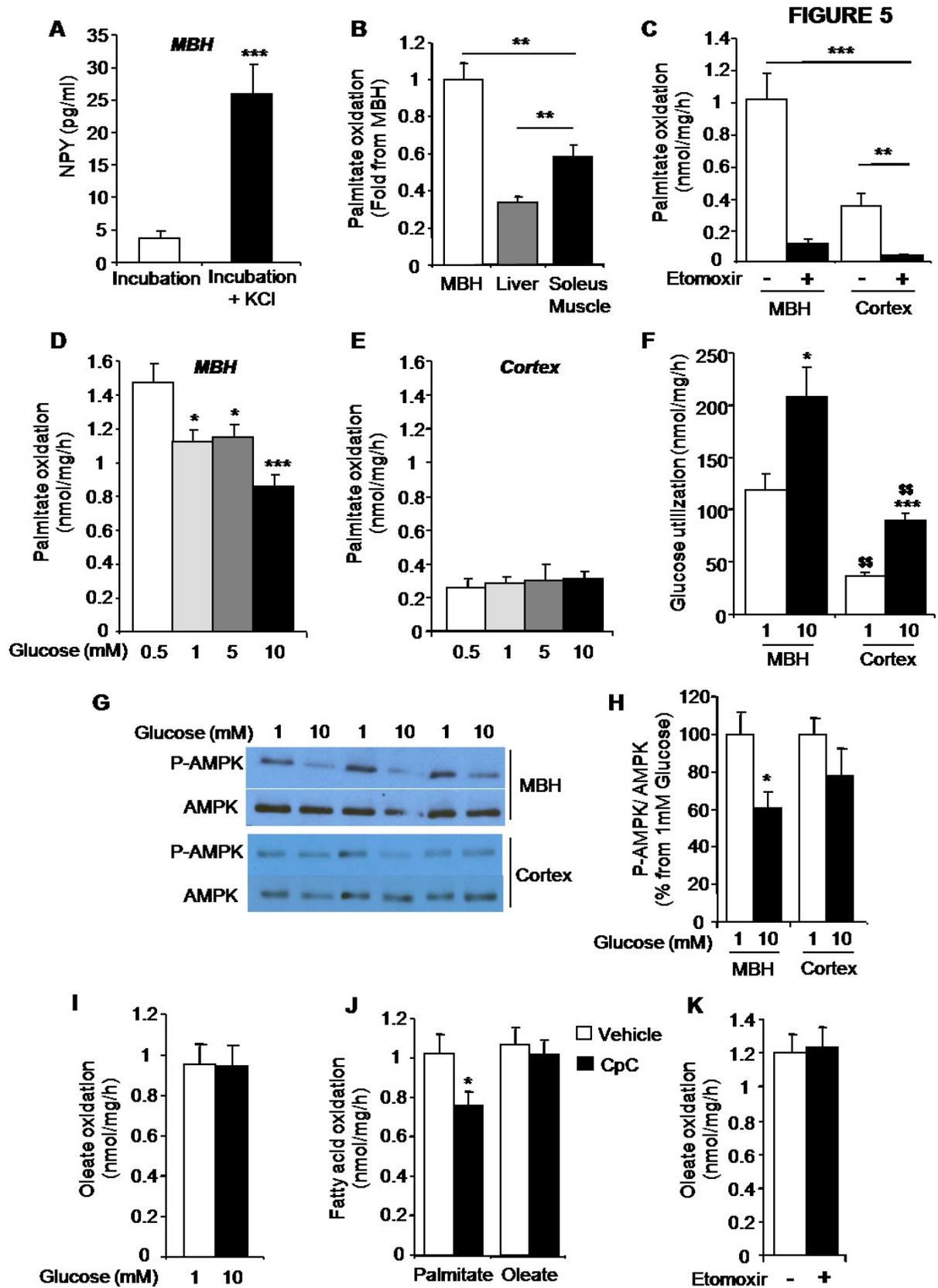


FIGURE 6

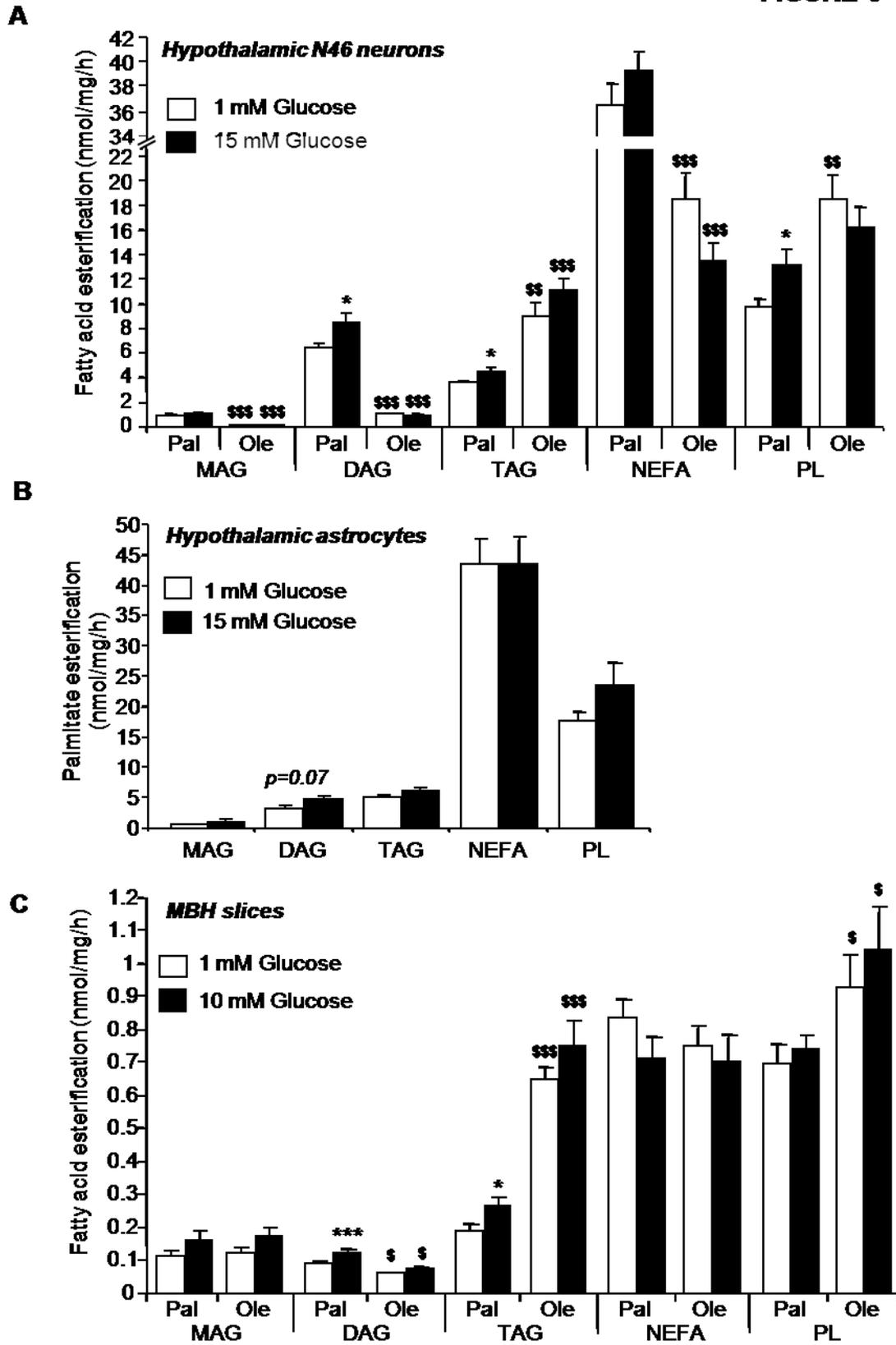
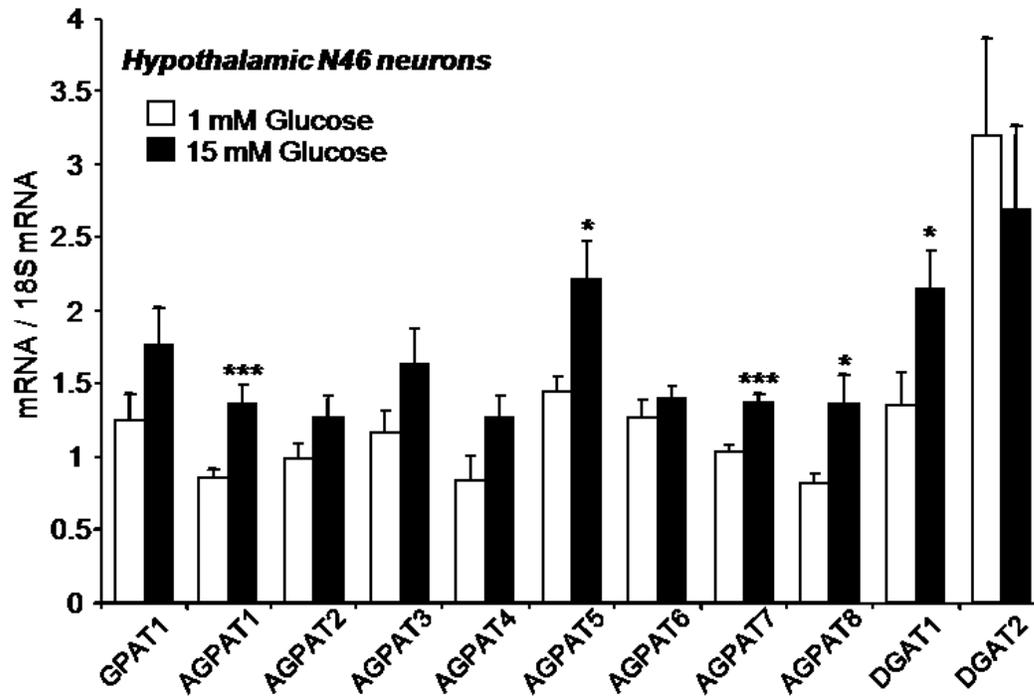


FIGURE 7



Chapitre II

**Nouveau Rôle d'ACBP (Acyl-CoA Binding Protein)
comme régulateur du métabolisme des acides gras
à longue-chaine dans les astrocytes.**

Chapitre II

Mise en contexte

Durant le deuxième volet de cette thèse, on s'est particulièrement intéressé au rôle de la protéine ACBP dans le métabolisme des acides gras au niveau du système nerveux central.

La réalisation de ce projet a été menée en collaboration avec l'étudiant en thèse Khalil Bouyakdan et a impliquée l'utilisation d'une lignée de souris transgénique ACBP nulles, que nous avons obtenu en collaboration avec le laboratoire du Dr S. Mandrup au Danemark (University of Southern Denmark).

Ainsi, l'objectif de la présente étude était de déterminer l'implication d'ACBP dans la régulation du métabolisme des LCFA dans les régions hypothalamiques et extra-hypothalamiques et dans les cultures primaires des astrocytes. À cette fin, nous avons utilisé une combinaison des astrocytes mis en culture et des explants hypothalamiques provenant de souris ACBP nulles pour mesurer d'abord les niveaux des LCFA-CoA ainsi que la partition du métabolisme des LCFA entre l'oxydation et l'estérification.

Nos résultats obtenus montrent que la délétion d'ACBP modifie le profil des LCFA-CoA dans le cerveau, altère l'oxydation et l'estérification de l'oléate mais pas celles du palmitate dans les astrocytes hypothalamiques et les explants du MBH, suggérant ainsi que l'effet d'ACBP sur la régulation du métabolisme des LCFA est dépendant du type de ces derniers.

Ces données établissent un nouveau rôle d'ACBP dans le cerveau et soutiennent son implication dans la détection hypothalamique et les effets anorexigènes de l'oléate, l'ensemble des résultats sera discuté ultérieurement.

Chapitre II

Titre: A novel role for DBI/ACBP as a regulator of long-chain fatty acid metabolism in astrocytes

Auteurs : Khalil Bouyakdan*, Bouchra Taïb* Lionel Budry, Shangang Zhao, Demetra Rodaros, Ditte Neess, Susanne Mandrup, Nils. J. Faergeman, and Thierry Alquier

*: Co-auteurs principaux à contribution égale

Soumis au journal : J Neurochem, juin 2014.

Contribution des auteurs :

Bouchra TAIB : Co-auteure principale. A participé à la conception et la réalisation des expériences, à l'analyse des données et à la rédaction du manuscrit.

Khalil bouyakdan : Auteur principal. A élaboré les hypothèses, conçu et réalisé les expériences et a analysé les données et rédigé le manuscrit.

Lionel Budry: Coauteur. A réalisé le marquage par immunofluorescence.

Shangang Zhao: Coauteur. A aidé pour les mesures d'estérification

Demetra Rodaros: Coauteure. A apporté de l'aide technique pour la réalisation des cultures des astrocytes et le maintien des colonies des souris ACBP.

Ditte Neess : Coauteure, a participé aux mesures des Acyl CoAs *in vivo*

Susanne Mandrup : Coauteure et collaborateur. A fournit les souris nulles ACBP.

Nils. J. Faergeman: Coauteure et collaborateur a aidé à la réalisation et les analyses des mesures des acyl-coA

Thierry Alquier: Directeur de thèse. A dirigé tout le projet et rédigé le manuscrit.

A novel role for DBI/ACBP as a regulator of long-chain fatty acid metabolism in astrocytes

Khalil Bouyakdan^{a,c,#}, Bouchra Taïb^{a,b,#}, Lionel Budry^{a,d}, Shangang Zhao^{a,c}, Demetra Rodaros^a, Ditte Neess¹, Susanne Mandrup¹, Nils. J. Faergeman¹, and Thierry Alquier^{a,b,c,d,2}

^aMontreal Diabetes Research Center, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montreal (CRCHUM), and Departments of ^bPathology and Cell Biology, ^cBiochemistry, and ^dMedicine, University of Montreal, Montreal, QC, Canada. ¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Southern Denmark University, DK-5230 Odense M, Denmark.

FOOT NOTES

*This project was supported by grants to TA from the Canadian Institutes of Health Research (MOP115042), Fonds de Recherche Quebec-Sante, Societe Francophone du Diabete and Canadian Foundation for Innovation. BT was supported by a doctoral fellowship from Diabete Quebec and University of Montreal.

#Authors contributed equally to this work.

ABBREVIATIONS: ACBP, Acyl-CoA Binding Protein; ACC, Acetyl-CoA Carboxylase; CPT, Carnitine palmitoyl transferase; DAG, Diacylglycerol; DBI, Diazepam Binding Inhibitor; DGAT, diacylglycerol acyltransferase; FA, Fatty acids; FABP, Fatty acid binding protein; FAS, Fatty acid synthase; GFAP, Glial Fibrillary Acidic Protein; GPAT, Glycerol-3-phosphate acyltransferase; LCFA, Long-chain fatty acid; MBH, mediobasal hypothalamus; NEFA, non-esterified fatty acid; ODN, octadecaneuropeptide; PL, phospholipids; SCD1, Stearoyl-CoA desaturase 1; TAG, triacylglycerol.

Keywords: Hypothalamus, astrocytes, fatty acid oxidation, fatty acid esterification, palmitate, oleate.

ABSTRACT

Acyl-CoA Binding Protein (ACBP) is a ubiquitously expressed protein that binds intracellular acyl-CoA esters with high specificity and affinity. Several studies suggest that ACBP acts as an acyl-CoA pool former and regulates long-chain fatty acids (LCFA) metabolism in peripheral tissues. In the brain, ACBP is known as Diazepam Binding Inhibitor, a secreted peptide acting as an allosteric modulator of the GABA_A receptor. However, its role in central LCFA metabolism remains unknown. The aim of this study was to assess the central expression pattern of ACBP, determine if ACBP regulates LCFA intracellular metabolism and the expression of genes involved in lipid metabolism using brain regions, slices and primary astrocytes derived from ACBP-deficient mice. While ACBP was observed in scattered neurons, its expression was mainly found in astrocytes with high expression levels in the mediobasal hypothalamus. We show that ACBP deficiency alters the central LCFA-CoA profile and impairs oleate but not palmitate oxidation and esterification both in hypothalamic slices *ex vivo* and astrocyte cultures. In addition, we found decreased expression of genes involved in fatty acid synthesis in ACBP deficient astrocytes. Collectively, these findings reveal for the first time that central ACBP acts as a regulator of LCFA intracellular metabolism in astrocytes.

Chapitre II

INTRODUCTION

The neural regulation of energy homeostasis mainly relies on the hypothalamus and its capacity to detect circulating nutritional signals such as glucose and long-chain fatty acids (LCFA) (Morton *et al.* 2006). Hypothalamic action of LCFA to modulate glucose homeostasis and food intake is dependent on LCFA esterification in LCFA-CoA but the metabolic pathways and cell type(s) involved remain elusive (Lam *et al.* 2009).

Once transported into the cell, LCFA are esterified in LCFA-CoA and bound to Acyl-CoA Binding Protein (ACBP), a highly conserved 10 kDa protein (Burton *et al.* 2005). ACBP is ubiquitously expressed, with high expression levels in tissues with an active lipid metabolism such as the liver and adipose tissues (Faergeman *et al.* 2007), and has a high affinity and specificity for medium and LCFA-CoAs (Rosendal *et al.* 1993). In agreement with its biochemical properties, ACBP deficiency decreases the intracellular LCFA-CoA pool while ACBP overexpression has the opposite effect in yeast (Knudsen *et al.* 1994) and mouse (Huang *et al.* 2005). In addition, gain- and loss-of-function studies in yeast, *C. elegans* and mouse have shown that ACBP is required for LCFA esterification into triglycerides and phospholipids as well as oxidation (Gaigg *et al.* 2001, Huang *et al.* 2005, Elle *et al.* 2011). Finally, ACBP *null* mice have a delayed metabolic adaptation to weaning and impaired epidermal barrier due to altered lipid composition in the skin (Neess *et al.* 2011, Bloksgaard *et al.* 2012, Neess *et al.* 2013). Collectively, these studies support a key role for ACBP in LCFA-CoA pool formation and metabolism in peripheral tissues.

ACBP is also found throughout the brain with high expression levels in several regions including the hypothalamus (Malagon *et al.* 1993). Interestingly, ACBP is known in neurosciences as Diazepam Binding Inhibitor (DBI) for its ability to inhibit the binding of diazepam on the benzodiazepine receptor of the GABA_A receptor complex (Guidotti *et al.* 1983). For this reason, ACBP and its proteolytic peptide products, octadecaneuropeptide (ODN) and triakontatetrapeptide, are termed endozepines.

At the cellular level, ACBP expression has been reported in neurons (Alho *et al.* 1985) and glial cells (Lanfray *et al.* 2013) and its secretion is induced by several stimuli in cultured astrocytes (Tokay *et al.* 2008, Loomis *et al.* 2010). ACBP and its fragments stimulate neurosteroids synthesis (Do Rego *et al.* 2012) and neurogenesis (Alfonso *et al.* 2012) by acting as negative allosteric modulators of the GABA_A receptor. In addition, central administration of ODN induces anxiety, proconflict behaviour (Guidotti *et al.* 1983) and inhibits feeding and body weight

Chapitre II

gain (Lanfray et al. 2013). Together, these studies and others (Christian *et al.* 2013) suggest that endozepines act as gliotransmitters modulating neuronal activity by targeting GABA_A signalling. Despite this knowledge, whether or not endogenously expressed ACBP regulates LCFA-CoA levels and metabolic fate in the brain and astrocytes is still unknown.

Importantly, astrocytes are known to be the main cell type metabolizing LCFA in the brain (reviewed by (Guzman & Blazquez 2001)). In addition, mounting evidences suggest that hypothalamic astrocytes play a key role in the regulation of energy balance by detecting circulating metabolic signals (reviewed by (Chowen *et al.* 2013)) including LCFA (Le Foll *et al.* 2014). We recently showed high LCFA oxidative capacity in hypothalamic astrocytes and a glucose-dependent regulation of LCFA oxidation in hypothalamic but not cortical astrocytes (Taib *et al.* 2013). This supports the idea that hypothalamic astrocytes are metabolically equipped to sense nutrients and that ACBP may play a role in LCFA sensing by regulating their metabolism in astrocytes.

Thus, the goal of the present study was to determine whether or not ACBP regulates LCFA metabolism in hypothalamic and non-hypothalamic regions and cultured astrocytes. To this end, we used a combination of cultured astrocytes and hypothalamic slices derived from ACBP *null* mice to measure LCFA-CoA levels and LCFA partitioning between oxidation and esterification.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents

Culture media and serum were from Wisent. Radioactive tracers were from PerkinElmer Life Sciences, and all other reagents were from Sigma unless otherwise noted.

Animals

ACBP homozygous knockout (KO) mice were kindly donated by Dr Susanne Mandrup (Nees et al. 2011). Animals were housed on a 12-h light/dark cycle at 21 °C with free access to water and standard chow diet. All procedures were approved by the Institutional Committee for the Protection of Animals. ACBP heterozygous knockout (Het) mice were bred to generate ACBP wild-type (WT), Het and homozygous KO. One-day old pups and mice were genotyped from tail clippings as described (Bloksgaard et al. 2012).

Chapitre II

Immunohistochemistry

Mice were perfused intracardially with 4% formaldehyde under ketamine/xylazine anesthesia. The brains were post-fixed in 4% formaldehyde, cryopreserved in 20% sucrose and cut into 14 μ m serial sections with a cryostat (Leica). Sections were blocked and incubated with primary antibodies overnight at 4°C followed by incubation for 1 h at room temperature with secondary antibodies. Sections were mounted and analyzed with a Zeiss fluorescent microscope. Primary antibodies used were anti-ACBP (1:100, kind gift from Dr Mandrup), anti- glial fibrillary acidic protein (GFAP, Millipore, Mab360, 1:100) and anti-NeuN (Millipore, Mab377, 1:100). Secondary antibodies were Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG and Alexa Fluor® 546 Goat Anti-Mouse IgG (Life Technologies, 1:150).

Astrocyte Cultures and Immunocytochemistry

Cultures of hypothalamic and cortical astrocytes were prepared from 1-day-old ACBP WT, Het and KO pups as described (Taib et al. 2013). Immunocytochemistry on astrocytes was performed as previously described (Taib et al. 2013) using the anti-ACBP and anti-GFAP as detailed in the immunohistochemistry section. Our cultures contain ~90% of GFAP-positive cells (Taib et al. 2013).

Western Blot Analysis

Total protein (25 μ g) from ACBP WT, Het and KO mice and cultured astrocytes was resolved on an acrylamide gel and transferred to a PVDF membrane (Bio-Rad). Blots were performed as previously described (Taib et al. 2013) using an anti-ACBP (1:1000, Santa-Cruz) or Actin (1:200000, Sigma) primary antibody.

Brain LCFA-CoA levels

LCFA-CoA analysis was performed by HPLC as previously described (Just *et al.* 2006). Hypothalami and cortices were rapidly dissected from male ACBP WT and KO fed mice (5 weeks old) at the onset of the light cycle and immediately frozen.

Hypothalamic Slices

Hypothalamic slices were generated from ACBP WT and KO mice (4 weeks old) using modification of a protocol previously used for rat brain slices (Taib et al. 2013). Three 300- μ m-thick sections containing the hypothalamus were cut using a Vibratome while being continuously immersed in ice-cold cutting solution. The mediobasal hypothalamus (MBH) was dissected on each section as previously described (Taib et al. 2013).

LCFA Oxidation and Esterification in Astrocytes and Slices

The measurement of LCFA oxidation and esterification in astrocyte cultures and MBH slices was performed using ^{14}C - and ^3H -labeled oleate and palmitate tracers as previously described (Taib et al. 2013). LCFA oxidation was measured in presence of 1 mM glucose in astrocytes and slices whereas esterification was measured with 10 mM (slices) or 15 mM glucose (astrocytes). The results were normalized by cell or slice protein content.

Real-time PCR

Total RNA were extracted from cortical astrocytes and reverse-transcribed before real-time PCR using primers as previously described (Taib et al. 2013). Data were analyzed using the standard curve method and normalized to cyclophilin expression levels.

Statistics

Data are expressed as the means \pm SEM. Intergroup comparisons were performed by one-way ANOVA with Bonferroni post-tests or by Student's *t* test when comparing two conditions. $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Expression pattern of ACBP

The initial studies of Costa demonstrated that ACBP is expressed in neurons of the rodent brain (Alho et al. 1985). In contrast, recent studies reported either an exclusive expression in glial cells and ependymocytes (Lanfray et al. 2013) or expression in both neurons and astrocytes (Christian & Huguenard 2013). We took advantage of the ACBP *null* mice to assess the cellular pattern of ACBP expression in the mediobasal hypothalamus (MBH). First, ACBP expression in the MBH

Chapitre II

is reduced by ~ 50% in ACBP Het and absent in KO mice as expected (Fig 1A). Second, ACBP protein level is significantly higher in the MBH compared to cortical regions (Fig 1B). Third, at the cellular level, while ACBP immunofluorescence was observed in scattered neurons of the MBH (NeuN-positive cells, Fig 1D), most of the signal was detected in GFAP-positive cells in the MBH, median eminence and tanycytes and ependymocytes lining the 3rd ventricle (Fig 1C). ACBP immunofluorescence was absent in MBH slices from ACBP KO mice (Fig 1D). In cortical regions, a similar pattern was observed with ACBP expressed in GFAP-positive cells and scattered neurons (not shown). Finally, in cultured hypothalamic astrocytes, ACBP was detected in ~ 90% of GFAP-positive cells (Fig 1C). Thus, while ACBP is expressed in few MBH and cortical neurons, its expression is mainly localized in astrocytes and ependymocytes in agreement with previous studies (Christian & Huguenard 2013, Lanfray et al. 2013).

ACBP deficiency alters LCFA-CoA profile and oleate metabolism

Given the role of ACBP as a LCFA-CoA pool former (Faergeman et al. 2007), we assessed the impact of ACBP deficiency on LCFA-CoA levels in the brain using HPLC. Unlike what was observed in the liver of ACBP KO mice (Neess 2011), we observed no general decrease acyl-CoA levels in the cortical and hypothalamic regions of these mice. While palmitoyl- (C16) and oleyl-CoA (C18:1) levels were similar in WT and KO brain regions, stearoyl-CoA (C18) level was significantly increased in the cortical and hypothalamic regions of ACBP KO mice (Fig 2A & B). Although surprising, a similar increase in stearoyl-CoA has been observed after depletion of ACBP in yeast (Gaigg et al. 2001). The present observation could result from a central compensatory mechanism and/or changes in circulating levels and type of LCFA in ACBP *null* mice. Also, we cannot rule out that other acyl-CoA species or total acyl-CoA level is decreased in ACBP KO brains. Nevertheless, these results show that ACBP deficiency perturbs LCFA-CoA profile in the brain.

Since LCFA-CoA levels do not necessarily reflect changes in LCFA metabolic fluxes, we measured oxidation and esterification rates of different type of LCFA, palmitic acid (C16) and oleic acid (C18:1) in hypothalamic slices and cultured astrocytes. These LCFA were chosen because they are the most abundant circulating LCFA and we previously reported a differential metabolic fate of palmitate and oleate in the hypothalamus (Taib et al. 2013).

In MBH slices and hypothalamic astrocytes derived from ACBP WT, Het and KO mice, palmitate oxidation was not affected by the deletion of ACBP (Fig 2C & D). In contrast, oleate oxidation was significantly decreased by ~ 20% in MBH slices (Fig 2E) and ~50% in cortical and

Chapitre II

hypothalamic astrocytes (Fig 2F). The specific decrease in oleate oxidation is somehow consistent with previous reports in *C. elegans* (Elle et al. 2011) in which ACBP-2 KO lead to decreased oleate and increased palmitate oxidation. The specific alteration of oleate oxidation observed here could be explained by a lower ACBP affinity for palmitate vs. oleate. In addition, we previously shown that oleate oxidation is peroxisomal rather than mitochondrial compared to palmitate in hypothalamic slices (Taib et al. 2013). Thus, ACBP might shuttle oleyl-CoA to the peroxisome to undergo oxidation.

To determine whether alteration of oleate oxidation translates into changes in esterification, we measured the incorporation of palmitate and oleate into neutral lipids including diacylglycerol (DAG), triacylglycerol (TAG), non-esterified FA (NEFA) and phospholipids (PL) using TLC in MBH slices and astrocyte cultures derived from ACBP WT and KO mice. Palmitate was mainly esterified into TAG and PL in astrocytes. However, its esterification was not affected in MBH slices (not shown) and hypothalamic astrocytes derived from ACBP KO animals (Fig 3A). Oleate incorporation into TAG and PL was generally higher compared to palmitate in astrocytes (Fig 3). In cortical astrocytes, oleate esterification was not affected by ACBP deficiency (Fig 3B) whereas its esterification into TAG and PL was significantly decreased in ACBP KO hypothalamic astrocytes. Although the reason for the difference between cortical and hypothalamic astrocytes is unclear, it is possible that oleate metabolism is more dependent on ACBP in hypothalamic versus cortical astrocytes. In line with this idea, oleate oxidation was decreased in hypothalamic ACBP Het astrocytes while it was unaffected in ACBP Het cortical astrocytes compared to WT cells (Fig 2F). Nonetheless, the decreased oleate esterification in ACBP-deficient hypothalamic astrocytes is in agreement with previous studies showing that ACBP downregulation in *C. elegans* lead to a decreased TAG content (Elle et al. 2011) while its overexpression increased LCFA esterification into TAG and PL in mouse liver (Huang et al. 2005).

ACBP deficiency alters the expression of genes involved in LCFA synthesis

We assessed the impact of ACBP deficiency on the expression profile of genes involved in LCFA intracellular binding (Fatty Acid Binding 7; FABP7), synthesis (Acetyl-CoA Carboxylase, ACC; Fatty Acid Synthase, FAS), desaturation (Stearoyl-CoA Desaturase 1, SCD1), oxidation (Carnitine Palmitoyl Transferase-1a, CPT-1a) and esterification (Glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT; diacylglycerol acyltransferase, DGAT) in cortical astrocytes. First, the expression of CPT-1a, the enzyme responsible of LCFA-CoA mitochondrial transport to undergo

Chapitre II

oxidation, and of TAG biosynthesis, GPAT and DGAT, were not affected by ACBP deficiency suggesting that the alteration of oleate oxidation and esterification is not related to changes in gene expression. Second, FABP7, ACC1 and FAS were significantly decreased in KO astrocytes suggesting that ACBP deficiency may affect the intracellular binding and the synthesis of LCFA. The latter is in agreement with previous results showing decreased expression of ACC and FAS in the liver of pre-weaned ACBP *null* mice (Nees *et al.* 2011).

Altogether, our results show that ACBP deficiency alters the profile of LCFA-CoA in the brain, impairs LCFA oxidation and esterification in a LCFA type dependent manner both in MBH slices and astrocyte cultures and may affect LCFA synthesis in astrocytes. The alteration of both oleate oxidation and esterification in hypothalamic astrocytes suggest that ACBP may play an important role in this region. Hypothalamic LCFA action to inhibit feeding and hepatic glucose production mainly relies on their intracellular metabolism (Lam *et al.* 2009). Importantly, the effect of LCFA on food intake is dependent on the type of LCFA. Indeed, oleate but not palmitate has an anorectic action *in vivo*. The current findings showing that ACBP specifically affect oleate but not palmitate metabolism in the hypothalamus combined with previous studies highlighting the contribution of hypothalamic astrocytes in LCFA metabolism (Taib *et al.* 2013) and sensing (Le Foll *et al.* 2014) make it tempting to speculate that ACBP may be involved in central oleate action on feeding. Further studies using astrocyte-specific ACBP loss of function will be required to address this hypothesis.

More generally, our findings suggest that ACBP may regulate the metabolism of other type of FA in the CNS including polyunsaturated FA and very LCFA as recently demonstrated in the skin (Bloksgaard *et al.* 2012). If so, ACBP could play an important role in central processes and functions regulated by these FA including neurogenesis, neuroinflammation, and cognition (reviewed by (Haast & Kiliaan 2014)).

In summary, our study demonstrates that ACBP, a peptide known so far as an allosteric modulator of the GABA_A receptor in the CNS, acts as a regulator of LCFA intracellular metabolism in glial cells. These findings open new research avenues related to its involvement in CNS lipid metabolism and functions.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Drs Marc Prentki and Murthy Madiraju for critical discussions.

Chapitre II

REFERENCES

- Alfonso, J., Le Magueresse, C., Zuccotti, A., Khodosevich, K. and Monyer, H. (2012) Diazepam binding inhibitor promotes progenitor proliferation in the postnatal SVZ by reducing GABA signaling. *Cell stem cell*, **10**, 76-87.
- Alho, H., Costa, E., Ferrero, P., Fujimoto, M., Cosenza-Murphy, D. and Guidotti, A. (1985) Diazepam-binding inhibitor: a neuropeptide located in selected neuronal populations of rat brain. *Science*, **229**, 179-182.
- Bloksgaard, M., Bek, S., Marcher, A. B. et al. (2012) The acyl-CoA binding protein is required for normal epidermal barrier function in mice. *Journal of lipid research*, **53**, 2162-2174.
- Burton, M., Rose, T. M., Faergeman, N. J. and Knudsen, J. (2005) Evolution of the acyl-CoA binding protein (ACBP). *The Biochemical journal*, **392**, 299-307.
- Chowen, J. A., Argente, J. and Horvath, T. L. (2013) Uncovering novel roles of nonneuronal cells in body weight homeostasis and obesity. *Endocrinology*, **154**, 3001-3007.
- Christian, C. A., Herbert, A. G., Holt, R. L., Peng, K., Sherwood, K. D., Pangratz-Fuehrer, S., Rudolph, U. and Huguenard, J. R. (2013) Endogenous positive allosteric modulation of GABA(A) receptors by diazepam binding inhibitor. *Neuron*, **78**, 1063-1074.
- Christian, C. A. and Huguenard, J. R. (2013) Astrocytes potentiate GABAergic transmission in the thalamic reticular nucleus via endozepine signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, 20278-20283.
- Do Rego, J. L., Seong, J. Y., Burel, D. et al. (2012) Regulation of neurosteroid biosynthesis by neurotransmitters and neuropeptides. *Frontiers in endocrinology*, **3**, 4.
- Elle, I. C., Simonsen, K. T., Olsen, L. C., Birck, P. K., Ehmsen, S., Tuck, S., Le, T. T. and Faergeman, N. J. (2011) Tissue- and paralogue-specific functions of acyl-CoA-binding proteins in lipid metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *The Biochemical journal*, **437**, 231-241.
- Faergeman, N. J., Wadum, M., Feddersen, S., Burton, M., Kragelund, B. B. and Knudsen, J. (2007) Acyl-CoA binding proteins; structural and functional conservation over 2000 MYA. *Molecular and cellular biochemistry*, **299**, 55-65.
- Gaigg, B., Neergaard, T. B., Schneiter, R. et al. (2001) Depletion of acyl-coenzyme A-binding protein affects sphingolipid synthesis and causes vesicle accumulation and membrane defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, **12**, 1147-1160.
- Guidotti, A., Forchetti, C. M., Corda, M. G., Konkel, D., Bennett, C. D. and Costa, E. (1983) Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 3531-3535.
- Guzman, M. and Blazquez, C. (2001) Is there an astrocyte-neuron ketone body shuttle? *Trends Endocrinol Metab*, **12**, 169-173.
- Haast, R. A. and Kiliaan, A. J. (2014) Impact of fatty acids on brain circulation, structure and function. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*.
- Huang, H., Atshaves, B. P., Frolov, A., Kier, A. B. and Schroeder, F. (2005) Acyl-coenzyme A binding protein expression alters liver fatty acyl-coenzyme A metabolism. *Biochemistry*, **44**, 10282-10297.
- Just, M., Faergeman, N. J., Knudsen, J., Beck-Nielsen, H. and Gaster, M. (2006) Long-chain Acyl-CoA is not primarily increased in myotubes established from type 2 diabetic subjects. *Biochimica et biophysica acta*, **1762**, 666-672.
- Knudsen, J., Faergeman, N. J., Skott, H. et al. (1994) Yeast acyl-CoA-binding protein: acyl-CoA-binding affinity and effect on intracellular acyl-CoA pool size. *The Biochemical journal*, **302 (Pt 2)**, 479-485.

Chapitre II

- Lam, C. K., Chari, M. and Lam, T. K. (2009) CNS regulation of glucose homeostasis. *Physiology*, **24**, 159-170.
- Lanfray, D., Arthaud, S., Ouellet, J. et al. (2013) Gliotransmission and brain glucose sensing: critical role of endozepines. *Diabetes*, **62**, 801-810.
- Le Foll, C., Dunn-Meynell, A. A., Mizioro, H. M. and Levin, B. E. (2014) Regulation of hypothalamic neuronal sensing and food intake by ketone bodies and fatty acids. *Diabetes*, **63**, 1259-1269.
- Loomis, W. F., Behrens, M. M., Williams, M. E. and Anjard, C. (2010) Pregnenolone sulfate and cortisol induce secretion of acyl-CoA-binding protein and its conversion into endozepines from astrocytes. *J Biol Chem*, **285**, 21359-21365.
- Malagon, M., Vaudry, H., Van Strien, F., Pelletier, G., Gracia-Navarro, F. and Tonon, M. C. (1993) Ontogeny of diazepam-binding inhibitor-related peptides (endozepines) in the rat brain. *Neuroscience*, **57**, 777-786.
- Morton, G. J., Cummings, D. E., Baskin, D. G., Barsh, G. S. and Schwartz, M. W. (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, **443**, 289-295.
- Neess, D., Bek, S., Bloksgaard, M., Marcher, A. B., Faergeman, N. J. and Mandrup, S. (2013) Delayed hepatic adaptation to weaning in ACBP^{-/-} mice is caused by disruption of the epidermal barrier. *Cell reports*, **5**, 1403-1412.
- Neess, D., Bloksgaard, M., Bek, S. et al. (2011) Disruption of the acyl-CoA-binding protein gene delays hepatic adaptation to metabolic changes at weaning. *J Biol Chem*, **286**, 3460-3472.
- Rosendal, J., Ertbjerg, P. and Knudsen, J. (1993) Characterization of ligand binding to acyl-CoA-binding protein. *The Biochemical journal*, **290 (Pt 2)**, 321-326.
- Taib, B., Bouyakdan, K., Hryhorczuk, C., Rodaros, D., Fulton, S. and Alquier, T. (2013) Glucose Regulates Hypothalamic Long-chain Fatty Acid Metabolism via AMP-activated Kinase (AMPK) in Neurons and Astrocytes. *J Biol Chem*, **288**, 37216-37229.
- Tokay, T., Hachem, R., Masmoudi-Kouki, O. et al. (2008) Beta-amyloid peptide stimulates endozepine release in cultured rat astrocytes through activation of N-formyl peptide receptors. *Glia*, **56**, 1380-1389.

FIGURES LEGEND

Figure 1: ACBP expression in the brain and astrocyte cultures. ACBP expression was determined by Western Blotting (A) and quantified (B) in the MBH and cortex of ACBP WT, Het and KO mice. Co-localization of ACBP immunofluorescence in GFAP- (C) and NeuN positive cells (D) on MBH coronal sections from ACBP WT and KO mice. (E) ACBP and GFAP immunofluorescence in WT (top) and KO (bottom) astrocyte cultures. ME, median eminence; 3V, third ventricle. Results are means \pm SEM. N=4. *** $p < 0.001$.

Figure 2: ACBP deficiency alters LCFA-CoA levels and impairs oleate oxidation. LCFA-CoA levels in (A) cortex and (B) hypothalamus of WT and KO mice. Palmitate (C, D) and Oleate (E, F) oxidation rates in WT, Het and KO MBH slices (D, E) and primary astrocyte cultures (D, F). Results are means \pm SEM. N=4-9 for LCFA-CoA levels, N=8-10 for palmitate oxidation and N=10-12 for oleate oxidation. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Figure 3: ACBP deficiency alters oleate but not palmitate esterification in hypothalamic astrocytes. (A) Palmitate esterification in hypothalamic astrocytes and (B) oleate esterification into DAG, TAG, NEFA and PL in astrocytes derived from WT and KO mice. N=5-10 for palmitate and N=7-10 for oleate esterification. * $p < 0.05$ vs. WT and \$\$ $p < 0.01$ vs. WT cortical astrocytes.

Figure 4: ACBP deficiency alters the expression profile of genes involved in LCFA metabolism. Gene expression was determined by qPCR in cortical astrocytes. mRNA levels were normalized to cyclophilin levels. Results are means \pm SEM with N = 6 to 15. * $p < 0.05$.

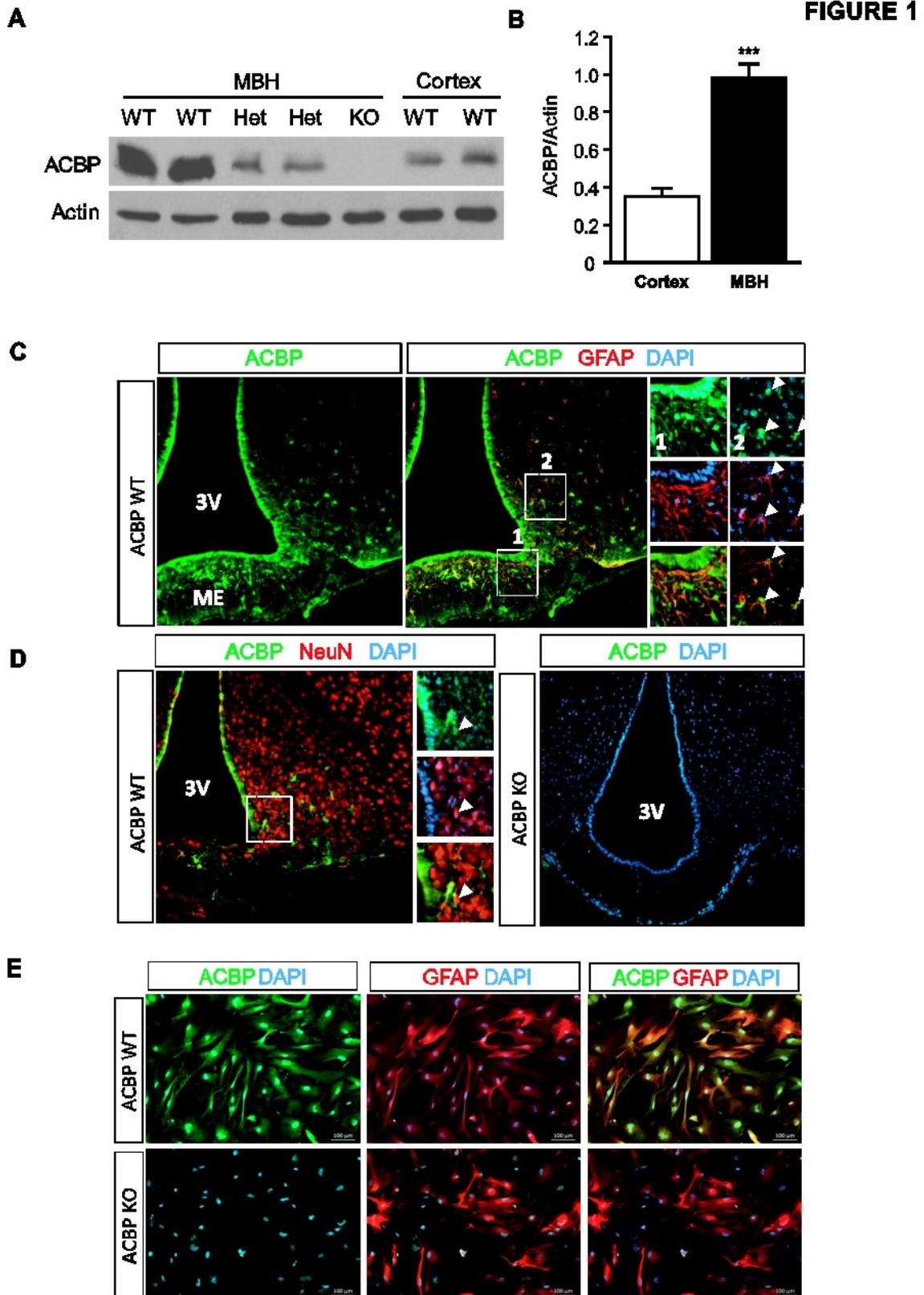


FIGURE 2

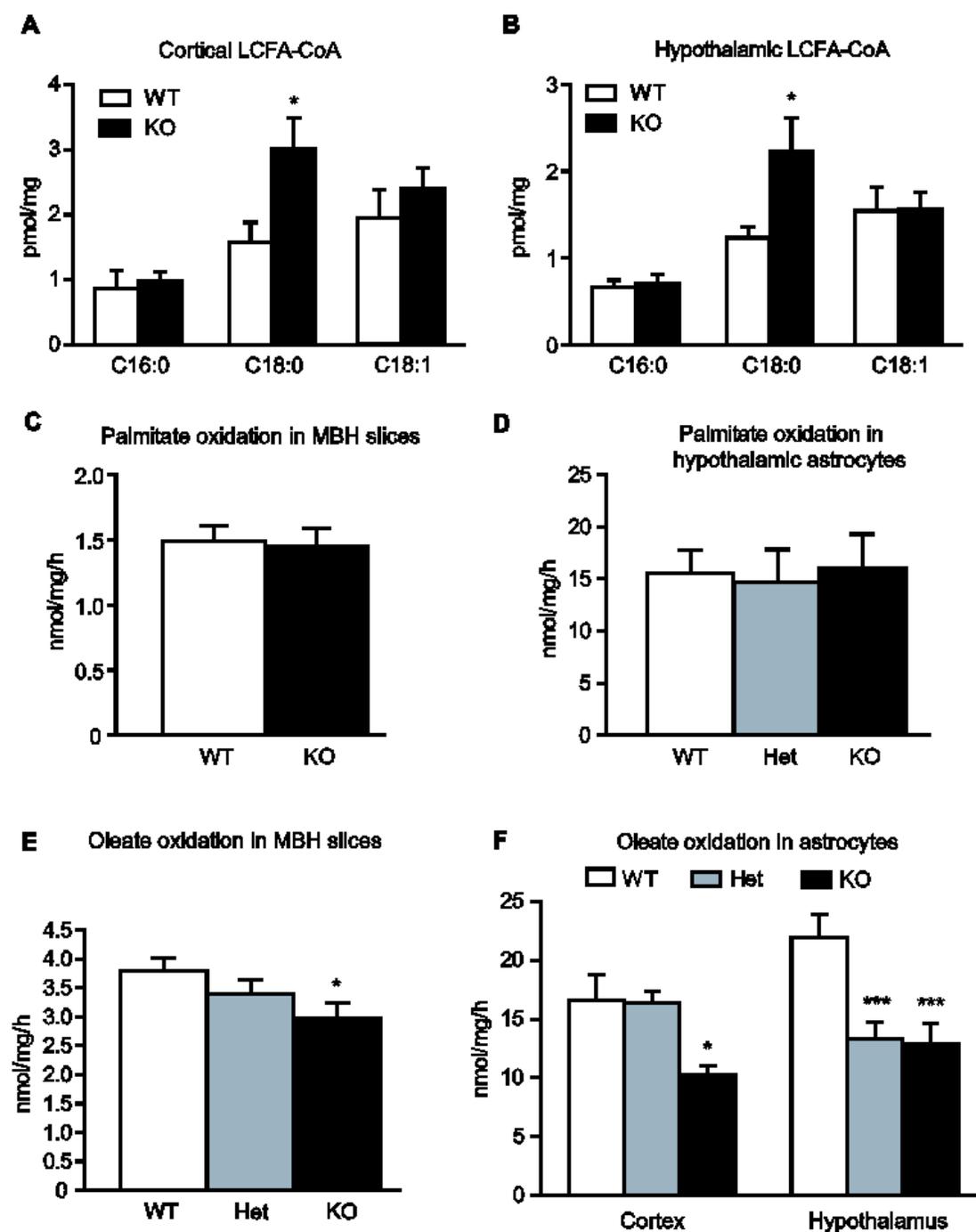


FIGURE 3

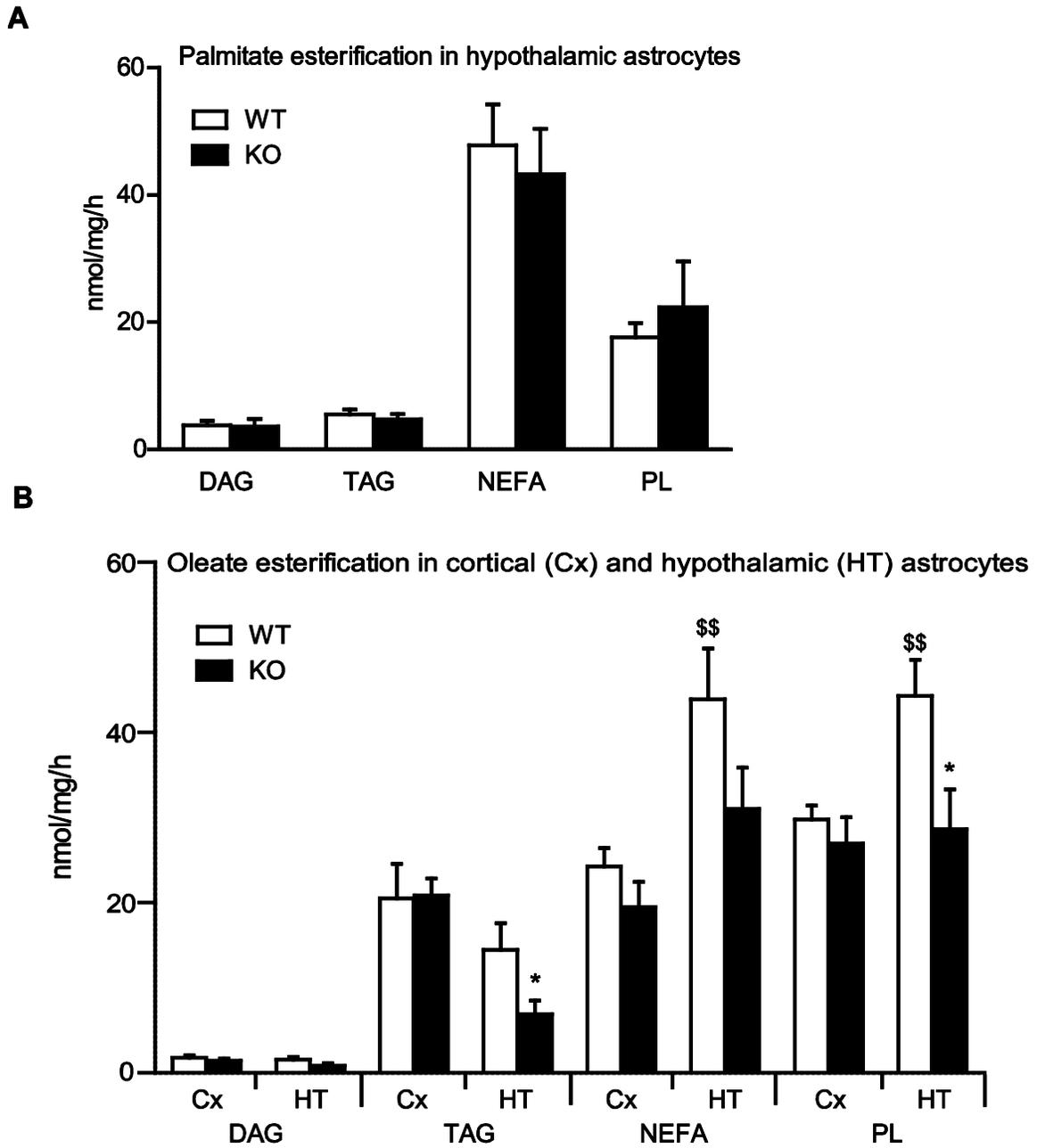
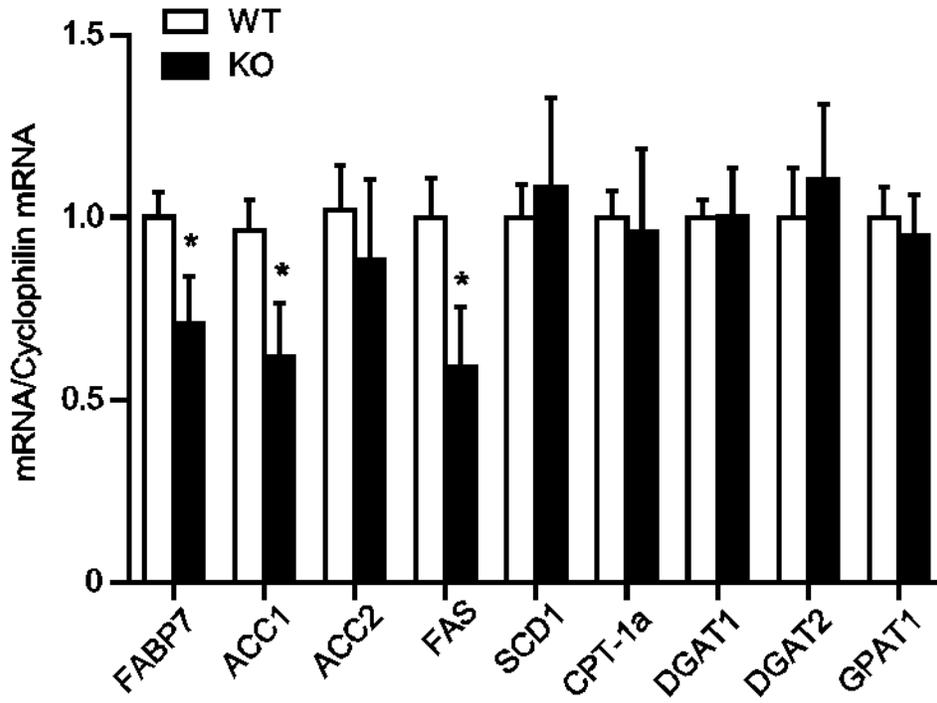


FIGURE 4



Discussion générale

Discussion générale

Au niveau périphérique, la production d'énergie cellulaire nécessite un approvisionnement en nutriments incluant le glucose, les acides gras ainsi que les acides aminés. Par ailleurs, ces nutriments constituent aussi des signaux impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique via différents mécanismes de détection au niveau des tissus et organes périphériques.

Au niveau central, pendant longtemps, seul le glucose était considéré comme principal carburant, succédé par les corps cétoniques en période de déficit énergétique tel que le jeûne (Morris 2005). Ainsi, le rôle des acides gras est resté restreint à leur fonction en tant que simples molécules de structure (Haast and Kiliaan 2014). Depuis, différents travaux ont permis de mettre en évidence des multiples effets potentiels des acides gras dans différentes fonctions cérébrales (Hussain, Schmitt et al. 2013).

Dans ce contexte, plusieurs études se sont intéressées au rôle des acides gras insaturés, incluant les MUFA et les PUFA, constituants majeurs des huiles végétales présentes dans l'alimentation quotidienne (Arsenault, Julien et al. 2012). Ainsi, il a été montré que des régimes alimentaires enrichis en n-3 PUFA à des stades périnataux chez des femelles gestantes sont essentiels pour le développement du système glutamatergique ainsi qu'un comportement normal chez la progéniture adulte (Coluccia, Borracci et al. 2009). Une supplémentation de la diète avec des PUFA au stade gestationnel et jusqu'à 90 jours après la naissance, améliore respectivement les fonctions de mémoire et la coordination des mouvements à l'âge adulte (Moreira, Knorr et al. 2010). Globalement, de nombreux effets positifs des n-3 PUFA ont été notés, notamment du DHA, pouvant contribuer à améliorer la transmission synaptique, l'apprentissage spatial, et la mémoire (Connor, Tenorio et al. 2012). En revanche, dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, il a été montré, *in vitro*, que les acides gras saturés tels que l'acide palmitique et l'acide stéarique, en comparaison avec les MUFA et les n3-PUFA, déclenchent une formation plus élevée du peptide Bêta-Amyloid (A β) (Amtul, Uhrig et al. 2011). Des souris soumises à un régime enrichi en n-3PUFA, principalement en DHA, ont affiché une réduction

Discussion générale

importante de l'accumulation des taux du peptide A β ainsi que des plaques amyloïdes dans leurs cerveaux (Amtul, Uhrig et al. 2011).

Par ailleurs, les acides gras semblent aussi agir au niveau central comme antidépresseurs et anticonvulsivants, et confèrent une protection contre les lésions traumatiques (Hussain, Schmitt et al. 2013). Au niveau cellulaire, les acides gras stimulent l'activité neuronale, la synaptogenèse, ainsi que la neurogenèse (Hussain, Schmitt et al. 2013).

Globalement, il est admis qu'un excès des acides gras saturés, et dans une certaine mesure, les n-6PUFA auraient des conséquences négatives alors que les MUFA et les n-3PUFA exercent plutôt des effets bénéfiques. Il importe de noter que bien que les concentrations cérébrales des MUFA et des PUFA reflètent leur apport nutritionnel, ces deux acides gras ne semblent pas s'accumuler de la même manière au niveau du cerveau (Arsenault, Julien et al. 2012). En effet, en comparaison avec les PUFA, une forte consommation des MUFA, augmente leur concentration cérébrale de seulement 2 % (Arsenault, Julien et al. 2012).

Finalement, depuis les premiers travaux d'Oomura (Oomura, Nakamura et al. 1975), de multiples études suggéraient le rôle central des acides gras et leur métabolites dans les régions du cerveau impliquées dans la régulation de l'équilibre énergétique, incluant le tronc cérébral et l'hypothalamus (Blouet and Schwartz 2010, Migrenne, Le Foll et al. 2011).

L'ensemble des travaux menés dans le cadre de cette thèse vient donc consolider l'hypothèse du rôle du métabolisme des acides gras au niveau central dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Ils s'articulent autour de deux volets principaux :

La première étude visait d'abord à établir au sein de l'hypothalamus médio-basal l'existence d'une régulation du métabolisme des acides gras, incluant le palmitate, comme acide gras saturé et l'oléate en tant qu'acide gras mono-insaturé, par le glucose. Puis de tester si cette régulation existe dans les deux principaux types

Discussion générale

cellulaires, les neurones et les astrocytes, et si elle implique des mécanismes AMPK dépendants. Nos résultats ont permis de mettre en évidence l'existence d'un couplage entre le métabolisme du glucose et des acides gras au niveau central. Ce couplage est à la fois dépendant du type d'acides gras, saturé versus insaturé, du type des cellules cérébrales, neurones versus astrocytes, et finalement de la région cérébrale, MBH versus cortex.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à déterminer les mécanismes intracellulaires impliqués dans le métabolisme des acyl CoAs, plus particulièrement le rôle de la protéine de liaison ACBP dans le métabolisme central des acides gras. Les résultats obtenus nous ont permis de conclure, notamment, que l'oxydation de l'oléate et non du palmitate est dépendante de la protéine ACBP dans les astrocytes hypothalamiques ainsi que les explants du MBH. De la même façon, l'estérification de l'oléate et non du palmitate diminue dans les astrocytes des souris nulles pour ACBP. Ainsi l'ensemble de nos résultats démontrent que la régulation du métabolisme des acides gras par ACBP est à son tour dépendante du type d'acides gras.

Choix et développement des approches expérimentales

Tel qu'il a été expliqué auparavant, les lignées neuronales murines GT1-7 et N46 utilisées dans notre première étude se caractérisent respectivement par la sécrétion des neuropeptides AGRP et NPY.

Notre choix d'utiliser ces deux lignées cellulaires pour étudier le métabolisme intracellulaire des acides gras et du glucose était fondé sur des études préalables démontrant les capacités de ces deux lignées neuronales à détecter le glucose (Beall, Hamilton et al. 2012) (Madadi, Dalvi et al. 2008).

En complément de notre modèle cellulaire, une mesure directe de l'oxydation des acides gras, *in vivo*, aurait constitué une meilleure approche pour compléter nos résultats obtenus *in vitro* et *ex vivo*. Dans ce contexte, plusieurs études ont été réalisées antérieurement visant à quantifier le métabolisme cérébral des acides gras *in vivo*, entre autre, on note les études utilisant le marquage au carbone ^{13}C suivit de

Discussion générale

spectrométrie de masse (Menard, Goodman et al. 1998, Cunnane, Nadeau et al. 2001). L'utilisation de l'acétate ^{13}C comme précurseur spécifique du métabolisme glial a permis de fournir des données importantes sur l'interrelation entre les neurones et les cellules gliales (Morris and Bachelard 2003).

L'inconvénient de l'utilisation du carbone ^{13}C *in vivo* est que le signal ^{13}C est intrinsèquement faible. De plus, la forte concentration de carbone dans les triglycérides du tissu adipeux, généralement masque le signal plus faible des phospholipides présents dans certains tissus, tels que le cerveau. Les auteurs mentionnaient aussi la difficulté d'obtenir des données cohérentes entre les animaux (Cunnane, Nadeau et al. 2001).

Par ailleurs, des mesures d'oxydation du palmitate dans des régions hypothalamiques de cerveau de rats, en utilisant du palmitate ^{14}C , ont été réalisées *ex vivo* par *Martin et al* (Beverly and Martin 1991), on note aussi les travaux de *Rapoport et al* mesurant le flux du palmitate par autoradiographie quantitative en suivant l'incorporation du palmitate ^{14}C dans différentes régions cérébrales de rats éveillés suite à l'injection iv du palmitate ^{14}C . (Kimes, Sweeney et al. 1983, Miller, Gnaedinger et al. 1987).

Dans le cas de notre étude, un des avantages les plus importants d'utiliser cette méthode aurait été de mesurer le métabolisme central des acides gras en tenant compte de la BHE, car cette dernière constitue une interface incontournable *in vivo*. Cependant, le palmitate ^{14}C n'aurait pas représenté l'outil idéal pour mesurer l'incorporation du palmitate en phospholipides, notamment à cause de la présence de certains métabolites radioactifs générés par le palmitate et qui ne sont pas volatils tels que le glutamate et l'aspartate, engendrant ainsi un signal radioactif non spécifique (Rapoport 2001). Ceci aurait biaisé, sans doute, nos mesures d'estérification du palmitate en phospholipides. De plus, cette méthode n'aurait pas permis de mesurer les différentes espèces lipidiques générées suite à l'estérification des acides gras. D'autre part, les études *in vivo* et jusqu'à date ne permettent pas d'évaluer séparément le métabolisme neuronal et astrocytaire.

Ainsi, dans l'optique de nous rapprocher le plus possible des conditions *in vivo*. J'ai développé et adapté dans le laboratoire le modèle *ex vivo* des explants

Discussion générale

hypothalamiques cérébraux, inspiré principalement du modèle adapté par les études d'électrophysiologie, en utilisant des coupes cérébrales maintenues en survie. Après l'obtention de coupes coronales de cerveaux de rats males Wistar fraîchement prélevés, une microdissection est réalisée plus spécifiquement de la région du MBH (englobant l'ARC et le VMH) ainsi que celle du cortex.

Il importe de noter que le développement de ce protocole s'est révélé beaucoup plus compliqué et plus long que ce qui a été prévu. La difficulté pour mettre au point un protocole fiable, résidait dans les complications relatives à l'oxygénation de petit volume du milieu d'incubation contenant de l'albumine nécessaire à la complexation des acides gras. Nous avons donc dû passer à travers trois différentes étapes.

Notre premier protocole consistait à incuber les explants à 37°C de la même façon que pour les cellules en culture, en s'assurant qu'il y a bien un échange d'oxygène entre le milieu d'incubation et l'air circulant dans l'incubateur. D'une façon surprenante, les données obtenues étaient inverses à celles observées *in vitro* et montraient une augmentation des niveaux d'oxydation du palmitate en réponse à l'augmentation des concentrations de glucose (10mM) (résultats non montrés). Résultats que nous avons pensés initialement dus à la diversité des types cellulaires constituant le tissu des explants, comparativement aux neurones et aux astrocytes. L'étude de la phosphorylation de l'AMPK en réponse au glucose dans nos explants, a montré une augmentation de cette dernière. Ces résultats étaient en désaccord avec des études antérieures décrivant l'effet du glucose sur la phosphorylation de l'AMPK (Minokoshi, Alquier et al. 2004) (Kim and Lee 2005). De plus, l'étude par Western blot de la protéine glycogène synthétase kinase-3 (GSK3), impliquée dans le métabolisme du glycogène, et dont l'activité est inhibée par phosphorylation, montre une augmentation de la phosphorylation de cette dernière en présence de forte concentration de glucose (résultats non montrés). Ces résultats confirment des études précédentes démontrant que l'augmentation de la phosphorylation de l'AMPK pourrait être induite par un état d'hypoxie dans les cellules (Wu, Viana et al. 2012). Ces données indiquaient ainsi que nos conditions d'oxygénation n'étaient pas optimales. Plus encore, cela suggérait qu'en présence d'hypoxie, l'activité de la protéine GSK3 est inhibée, induisant ainsi une perturbation dans ses fonctions

Discussion générale

métaboliques et potentiellement ses fonctions dans la plasticité neuronale ainsi que la survie cellulaire (Grimes and Jope 2001). Toutefois, il est important de mentionner que dans ces conditions expérimentales, les études de sécrétion de NPY dans les explants en réponse au KCl, ont permis de montrer que nos coupes étaient viables.

Nous avons donc mis les explants en agitation pendant leur incubation afin de permettre un meilleur échange d'oxygène entre le milieu d'incubation et l'air circulant. Les résultats de mesure d'oxydation du palmitate montraient que l'agitation du milieu, prévenait l'augmentation de la phosphorylation de l'AMPK en réponse au glucose, suggérant ainsi une amélioration des conditions d'incubation des explants. Toutefois, nous n'avons pas observé de changement dans le niveau de phosphorylation entre les conditions de faibles et fortes concentrations de glucose, ce qui indiquait que nous n'étions pas encore en présence de parfaites conditions. Finalement, nous avons mis au point la technique d'oxygénation du milieu d'incubation par bullage à l'aide du mélange d'O₂/CO₂. Une adaptation du débit du bullage était nécessaire à la fois pour pouvoir apporter une quantité d'oxygène suffisante, d'un côté pour garder les explants en bon état, et d'autre côté, pour éviter la formation de bulles dues à la présence d'albumine dans le milieu d'incubation.

Dès lors que la fiabilité de notre technique a été validée, nous avons initié une nouvelle série d'expériences pour mesurer l'oxydation et l'estérification des acides gras, ainsi que l'utilisation et l'oxydation du glucose *ex vivo* dans les explants du MBH. Par ailleurs, afin de démontrer la spécificité des résultats obtenus dans la région du MBH, nous avons jugé primordial de comparer ces résultats à une autre région non impliquée dans la détection des acides gras, en l'occurrence, le cortex.

Afin de pouvoir émettre une conclusion solide de nos résultats, nous avons utilisé des méthodes gold standards via des traceurs radioactifs reflétant ainsi une mesure directe du métabolisme intracellulaire des acides gras au niveau cérébral.

Discussion générale

Intégration des résultats dans le contexte de la littérature

Etude1

Couplage métabolique entre les acides gras et le glucose dans le MBH via l'AMPK.

Grâce à nos modèles complémentaires, d'une part *in vitro* dans les neurones et les astrocytes en culture, et d'autre part *ex vivo* dans les explants cérébraux, nous avons mis en évidence la forte capacité oxydative du MBH pour les LCFA. Par ailleurs, nous avons démontré pour la première fois que le métabolisme du glucose et celui des acides gras sont couplés via des mécanismes AMPK dépendants. L'absence de l'effet du glucose sur la phosphorylation de l'AMPK au niveau cortical, observée dans nos résultats, à la fois *in vitro* et *ex vivo*, est en parfait accord avec des études antérieures, démontrant que l'activité de l'AMPK était insensible aux changements des concentrations du glucose, à l'hypoglycémie, ou encore à la neuroglucopénie dans les aires corticales (Minokoshi, Alquier et al. 2004, Han, Namkoong et al. 2005, Alquier, Kawashima et al. 2007). Finalement le couplage entre le métabolisme du glucose et des acides gras s'est révélé spécifique à la région du MBH incluant les deux acteurs cellulaires majeurs du métabolisme dans le cerveau, les neurones et les astrocytes.

Les acides gras importés dans les cellules au niveau périphérique, proviennent soit de la circulation, soit, ils sont synthétisés *de novo* à partir d'acétyl-CoA. Les acyl-CoAs générés à partir des acides gras via l'enzyme ACS, vont par la suite être acheminés soit vers l'oxydation mitochondriale pour la production d'énergie ou vers la synthèse des glycérolipides, qui à leur tour serviront soit au stockage de l'énergie ou à la fabrication de la membrane (Mashek, Li et al. 2007). La régulation de cette partition est d'une importance majeure, et est critique pour le fonctionnement des cellules et doit de ce fait, être finement régulée.

Cependant, au niveau central et à ce jour, nous ne savions pas quel était le devenir métabolique des acides gras et sa régulation par d'autres nutriments. Nous avons donc démontré pour la première fois au niveau central que l'estérification du

Discussion générale

palmitate et non celle de l'oléate augmente en réponse au glucose dans les neurones en culture et les explants hypothalamiques. En revanche, dans les astrocytes hypothalamiques, malgré la tendance à la hausse de l'estérification du palmitate en DAG en réponse au glucose ($p=0.07$), les niveaux des MAG, TAG et des PL ne sont pas affectés. L'étude du profil d'expression génique des enzymes impliquées dans l'estérification des acides gras incluant les GPATs (glycerol-3-phosphate acyltransferase), les AGPATs (Acylglycerol-3-phosphate acyltransferase), et les DGATs (Diacylglycerol acyltransferase), montre que ces dernières sont bien exprimées dans les astrocytes. Ceci indique que la perte d'effet du glucose sur l'estérification en DAG et en TAG dans les astrocytes n'est pas liée à une différence dans l'expression des enzymes.

Ces données suggèrent donc que la partition du métabolisme des LCFA entre l'oxydation et l'estérification, induite par le glucose au niveau central est dépendante du type de LCFA, ainsi que du type cellulaire. Les résultats obtenus dans nos explants suggèrent que l'oxydation du palmitate est mitochondriale alors que celle de l'oléate est plutôt peroxisomale. De plus amples études seront nécessaires afin d'aboutir à une meilleure compréhension de comment s'effectue la régulation du métabolisme de chaque type de LCFA au niveau de l'hypothalamus. Cependant, l'importance de nos données réside particulièrement dans le contexte d'une prise alimentaire riche en matière grasse à long terme, qui se traduirait par une hyperlipidémie chronique, pouvant être associée à une hyperglycémie. Ces modifications pathologiques au niveau périphérique peuvent conduire au niveau central à une accumulation des lipides et affecter ainsi la sensibilité à l'insuline. Cette hypothèse est supportée par des études récentes montrant qu'un régime riche en gras augmente le contenu hypothalamique en DAG et TAG chez la souris (Borg, Omran et al. 2012).

Ainsi, l'ensemble des résultats obtenus démontrent pour la première fois l'existence d'un couplage métabolique entre le métabolisme du glucose et des acides gras impliquant la voie AMPK. Ce couplage subit une régulation très étroite dépendante à

Discussion générale

la fois de la région cérébrale, du type cellulaire et finalement à plus petite échelle du type de l'acide gras lui-même.

Métabolisme des acides gras dans les astrocytes

Depuis une trentaine d'années maintenant, les astrocytes ont suscité l'intérêt des neurobiologistes notamment grâce à leurs caractéristiques particulières discutées antérieurement, leur permettant ainsi d'assurer le soutien métabolique nécessaire aux neurones. Les astrocytes étaient notamment reconnus comme étant le type cellulaire majoritairement capable d'oxyder les acides gras tels que l'octanoate (Auestad, Korsak et al. 1991) (Edmond 1992). Ainsi, de plus en plus d'études suggèrent le rôle des astrocytes dans le contrôle hypothalamique de l'homéostasie énergétique (Yi, Habegger et al. 2011) (Prebil, Jensen et al. 2011). Nos données obtenues dans les astrocytes sont en accord avec cette idée. En effet, nous avons démontré la présence de forte expression des enzymes clés du métabolisme des LCFA dans les cultures des astrocytes primaires, à savoir CPT-1, ACC, MCD et FAS. D'autre part, à l'instar des neurones, le métabolisme des acides gras était aussi régulé par le glucose dans les astrocytes hypothalamiques, impliquant la voie de signalisation AMPK, mais pas dans les astrocytes corticaux. Notons que des études antérieures ont montré que l'AMPK joue un rôle important dans la régulation de la production des corps cétoniques par les astrocytes (Blazquez, Woods et al. 1999). Plus encore, récemment, il a été montré qu'un régime riche en gras, provoque une augmentation rapide de la production locale des corps cétoniques par les astrocytes. Étant donné que les corps cétoniques affectent les mécanismes de détection des nutriments par les neurones, ceci suggère que les astrocytes jouent un rôle essentiel dans la modulation du mécanismes de détection des acides gras par les neurones (Le Foll, Dunn-Meynell et al. 2014). Finalement l'effet inhibiteur du glucose à la fois sur la phosphorylation de l'AMPK et sur l'oxydation du palmitate dans les astrocytes hypothalamiques est inexistant dans les astrocytes corticaux.

L'ensemble des résultats obtenus ici renforce donc le rôle oxydatif des astrocytes, qui a été pendant longtemps sous-estimé en faveur de leur rôle glycolytique.

Est-ce que le métabolisme des acides gras est impliqué dans l'interrelation neurones-astrocytes?

Jusqu'à maintenant, le couplage métabolique entre les neurones et les astrocytes était restrictif à la navette comprenant le glucose, le lactate et le glutamate. Cependant, à l'issue de nos résultats, la possibilité de l'existence d'un autre aspect du couplage métabolique entre les deux types cellulaires, impliquant les acides gras et/ ou leurs métabolites pourrait être envisageable. Cette idée est consolidée par des études antérieures montrant que des astrocytes cultivés *in vitro*, avaient la capacité d'allonger et désaturer des précurseurs des acides gras polyinsaturés à chaîne longue pour produire l'acide arachidonique et l'acide docosahexaénoïque. En revanche, les neurones étaient incapables de produire ces acides gras. Mis en co-culture avec les astrocytes, les neurones ont accumulé les acides gras polyinsaturés à longue chaîne, synthétisés par les cellules gliales (Moore 2001). Ces résultats indiquent que les astrocytes sont impliqués dans la production des acides gras polyinsaturés, ainsi que dans leur transport vers les neurones.

Des études supplémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre comment le métabolisme central des acides gras pourrait participer à l'interrelation existante entre les neurones et les astrocytes, ainsi que son rôle dans le contrôle de l'homéostasie énergétique.

Effets des acides gras non dépendants de leur métabolisme

Malgré toutes les évidences discutées suggérant l'implication du métabolisme des acides gras dans leurs effets centraux, d'autres études revendiquent un effet indépendant du métabolisme des acides gras. En effet, des études récentes indiquent qu'un régime riche en gras, entraîne une accumulation des lipides dans les astrocytes hypothalamiques, accompagnée d'une activation de ces derniers. (Horvath, Sarman et al. 2010, Thaler, Yi et al. 2012). Cependant, les mécanismes impliqués dans l'induction de l'astrogliose par les acides gras saturés sont encore inconnus. Dans ce contexte, il a été démontré *in vitro* que les acides gras saturés et insaturés induisent la sécrétion de marqueurs d'inflammation tels que TNF- α et IL-

Discussion générale

6, et que cet effet impliquait des voies indépendantes du métabolisme des acides gras, telles que les récepteurs TLR (Toll-like receptors) (Gupta, Knight et al. 2012). Toutefois, ces études ont été réalisées principalement *in vitro* sur des astrocytes du cortex, région non impliquée dans la régulation de l'homéostasie énergétique. De plus, nos résultats démontrent que la régulation du métabolisme des acides gras est dépendante des régions cérébrales, on ne peut donc exclure l'idée que ces résultats ne refléteraient pas les mécanismes qui pourraient se produire au sein des astrocytes du MBH.

Dans le même ordre d'idée, il a été démontré dans des neurones dissociés du VMN que l'inhibition de CPT-1, de la formation des ROS, d'ACS, ou de l'activité des canaux K_{ATP} n'affecte pas plus de 20% de l'effet excitateur ou $\sim 40\%$ de l'effet inhibiteur de l'acide oléique sur ces neurones (Le Foll, Irani et al. 2009). De plus, l'altération de la fonction de FAT/CD36, réduit les effets de l'acide oléique sur l'activité de ces neurones seulement d'environ 45%, suggérant que l'acide oléique pourrait exercer ses effets via des voies indépendantes de son métabolisme. Ainsi, FAT/CD36 jouerait plus une fonction de récepteur que celle de transporteur (Le Foll, Irani et al. 2009). Toutefois, notons que ces études ont été réalisées sur des neurones dissociés, en présence de concentrations d'acide oléique de l'ordre du nanoM, alors que des concentrations en microM sont habituellement requises pour pouvoir moduler l'activité neuronale dans les explants cérébraux (Jo, Su et al. 2009). De plus, les acides gras utilisés dans cette étude n'étaient pas complexés à l'albumine (Le Foll, Irani et al. 2009), ce qui n'est pas représentatif, à notre point de vue, des conditions physiologiques dans lesquelles les acides gras se trouvent. Ceci suggère une fois de plus que les astrocytes peuvent être impliqués dans le mécanisme de détection des acides gras par les neurones. Afin de vérifier cette hypothèse, un traitement de neurones en co-culture avec les astrocytes pourrait nous renseigner d'une part, sur le taux d'acides gras requis pour moduler l'activité neuronale et d'autre part, sur le niveau d'implication des astrocytes dans les mécanismes de détection des acides gras par les neurones.

Discussion générale

Finalement, les acides gras peuvent exercer leurs effets en tant que molécules de signalisation, en se liant d'une manière covalente à des protéines de signalisation. Il a été démontré notamment, que le récepteur des acides gras insaturés, GPR120 est exprimé dans l'hypothalamus, et est activé en réponse à une administration hypothalamique aiguë des acides gras $\omega 3$ et $\omega 9$ (Cintra, Ropelle et al. 2012). En effet, le récepteur GPR120, est membre de la famille des récepteurs couplés à la protéine G, identifié récemment comme étant un médiateur des actions anti-inflammatoires et insulino-sensibilisatrices d'acides gras $\omega 3$ dans les monocytes (Oh, Talukdar et al. 2010).

Par ailleurs, l'insertion des acides gras dans les membranes cellulaires facilite les interactions protéine-protéine, et permet à la bicouche lipidique de servir comme une attache permettant l'organisation de complexes de signalisation liés à la membrane. Notamment, la palmitoylation facilite la liaison de certaines protéines à la membrane plasmique, qui autrement, resteraient dans le compartiment cytosolique (Resh 1999). Ainsi, le palmitate pourrait moduler la palmitoylation et donc l'ancrage membranaire de plusieurs protéines impliquées dans la signalisation et l'activité neuronale. De plus, l'exocytose vésiculaire implique l'interaction d'une famille de protéines appelées les SNARE (soluble N-éthylmaléimide récepteur de protéine protéine-fusion attachement sensible) présentes sur les membranes des vésicules et sur la membrane plasmique. Parmi les SNARE les plus importantes présentes sur les membranes vésiculaires, on trouve les synaptobrevine-2 (VAMP2) (Parpura and Mohideen 2008), tandis que les SNAP23/25 (protéine Synaptosomal associés 23/25) et syntaxine 1 sont plutôt associées à la membrane plasmique. Toute exocytose de ces protéines semble être palmitoylée (Parpura and Mohideen 2008) (Sen and Snyder 2010).

Ainsi, l'ensemble des études discutées suggèrent fortement que les acides gras exercent leurs effets au niveau central via leurs métabolismes mais également via des mécanismes indépendants impliquant des récepteurs et/ou transporteurs membranaires. Cependant, les mécanismes sous-jacents à l'implication directe ou indirecte du métabolisme des acides gras dans le contrôle de la balance énergétique,

Discussion générale

ne sont pas totalement compris, et représentent ainsi des pistes intéressantes à explorer pour des études ultérieures.

Tout ceci donc nous conduit à notre seconde étude dans laquelle nous nous sommes focalisés sur la protéine ACBP, afin de déterminer son implication dans le métabolisme intracellulaire des acides gras et son rôle potentiel dans les effets centraux de ces derniers sur la balance énergétique.

Étude 2

Implication d'ACBP dans le métabolisme des acides gras dans le cerveau

Il est bien admis qu'une augmentation dans le MBH, des taux des acyl-CoAs intracellulaires issus des acides gras, réduit la prise alimentaire (Obici, Feng et al. 2002). Néanmoins, inversement au glucose, les mécanismes impliqués dans la détection et le métabolisme des acyl-CoAs au niveau cérébral ne sont pas bien élucidés. La deuxième partie de ma thèse, s'est donc intéressée à cet aspect encore mal compris dans le cerveau à la fois dans les astrocytes et les explants du MBH. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la protéine ACBP, considérée au niveau périphérique comme étant essentielle pour protéger les acyl-CoAs de l'hydrolyse, ainsi que leur partition entre l'oxydation mitochondriale et l'estérification en lipides complexes (Faergeman and Knudsen 1997). Cependant, le rôle d'ACBP dans le métabolisme des acides gras au niveau central était jusqu'à aujourd'hui encore inconnu.

La réalisation de ce projet a impliqué, à son tour, une combinaison de techniques *in vitro* et *ex vivo*, en utilisant une lignée de souris transgéniques invalidées pour le gène ACBP (ACBP nulles).

L'ensemble des résultats obtenus nous a permis d'établir pour la première fois d'une part, via le marquage d'immunohistochimie *in vivo*, une expression préférentielle d'ACBP dans les astrocytes hypothalamiques, et d'autre part, son implication dans le métabolisme des acides gras incluant leur oxydation et estérification. Son effet semble dépendre du type de LCFA.

Discussion générale

Tout d'abord, nous avons mesuré les niveaux basaux des acyl-CoAs générés à partir du palmitate et de l'oléate au niveau de l'hypothalamus et du cortex. Les résultats montrent que contrairement à ce qui a été observé au niveau du foie des souris ACBP nulles (Nees, Bloksgaard et al. 2011), nous n'avons pas observé de diminution générale dans les niveaux d'acyl-CoA dans les régions corticales et hypothalamiques de ces souris. De plus, les niveaux de palmitoyl et d'oléoyl-CoA étaient similaires entre les cerveaux des souris WT et les souris ACBP nulles. Par contre, d'une manière surprenante, le niveau de stéaroyl-CoA (C18) a été significativement élevé dans les régions corticales et hypothalamiques de souris ACBP nulles. Ces résultats inattendus sont, néanmoins en accord avec des résultats antérieurs similaires observés chez un modèle de levure dont ACBP a été délété (Gaigg, Neergaard et al. 2001).

Une explication possible à cette augmentation, serait que la délétion d'ACBP induirait une mise en place d'un mécanisme central compensatoire se traduisant par des changements dans les taux et le type des LCFAs circulants. Afin de mieux caractériser ces changements, une mesure des niveaux des autres espèces des acyl-CoAs, serait nécessaire dans le cerveau des souris ACBP nulles. Toutefois, ces résultats démontrent que la délétion d'ACBP engendre une perturbation dans le profil des LCFA-CoAs circulants au niveau central.

D'autre part, la délétion d'ACBP entraîne une réduction du taux basal d'oxydation dans les explants de MBH et les cultures primaires d'astrocytes à la fois au niveau hypothalamique et cortical, ceci en absence de modification des niveaux des LC-CoAs chez les souris ACBP nulles. Cette réduction semble être spécifique à l'oléate puisque l'oxydation et l'estérification du palmitate sont inchangées. ACBP exhibe ainsi des effets différentiels sur le métabolisme du palmitate et celui de l'oléate. Toujours chez les souris ACBP nulles, la mesure des niveaux d'estérification montre une diminution de l'estérification de l'oléate en TAG, et PL spécifiquement dans les astrocytes hypothalamiques. Ces résultats sont en accord avec des études antérieures montrant qu'une diminution de l'expression d'ACBP chez un modèle de *C. elegans*, conduit à son tour à une diminution des taux des TAG (Elle, Simonsen et

Discussion générale

al. 2011). En revanche, ACBP ne semble pas avoir d'effet sur l'estérification du palmitate dans les cultures primaires d'astrocytes. Ainsi, nous avons pu conclure qu'ACBP est spécifiquement requise pour le métabolisme de l'oléate mais pas pour celui du palmitate, *in vitro* dans les cultures primaires astrocytaires, et *ex vivo* dans les explants hypothalamiques.

L'ensemble des résultats obtenus suggère que l'effet anorexigène de l'oléate décrits précédemment (Obici, Feng et al. 2002) (Schwinkendorf, Tsatsos et al. 2011), pourrait être dépendant d'ACBP. Des données électrophysiologiques obtenues par le laboratoire de Dr Xavier Fiaromonti, notre collaborateur en France, sont en accord avec cette idée. En effet, l'enregistrement dans les neurones POMC suite à un traitement avec ODN induit une diminution des IPSC (inhibitory postsynaptic current) dans ces neurones, suggérant ainsi qu'une partie des effets d'ODN est dépendante du GABA (données non montrées). Ainsi nous pouvons spéculer que la modulation des taux des acyl-CoAs et de leur métabolisme par ACBP, pourrait constituer un signal modulant la sécrétion d'ACBP et/ou d'ODN, qui en retour, exercerait un effet anorexigène en activant les neurones POMC. Afin de tester cette hypothèse nous sommes en train d'étudier au laboratoire la sécrétion d'ACBP ainsi que la détection hypothalamique des acides gras en utilisant un modèle de souris nulles pour ACBP spécialement dans les astrocytes (GFAP-ACBP KO). D'autre part, il a été montré que l'injection ICV d'ODN, induit à la fois chez le rat et la souris, un effet anorexigène de longue durée qui n'est pas médié par des récepteurs de benzodiazépine (de Mateos-Verchere, Leprince et al. 2001).

A partir de là, on pourra suggérer que les effets centraux différentiels des acides gras sur la prise alimentaire, pourraient être dépendants d'ACBP, et qu'une perturbation de l'expression ou l'activité d'ACBP entraînerait un défaut dans l'oxydation hypothalamique de l'oléate, et par conséquent, l'altération du mécanisme par lequel l'oléate inhibe la prise alimentaire.

Ainsi, nos données établissent un nouveau rôle d'ACBP dans le cerveau et soutiennent son implication dans la détection hypothalamique et les effets anorexigènes de l'oléate.

Discussion générale

Afin de mieux comprendre comment la détection et le transport des acides gras sont réalisés au sein des neurones et des astrocytes, d'autres cibles peuvent aussi faire l'objet de prochaines études, notamment, le récepteur couplé à la protéine G GPR120. En effet, l'injection ICV d'acides gras polyinsaturés chez des rats obèses, semble impliquer l'activation des récepteurs GPR120 au niveau central, afin de réduire la prise alimentaire, le gain du poids corporel, et restaurer la sensibilité à la leptine et à l'insuline (Cintra, Ropelle et al. 2012).

Métabolisme des acides gras et sécrétion des neuropeptides

Dans la suite logique de cette discussion et en se basant sur l'ensemble des données obtenues dans nos deux études, il apparaît nécessaire de se questionner sur la relevance physiologique de nos résultats.

Rôle fonctionnel du couplage métabolique entre le glucose et les acides gras

Une des questions importantes qu'on s'est posé durant l'étude du couplage métabolique entre le glucose et les acides gras au niveau hypothalamique, est de savoir la relevance physiologique et fonctionnelle de ce couplage dans la régulation globale de l'homéostasie énergétique. Cette question est d'autant plus importante car, il est bien établi que le glucose régule le métabolisme des acides gras dans la cellule bêta pancréatique et que cette régulation, constitue le mécanisme clé contrôlant la sécrétion d'insuline (Nolan, Madiraju et al. 2006). L'augmentation des taux du malonyl-CoA en réponse au glucose entraîne une inhibition de l'oxydation des acides gras, les dirigeant vers les processus d'estérification puis de lipolyse. L'ensemble des molécules lipidiques produites, vont servir en tant que molécules signalétiques pour moduler la sécrétion d'insuline (Nolan, Madiraju et al. 2006). Nous pouvons imaginer qu'un mécanisme similaire pourrait exister au niveau des neurones hypothalamiques, et que la régulation du métabolisme des acides gras observée dans nos modèles d'études, pourrait contribuer, si elle ne constitue pas elle-même, le mécanisme clé de la régulation de la sécrétion des neuropeptides contrôlant la prise alimentaire.

Discussion générale

Au cours de l'introduction, nous avons discuté de la nature des neuropeptides exprimés par les neurones de l'hypothalamus, contrôlant la prise alimentaire et dont l'expression est régie par le statut nutritionnel de l'individu. Ainsi le jeûne entraîne une augmentation de l'expression des neuropeptides orexigènes (NPY et AgRP), qui corrèle avec une diminution de l'expression des neuropeptides anorexigènes (POMC et CART) (Gao and Lane 2003). L'injection de C75, l'inhibiteur de FAS, affiche une augmentation de l'expression de c-Fos, suggérant qu'une activation neuronale se produit dans les régions de l'hypothalamus connues pour contrôler le comportement alimentaire, notamment l'ARC, le LH, et le PVN (Gao and Lane 2003).

Inversement, la réalimentation augmente considérablement les taux du malonyl-CoA, et induit un changement inverse dans les niveaux des neuropeptides orexigènes et anorexigènes (Hu, Cha et al. 2003). Finalement, l'administration centrale du glucose, provoque une réponse hypophagique qui semble être indépendante de la signalisation de la leptine et corrèle avec une augmentation des concentrations du malonyl-CoA (Wolfgang, Cha et al. 2007).

Ainsi, l'ensemble de ces effets provoqués soit par le jeûne, la réalimentation, ou l'administration de C75 sur les changements des taux du malonyl-CoA, semble corrélérer avec les changements des niveaux d'expression des neuropeptides orexigènes (NPY et AgRP), et anorexigènes (POMC / CART et α MSH), au niveau de l'hypothalamus (Hu, Cha et al. 2003). Les mécanismes signalétiques impliqués au-delà du malonyl-CoA ne sont pas totalement compris, cependant deux cas de figures ont été suggérés suite à l'augmentation intracellulaire des concentrations du glucose. D'une part, le malonyl-CoA généré via le métabolisme du glucose pourrait interagir directement avec une protéine de signalisation qui diminuerait l'expression des neuropeptides orexigènes AgRP et NPY. En revanche, elle stimulerait celle des neuropeptides anorexigènes, CART et POMC dans l'ARC, induisant ainsi une régulation de la prise alimentaire. Le deuxième cas de figure, serait que la malonyl-CoA agirait indirectement par son action sur CPT-1, pour inhiber l'accès des acyl-CoAs vers les mitochondries, engendrant ainsi une

Discussion générale

accumulation cytoplasmiques des acyl-CoAs, qui pourront interagir avec une ou (des) protéine(s) pour réguler le niveau d'expression et de sécrétion des neuropeptides (Le Stunff, Coant et al. 2013). Récemment, une étude vient de démontrer que CPT-1a contribue à la régulation de l'alimentation en modulant l'expression des transporteurs de neurotransmetteurs et des composants lipidiques, qui influencent les voies orexigènes dans le VMH (Mera, Mir et al. 2014). Ceci suggère qu'une modulation de la fonction de CPT-1a via le malonyl CoA pourrait induire une régulation de la sécrétion des neuropeptides.

Un autre mécanisme possible, soutenu par nos données de mesure de β oxydation en réponse au glucose, et qui pourrait exister particulièrement dans les neurones GE présents dans le MBH, serait que l'inhibition de l'oxydation des acides gras par le glucose engendrerait une diminution de la production d'ATP. L'absence d'augmentation des taux intracellulaires de l'ATP générés, habituellement, par l'oxydation des acides gras, empêcherait ainsi la dépolarisation de la membrane plasmique et l'afflux des ions Ca^{2+} et conduirait à une inhibition de la sécrétion des neuropeptides. Cette hypothèse pourrait être testée par exemple via une mesure des concentrations calciques au sein des neurones sous les mêmes conditions utilisées pour tester l'effet du glucose sur l'oxydation des acides gras.

Des études supplémentaires sont donc nécessaires afin d'établir un lien direct entre le couplage métabolique du glucose et des acides gras, et le contrôle de la prise alimentaire via la régulation des neuropeptides.

Implication de l'AMPK dans la sécrétion des neuropeptides

Un autre acteur majeur dans la régulation de l'expression des neuropeptides est l'AMPK. Nos résultats montrent que l'AMPK est au centre du couplage entre le métabolisme du glucose et des acides gras, mais bien avant cela, des études antérieures, *in vivo*, ont montré que l'injection ICV de la forme constitutivement active de l'AMPK (Shimizu, Arima et al. 2008) (Minokoshi, Alquier et al. 2004), augmente l'expression des neuropeptides orexigènes. L'effet inverse est obtenu en

Discussion générale

inhibant l'activité de l'AMPK via une forme dominante négative de cette dernière (Minokoshi, Alquier et al. 2004). Récemment, il a été montré *in vitro*, que le traitement de neurones hypothalamiques avec du palmitate conduit à une augmentation de l'expression de NPY. D'une manière intéressante, l'activation de l'AMPK par l'AICAR dans ce modèle, était capable de prévenir l'augmentation de l'expression de l'ARNm de NPY, induite par le palmitate (Fick, Fick et al. 2011).

L'ensemble de ces données, permet donc de suggérer une relation de cause à effet entre l'effet observé antérieurement de l'AMPK sur l'expression des neuropeptides, et son implication dans le couplage entre le métabolisme du glucose et des acides gras démontré dans nos résultats.

ACBP et sécrétion des neuropeptides

Notre laboratoire ainsi que d'autres équipes, ont mis en évidence l'effet anorexigène d'ODN chez la souris et le rat (de Mateos-Verchere, Leprince et al. 2001). Afin d'établir un lien entre l'effet anorexigène d'ODN et l'expression des neuropeptides régulant la prise alimentaire, il a été montré que l'injection ICV d'ODN, provoque une augmentation significative du niveau d'expression de l'ARNm de POMC (Compere, Li et al. 2003), et une diminution concomitante du niveau d'expression de l'ARNm de NPY dans l'ARC. L'administration simultanée d'ODN et de son antagoniste supprime complètement l'effet inhibiteur d'ODN sur l'expression de l'ARNm de NPY (Compere, Li et al. 2005). Une étude plus récente a démontré que l'effet anorexigène d'ODN, est induit suite à son injection ICV, et est supprimé via une pré-injection d'un antagoniste du récepteur MC4R (Matsuda, Kojima et al. 2010).

L'ensemble de ces résultats, suggère donc qu'ODN exerce son effet anorexigène en stimulant l'activité des neurones POMC et en inhibant celle des neurones NPY.

Ainsi, réunissant ensemble les résultats décrits ci-dessus, et ceux obtenus dans notre étude, démontrant l'implication d'ACBP dans le métabolisme des acides gras, il serait tentant de suggérer que le rôle d'ACBP dans la régulation de l'oxydation des

Discussion générale

acides gras, pourrait être à l'origine de son effet sur l'expression des neuropeptides, modulant ainsi la prise alimentaire.

Afin de vérifier cette hypothèse, l'utilisation d'un modèle de souris transgéniques, dont le gène ACBP est invalidé spécifiquement dans les noyaux du MBH, permettrait d'évaluer l'effet de l'invalidation d'ACBP sur la prise alimentaire. Plus encore, une mesure à la fois de l'expression des neuropeptides, via des dosages radio-immunologiques, ainsi que des niveaux des acyl CoAs et d'autres espèces lipidiques, en utilisant la technique de spectrométrie de masse, donnerait une image plus claire, et établirait un lien entre le rôle d'ACBP dans le métabolisme des acides gras, et son effet sur la prise alimentaire.

Et si les neurones et les astrocytes n'étaient pas les seules cellules cérébrales responsables de la détection et du métabolisme du glucose et des acides gras dans le cerveau ?

À ce jour, les neurones et les astrocytes constituent les deux acteurs majeurs connus comme étant impliqués dans la détection et le métabolisme des nutriments tels que le glucose et les acides gras. Cependant, l'environnement cérébral et plus particulièrement le MBH comporte d'autres cellules, à savoir, les tanocytes et les épendymocytes, dont on connaît peu de choses sur leur fonction potentielle de détection des nutriments. Ces cellules se caractérisent par leur localisation, qui borde le troisième ventricule cérébral rentrant ainsi en contact direct, d'une part avec le liquide céphalo-rachidien, et d'autre part, grâce à leurs prolongements, avec les neurones du noyau arqué et du VMH (Levin, Magnan et al. 2011). Ainsi, leur fonction connue, est d'assurer l'interface entre le système nerveux et le liquide céphalo-rachidien. Récemment, il a été suggéré que ces cellules constituent aussi une partie intégrante du réseau hypothalamique régulant le poids corporel et l'équilibre énergétique. Il a été particulièrement démontré que les tanocytes exprimaient l'ensemble des enzymes nécessaires à la détection, et au métabolisme du glucose (Rodriguez, Blazquez et al. 2005), suggérant fortement que les tanocytes

Discussion générale

sont aussi des gluco-détecteurs, et qu'elles sont capables de produire et libérer de l'ATP via la métabolisation du glucose (Dale 2011) (Frayling, Britton et al. 2011).

D'autre part, il a été montré que les épendymocytes expriment l'enzyme mitochondriale, le pyruvate décarboxylase, responsable de la catalyse du pyruvate en oxaloacetate, ce dernier, faisant partie du cycle de Krebs (Murin, Cesar et al. 2009).

Cependant, on ignore complètement si ces cellules sont aussi équipées pour détecter et métaboliser les acides gras. Des résultats de marquage d'immunohistochimie obtenus dans notre laboratoire, montrent que le plus haut niveau d'expression d'ACBP au niveau du MBH se localise au niveau des épendymocytes et des tanocytes (résultats non montrés).

Ainsi, des études ultérieures seront importantes d'une part, pour révéler les différents aspects de l'interrelation entre les tanocytes, les épendymocytes, et les neurones, et d'autre part, pour établir comment cette relation pourrait contribuer au contrôle de l'homéostasie énergétique.

Glycolipotoxicité et cellules cérébrales

La notion de glycolipotoxicité a vu le jour récemment au niveau périphérique, et a été adapté pour désigner les anomalies se produisant dans la cellule suite à l'augmentation chronique de prise de nourriture riche en glucose et en acides gras. Cette notion met en évidence les mécanismes impliqués dans l'effet de l'augmentation des concentrations intracellulaires du glucose sur le métabolisme des lipides, incluant leur partition entre oxydation et estérification. En effet, dans la cellule bêta pancréatique, l'inhibition du transport des acyl-CoAs dans les mitochondries par le malonyl-CoA, induit l'activation de la voie d'estérification et conduit à l'accumulation cytosolique des dérivés lipidiques toxiques tels que les céramides, induisant ainsi des effets délétères sur la fonction pancréatique (Prentki, Joly et al. 2002).

Discussion générale

Récemment, il a été montré que l'exposition du CNS au palmitate par une infusion directe ou via un gavage oral, augmente considérablement les niveaux des DAG intracellulaires. Ces derniers, vont faciliter la translocation de l'isoforme theta de la protéine kinase C, (PKC- θ), au niveau de la membrane cellulaire entraînant une perte de signalisation de l'insuline et la leptine au niveau hypothalamique (Benoit, Kemp et al. 2009). D'autre part, *Lopaschuk et al.* ont montré récemment que la synthèse *de novo* des céramides est impliquée dans les effets du malonyl-CoA et de CPT-1c, en partie, localisée dans le réticulum endoplasmique, sur la prise alimentaire et l'expression du neuropeptide NPY (Gao, Zhu et al. 2011).

Finalement, dans nos modèles, nous avons bien montré que certains des espèces lipidiques tels que les DAG et les TAG augmentent en réponse au glucose, cette augmentation pourrait suggérer éventuellement une augmentation parallèle de la production des céramides. Nous ne pouvons pas confirmer cela étant donné qu'une mesure directe de ces espèces n'a pas été réalisée.

A l'issue de cette discussion, il est important de se demander si l'augmentation centrale simultanée du taux du glucose et des lipides, due à l'excès en nutriments, pourrait induire une glycolipotoxicité au niveau cérébral, dans le cas des pathologies telles que l'obésité et le diabète. Aussi, aurait-elle comme conséquence une altération de la sécrétion des neuropeptides, via l'altération du couplage métabolique entre le glucose et les acides gras. Plus encore, est ce que l'altération du couplage métabolique entre le glucose et les acides gras au niveau cérébral pourrait être à l'origine d'une résistance à l'insuline et d'une altération centrale du métabolisme des lipides contribuant ainsi à l'altération de ce couplage au niveau pancréatique et aux complications accompagnant le syndrome métabolique au niveau périphérique.

Dans ce contexte, une étude clinique récente a montré une augmentation du transport et l'accumulation des acides gras au niveau du cerveau des patients atteints du syndrome métabolique. Cette accumulation semble diminuer suite à la perte du poids corporel (Karmi, Iozzo et al. 2010). Ces données suggèrent donc

Discussion générale

fortement une association entre le métabolisme cérébral des acides gras, l'obésité et le syndrome métabolique.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Conclusion

Globalement, le métabolisme énergétique est un processus qui ne se déroule pas d'une façon indépendante dans chaque organe ou tissus, mais consiste plutôt à des mécanismes bien coordonnés et régulés dans l'ensemble de l'organisme. Cette coordination est essentielle au maintien de l'homéostasie énergétique, et nécessite la communication entre les différents organes et tissus. Une perturbation de ce système impliquerait l'apparition de troubles métaboliques, y compris l'obésité et le diabète de type 2, contribuant ainsi au développement du syndrome métabolique.

De par son rôle dans l'intégration des différents signaux afin de réguler l'homéostasie énergétique, le système nerveux central, en particulier l'hypothalamus, se positionne en tête dans l'étiologie des troubles métaboliques. Différentes études suggèrent qu'un dysfonctionnement du métabolisme au sein des neurones du noyau arqué hypothalamique, pourrait être un des facteurs principaux, contribuant au développement du syndrome métabolique, allant jusqu'à spéculer que le syndrome métabolique est une maladie du cerveau (Singh, Gupta et al. 2012).

Dans un environnement dans lequel l'apport en acides gras a considérablement augmenté, il est d'une importance majeure de comprendre comment les acides gras, faisant partie des différents signaux nutritionnels contrôlant la prise alimentaire, agissent au sein de l'hypothalamus pour réguler la balance énergétique.

Ce travail de thèse a donc mis en évidence deux aspects différents de la régulation du métabolisme des acides gras au niveau hypothalamique:

D'une part, le métabolisme des acides gras, incluant leur oxydation et leur estérification, est régulé par le glucose au niveau cérébral (Tableau2), via la voie de signalisation cellulaire AMPK. Cette régulation est spécifique aux régions impliquées dans le contrôle de l'homéostasie énergétique, et existe dans deux différents types de cellules cérébrales, en l'occurrence, les neurones et les astrocytes. De plus, le couplage entre le métabolisme du glucose et des acides gras est absent dans les

Conclusion et perspectives

régions du cerveau non impliquées dans le contrôle de l'homéostasie énergétique tel que le cortex.

D'autre part, le métabolisme central des acides gras est contrôlé par la protéine de liaison intracellulaire ACBP. Nous avons établi pour la première fois qu'ACBP est impliqué dans la régulation du métabolisme des LCFA, régulation qui dépend à son tour du type d'acide gras (Tableau2).

Ainsi, l'ensemble de nos travaux ont contribué à mettre en évidence certains des mécanismes impliqués dans le contrôle du métabolisme intracellulaire des acides gras à la fois dans les neurones et les astrocytes hypothalamiques (Figure 11).

		Effet du glucose			Effet de la délétion d'ACBP	
		Neurones	Astrocytes	MBH	Astrocytes	MBH
Oxydation	Pal	↘	↘	↘	→	→
	Ole	↘	-	→	↘	↘
Esterification	Pal	↗	→	↗	→	-
	Ole	→	-	→	↘	-

Tableau2: Rôle du glucose et de la protéine ACBP dans la régulation du métabolisme central des acides gras. Ce tableau résume les résultats obtenus à partir des deux études réalisées dans le cadre de cette thèse, montrant le rôle du glucose et de la protéine ACBP dans la régulation du métabolisme du palmitate et d'oléate d'une part, *in vitro* (neurones et astrocytes hypothalamiques) et d'autre part, *ex vivo* (explants du MBH).

- : la mesure du métabolisme des acides gras n'a pas été réalisée dans ces conditions.

Conclusion et perspectives

Bien que l'adaptation d'un bon régime alimentaire et de l'exercice physique, demeurent largement reconnus comme les pierres angulaires incontestées pour combattre l'obésité, cela ne suffit pas pour normaliser les différents facteurs de risque associés à l'obésité tels que le diabète de type 2, l'hypertension ou la dyslipidémie. Comprendre comment l'excès en acides gras au niveau central contribue au développement de l'obésité et du diabète permettrait donc d'identifier des cibles à visée thérapeutique pour le traitement de ces pathologies.

Une des enzymes impliquées dans le couplage métabolique entre le glucose et les acides gras et qui a suscité l'intérêt des chercheurs au niveau périphérique est l'enzyme ACC. Plusieurs études du métabolisme des acides gras affirmaient que l'enzyme ACC pourrait constituer une cible thérapeutique, et que son inhibition pourrait être une approche prometteuse pour le traitement de l'obésité et du diabète de type 2 (Wakil and Abu-Elheiga 2009). Ainsi, des essais importants ont été réalisés pour développer et tester des inhibiteurs d'ACC (Tong and Harwood 2006). L'effet attendu de ces inhibiteurs aurait été d'une part, de réduire la synthèse des acides gras et du poids corporel et d'autre part, l'augmentation à la fois de l'oxydation des acides gras et de la sensibilité à l'insuline. Cependant, son utilisation chez les animaux a montré des effets non spécifiques ciblant d'autres voies (Wakil and Abu-Elheiga 2009). Ainsi, leur efficacité en tant que médicaments potentiels pour cibler l'obésité et le diabète de type 2 reste à déterminer, premièrement au niveau périphérique et potentiellement au niveau central. À ce jour, l'efficacité des traitements pharmacologiques actuels proposés pour le traitement de l'obésité est limitée, plus encore, ces traitements pour la plupart d'entre eux, engendrent certains effets secondaires indésirables (Bray and Ryan 2014).

Ainsi, les données obtenues dans le cadre de cette thèse contribueront sans doute, à l'avancée des recherches dans l'optique de développer des médicaments à action centrale en minimisant les effets secondaires pour le traitement des différentes pathologies contribuant au syndrome métabolique.

Conclusion et perspectives

Modèle proposé du couplage entre le métabolisme du glucose et des acides gras au niveau du MBH

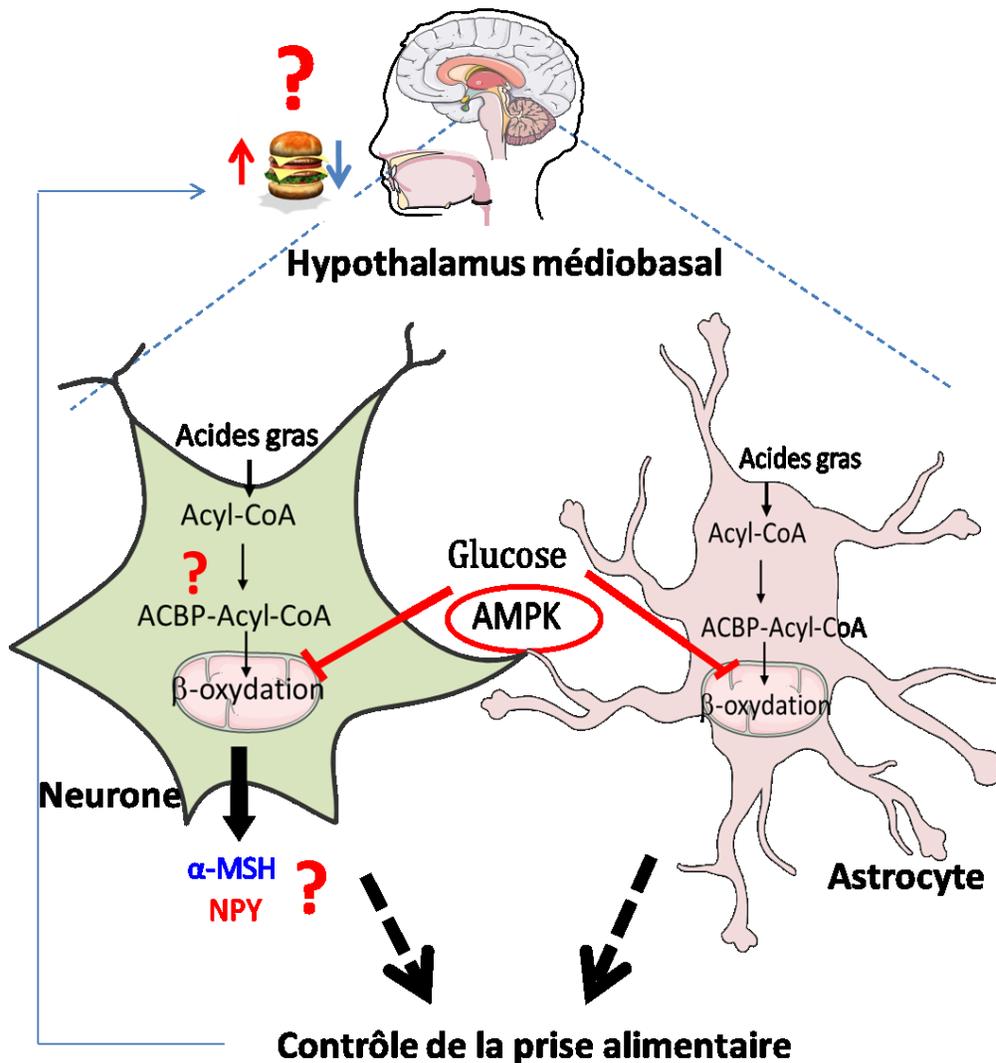


Figure 11 : Modèle proposé du couplage entre le métabolisme du glucose et des acides gras dans le MBH.

Le couplage entre le métabolisme du glucose et des acides gras existe au niveau du MBH, à la fois dans les astrocytes et les neurones en impliquant la voie de signalisation cellulaire AMPK. Dans les astrocytes, la protéine ACBP est impliquée dans la régulation de l'oxydation des LCFA, au moins pour l'oléate. Cependant, il reste à identifier si ACBP joue ce même rôle au niveau neuronal, et si ce couplage aurait pour effet une modulation de la prise alimentaire, via la modulation de l'expression des neuropeptides NPY et α MSH.

Conclusion et perspectives

Perspectifs

En perspective à ce travail, il serait judicieux d'établir en premier lieu, le rôle fonctionnel du couplage métabolique entre le glucose et les acides gras sur le contrôle de la prise alimentaire. Par exemple, on pourrait découpler le métabolisme du glucose et des acides gras via une surexpression de l'enzyme MCD par des outils génétiques telle que l'utilisation d'adénovirus afin de diminuer la formation du malonyl-CoA. Suite à cela, on pourra effectuer une mesure du métabolisme des acides gras en réponse à des concentrations croissantes du glucose ainsi qu'une mesure de la sécrétion, et/ou de l'expression des neuropeptides hypothalamiques contrôlant la prise alimentaire NPY et l' α -MSH.

D'autre part, il serait intéressant d'étudier si le couplage entre le métabolisme du glucose et des acides gras, est aussi sujet à régulation par les hormones telles que la leptine, l'insuline ou la ghréline. Ces hormones étant impliquées dans la modulation de l'AMPK, on pourrait imaginer qu'elles affectent le couplage métabolique en modulant l'activité de l'AMPK.

Pour vérifier cette hypothèse, on pourra réaliser des mesures de la bêta oxydation ainsi que l'estérification du palmitate, et/ou de l'oléate en réponse à des faibles et fortes concentrations du glucose, et en présence des différentes hormones à la fois *in vitro* et *ex vivo*.

Comme l'augmentation chronique de la leptine et de l'insuline sont des facteurs contribuant au développement de la résistance à l'insuline, on pourrait utiliser des concentrations croissantes d'hormones pour mieux élucider les mécanismes sous-jacents à l'altération du couplage entre le métabolisme du glucose et des acides gras. L'étude de la phosphorylation de l'AMPK dans ces mêmes conditions, nous permettra de mettre en évidence la relation de cause à effet entre le changement de la phosphorylation et l'activité de l'AMPK induite par les hormones, et le couplage métabolique entre le glucose et les acides gras.

Par ailleurs, les protéines impliquées dans la signalisation cellulaire ou le métabolisme intracellulaire des acides gras, constituent également une piste intéressante à explorer. Dans ce contexte, une étude récente vient de démontrer que l'enzyme Adipose Triglyceride Lipase (ATGL), enzyme responsable de la première

Conclusion et perspectives

phase de l'hydrolyse des TAG au niveau périphérique (Zimmermann, Strauss et al. 2004), est aussi exprimée et fonctionnelle au niveau cérébrale (Etschmaier, Becker et al. 2011). En effet, en utilisant un modèle de souris ATGL KO, les auteurs ont montré qu'une baisse modérée de l'activité de cet enzyme chez les souris ATGL-KO, conduit à une augmentation de 14 fois des niveaux cérébraux de TAG, ainsi qu'une altération dans la composition des acides gras dans le cerveau. (Etschmaier, Becker et al. 2011). Ces données suggèrent ainsi, qu'ATGL est impliquée dans les mécanismes régulant le métabolisme cérébral des acides gras. Des modèles de souris ATGL KO spécifiquement dans le cerveau pourront constituer un bon outil pour mieux élucider le rôle d'ATGL au niveau cérébral, et déterminer ainsi, si cette enzyme constituerait une nouvelle cible thérapeutique visant à bien réguler les niveaux lipidiques au niveau cérébral.

A long terme, et afin de mieux comprendre comment les acides gras se comportent après leur passage via la barrière hématoencéphalique, il serait d'une importance majeure d'identifier les différentes isoformes de transporteurs membranaires ainsi que les mécanismes sous-jacents au transport des acides gras dans les neurones et les astrocytes, un aspect qui demeure inconnu.

Dans ce contexte, une cible qui semblerait être importante à étudier, est le récepteur membranaire aux acides gras couplé à la protéine G, GPR120. Son implication pourrait être étudiée via un modèle animal dans lequel le gène GPR120 pourrait être invalidé spécifiquement dans le cerveau.

Une étude récente a notamment montré que les souris GPR120 KO affichent une réduction de leur préférence pour certains acides gras. Ceci suggère que GPR120 pourrait participer à la préférence du goût envers certains acides gras et qu'il pourrait constituer une cible vers une alimentation préférentielle saine et bénéfique (Cartoni, Yasumatsu et al. 2010).

Annexe I
Résultats complémentaires à l'étude I

Annexes

En complément aux résultats publiés dans la première étude, portant sur le couplage du métabolisme du glucose et des acides gras dans le MBH, nous avons tenté de tester l'effet du couplage sur la régulation de l'expression des neuropeptides dans les explants hypothalamiques et ceci en réponse au glucose en présence ou absence d'acides gras.

Effet du couplage entre le métabolisme du glucose et des acides gras sur l'expression des neuropeptides dans les explants hypothalamiques.

Par ces expériences, nous avons tenté de déterminer le rôle fonctionnel du couplage entre le métabolisme du glucose et des acides gras dans les explants du MBH. Ainsi, nous avons entrepris une série d'expériences pour tester si les régulations du métabolisme des acides gras par le glucose, étaient accompagnées de régulations au niveau de l'expression génique, des neuropeptides contrôlant la prise alimentaire. Dans un souci de garder l'intégrité des neurones se projetant du noyau arqué vers le PVN, nous avons décidé de faire une microdissection de cubes cérébraux, comprenant le MBH et le PVN. Les tissus ont été traités par la suite sous les mêmes conditions utilisées précédemment, pour les mesures d'oxydation et d'estérification excluant la présence du traceur radioactif.

Ainsi, les cubes cérébraux incluant, le MBH et le PVN, ont été traité en réponse à faible (1mM) et forte (10mM) concentration du glucose, en présence de palmitate ou d'oléate. Nous avons par la suite étudié le profil d'expression du gène c-Fos, marqueur de l'activation neuronale, et des neuropeptides AGRP et POMC, sur ces cubes cérébraux en utilisant la technique du qPCR en temps réel

Profil d'expression du marqueur de l'activation neuronale c-Fos

L'expression génique du marqueur c-Fos ne montre pas de changement significatif en réponse au traitement avec faible ou forte concentration de glucose, +/- palmitate ou oléate. Cependant, le palmitate montre une tendance à diminuer l'expression de

c-Fos et ceci, indépendamment de la concentration du glucose utilisée (Fig. supplémentaire 1 A).

Profil d'expression des neuropeptides AGRP/POMC

Toujours sous les mêmes conditions, nous avons étudié l'expression du neuropeptide AGRP. Nos résultats ne montrent pas de modification significative de l'expression du neuropeptide AGRP, en réponse au glucose +/- acides gras. Cependant, on peut noter qu'en présence d'oléate, l'expression d'AGRP tend à diminuer (Fig. supplémentaire 1 B). La tendance vers la diminution de l'expression d'AGRP en réponse à l'oléate est en accord avec des travaux antérieurs *d'Obici*, montrant que l'injection ICV de l'oléate chez des rats, induit une diminution de la prise alimentaire (Obici, Feng et al. 2002).

A l'instar de C-Fos et du neuropeptide AGRP, nous n'avons pas observé de modification significative de l'expression de POMC dans les cubes cérébraux (Fig. supplémentaire 1-C).

Ainsi, l'ensemble des résultats obtenus dans cette partie, ne nous permet pas d'émettre une conclusion solide.

Une des limitations de cette expérience qui pourrait expliquer l'absence d'effet significatif des acides gras sur l'expression de c-Fos et des neuropeptides AGRP et POMC, est le temps de traitement. Nous sommes conscients qu'un traitement de deux heures n'est peut-être pas suffisant pour induire des changements significatifs au niveau de l'expression génique. Cependant, notre choix du temps du traitement était basé sur celui effectué pour mesurer le métabolisme dans le tissu *ex vivo* ainsi que leur viabilité.

Prolonger le temps du traitement pourrait éventuellement induire des modifications significatives du profil d'expression des neuropeptides, et consolider les tendances observées dans les résultats présents. Cependant, compte tenu de l'épaisseur des cubes (1mm), par rapport à celle des explants (300u), utilisée précédemment pour les mesures du métabolisme, une prolongation du temps du traitement pourrait

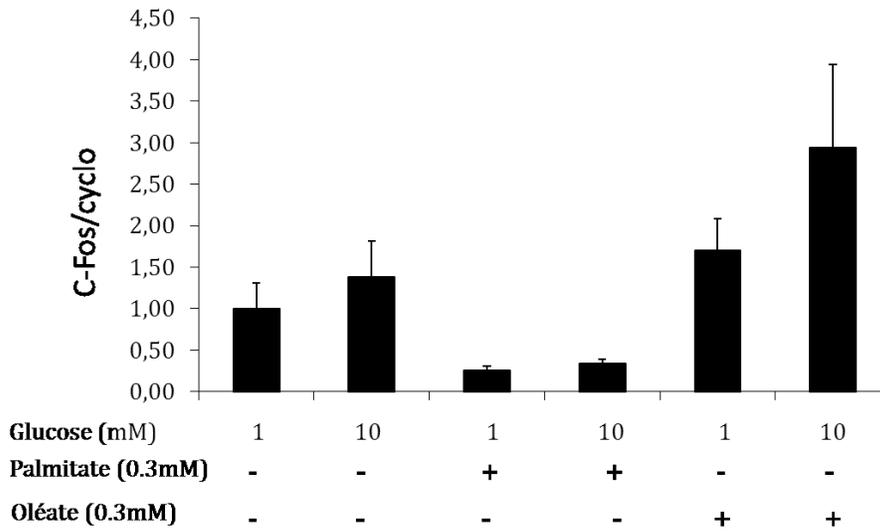
Annexes

altérer la viabilité des tissus. Une façon alternative serait de mesurer la sécrétion des neuropeptides dans ces mêmes conditions.

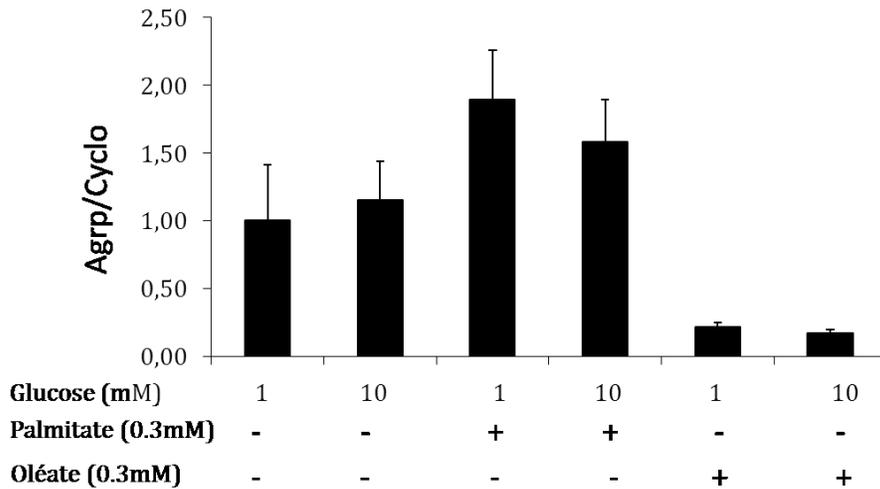
Globalement, l'ensemble des résultats obtenus dans cette partie ne nous permet pas de conclure sur l'effet du couplage entre le métabolisme du glucose et des acides gras sur l'expression des neuropeptides. Toutefois, on peut suggérer une tendance de l'oléate et non du palmitate à affecter l'expression de certains neuropeptides. Ceci est en accord avec une étude antérieure montrant que l'hypothalamus détecte d'une manière différentielle les acides gras. En particulier, l'oléate, mais pas le palmitate, réduit la prise alimentaire et le poids corporel impliquant la voie de signalisation POMC/MC4R (Schwinkendorf, Tsatsos et al. 2011).

Figure supplémentaire 1

(A)



(B)



(C)

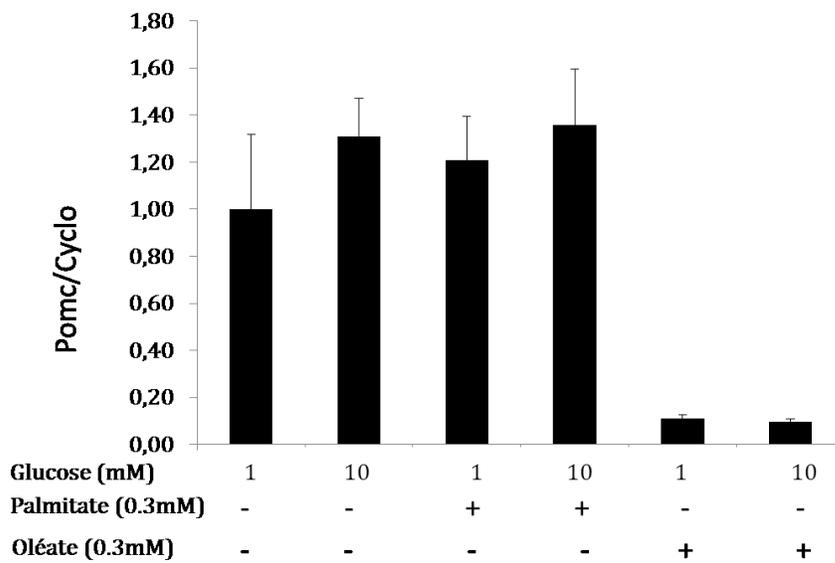


Fig. supplémentaire 1 : Profils d'expression du marqueur d'activation neuronal c-Fos (A) et des Neuropeptides AGRP (B) et POMC (C) en réponse au traitement avec du glucose +/- acides gras dans les cubes d'hypothalamus mediobasal. L'expression de c-Fos et des neuropeptides a été déterminée par qPCR, et les niveaux des ARNm ont été normalisés par les niveaux de l'ARNm de cyclophiline. Les résultats sont présentés en tant que moyenne +-S.E. n= 4-12 rats.

Annexe II

Implication d'ACBP dans l'inflammation
induite par les acides gras dans
l'hypothalamus?

Annexes

En continuation à la deuxième étude, je me suis intéressée à tester le rôle d'ACBP dans les effets pro-inflammatoires des acides gras. En effet, Une étude précédente dans des hépatocytes en culture, a montré que 30 minutes de traitement avec NBD (nucleotide-binding domain), un inhibiteur du facteur nucléaire kB (NF-kB) avant une stimulation avec la cytokine TNF α , induit une réduction significative de l'effet du TNF α sur l'expression de ACBP (Nitz, Kruse et al. 2011). NF kB étant un facteur de transcription au centre du métabolisme du glucose, des lipides et de l'inflammation, ces résultats démontrent qu'au niveau hépatique ACBP est une cible de NF-kB, et relie le métabolisme des acides gras à l'inflammation.

Nous avons donc émis l'hypothèse qu'ACBP pourrait être aussi impliqué dans l'inflammation induite par les acides gras au niveau de l'hypothalamus.

Afin de mettre en évidence le rôle d'ACBP dans l'inflammation au niveau hypothalamique, j'ai initié une série d'expériences consistant à traiter des astrocytes issus de souris WT ou ACBP nulles avec des acides gras et étudier le profil d'expression génique des effecteurs majeurs pro- et anti-inflammatoires incluant les gènes : IL-6, TNF α , IL-1b et NF-kb.

L'ensemble des résultats obtenus ne sont pas encore aboutis pour les inclure présentement dans ce manuscrit en tant que troisième article. Néanmoins, nos résultats préliminaires dans les astrocytes corticaux montrent d'une part dans les astrocytes issus des souris WT, que le traitement avec le palmitate induit une augmentation de l'expression d'IL6, ceci en comparaison avec la condition contrôle. Le traitement avec LPS est utilisé comme un contrôle positif (Fig. supplémentaire2(A)).

D'autre part nous avons noté dans les astrocytes ACBP nulles (KO) une tendance à la diminution de l'inflammation en réponse au palmitate (Fig. supplémentaire 2 (A)).

En revanche, nos résultats préliminaires ne montrent pas de changement dans l'expression de TNF α (Fig. supplémentaire 2(B)).

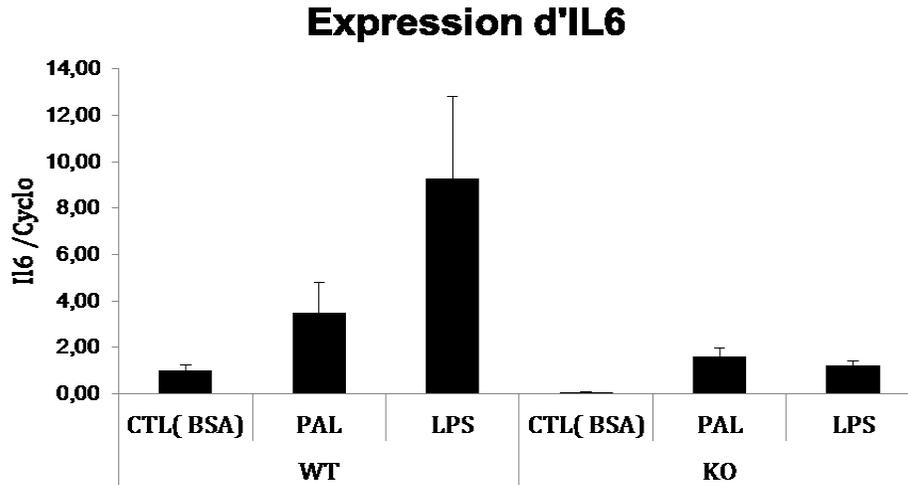
D'autres expériences sont en cours afin de reproduire les résultats observés dans les cultures des astrocytes corticaux ainsi que dans les astrocytes hypothalamiques.

Annexes

Par ailleurs, il a été montré récemment par *thaler et al* dans un modèle de rat et de souris, que 1-3 jours de régime riche en gras était capable d'induire de l'inflammation hypothalamique et ceci avant tout gain de poids substantiel (Thaler, Yi et al. 2012).

Nous sommes en train de tester aussi l'expression des gènes inflammatoires dans notre modèle de souris ACBP KO soumis à un régime riche en gras pendant 10 jours.

(A)



(B)

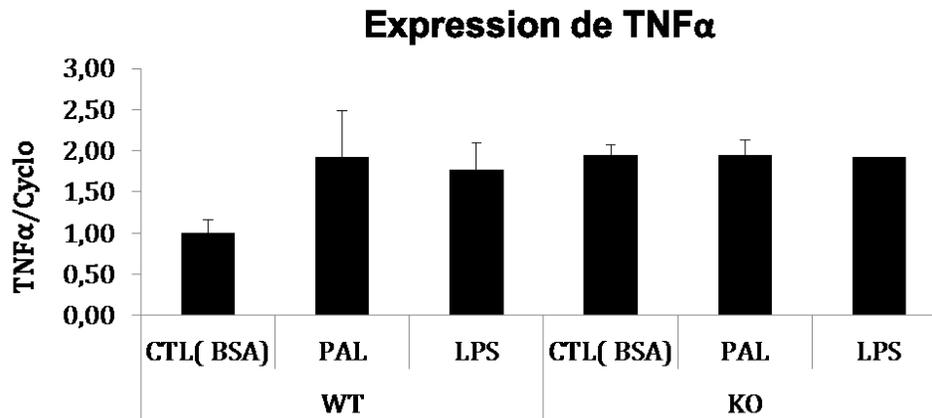


Fig. supplémentaire 2 : Comparaison des effets du palmitate sur l'expression des gènes inflammatoires Il-6 et TNF α dans des astrocytes corticaux des souris WT et ACBP nulles (KO).

Étude de profil d'expression d'IL6 (A), et expression de TNF α (B) par qPCR dans les cultures primaires des astrocytes corticaux en présence de glucose (15mM) sous des conditions contrôles (BSA) (0.33%), ou en présence du palmitate (Pal) (200uM). Les niveaux des ARNm ont été normalisés par les niveaux de l'ARNm de cyclophiline. Les LPS (1ug/ml) sont utilisés comme un contrôle positif. Les résultats sont présentés en tant que moyenne +-S.E. n= 2-3 exp.

Annexe III

Collaboration à d'autres études de recherche

En parallèle aux projets principaux faisant l'objet de ma thèse, j'ai également participé à une étude menée par le laboratoire du Docteur Prentki. L'étude portait sur le rôle d'une enzyme Monoacylglycerol lipase ABHD6 connue aussi sous le nom de α/β -hydrolase domain-containing protein 6 (ABHD6), impliquée dans le métabolisme des lipides, plus particulièrement elle dégrade les MAG, associées à la libération d'insuline dans le sang.

Cette étude a montré d'une part que la production des MAG était essentielle pour que les cellules bêta puissent sécréter l'insuline en réponse au glucose, et d'autre part que l'enzyme ABHD6 exerce un effet négatif sur le contrôle de la sécrétion d'insuline.

Ma contribution dans cette étude consistait à valider le modèle de souris ABHD6 nulles, spécifiquement dans le pancréas en testant que ce modèle de souris n'induit pas de recombinaison et de perte de l'expression d'ABHD6 dans les régions cérébrales. Il importe de noter que cette validation constituait une étape importante car d'autres lignées (CRE bêta-cell specific) présentaient une expression non spécifique dans l'hypothalamus. De ce fait nous sommes assurés que l'enzyme est bien exprimée dans différentes régions du cerveau.

Ce travail a donné lieu à l'article intitulé : α/β -Hydrolase Domain-6-Accessible Monoacylglycerol Controls GlucosStimulated Insulin Secretion.

Article publié dans le journal cell metabolism en 2014

[Cell Metab.](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.04.003) 2014 Jun 3;19(6):993-1007. doi: 10.1016/j.cmet.2014.04.003. Epub 2014 May 8.

Bibliographie :

- Abizaid, A. and T. L. Horvath (2012). "Ghrelin and the central regulation of feeding and energy balance." Indian J Endocrinol Metab **16**(Suppl 3): S617-626.
- Abo-Hashema, K. A., M. H. Cake, M. A. Lukas and J. Knudsen (2001). "The interaction of acyl-CoA with acyl-CoA binding protein and carnitine palmitoyltransferase I." Int J Biochem Cell Biol **33**(8): 807-815.
- Abumrad, N. A., M. R. el-Maghrabi, E. Z. Amri, E. Lopez and P. A. Grimaldi (1993). "Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36." J Biol Chem **268**(24): 17665-17668.
- Abumrad, N. A., J. H. Park and C. R. Park (1984). "Permeation of long-chain fatty acid into adipocytes. Kinetics, specificity, and evidence for involvement of a membrane protein." J Biol Chem **259**(14): 8945-8953.
- Aja, S., L. E. Landree, A. M. Kleman, S. M. Medghalchi, A. Vadlamudi, J. M. McFadden, A. Aplasca, J. Hyun, E. Plummer, K. Daniels, M. Kemm, C. A. Townsend, J. N. Thupari, F. P. Kuhajda, T. H. Moran and G. V. Ronnett (2008). "Pharmacological stimulation of brain carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and body weight." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **294**(2): R352-361.
- Alho, H., E. Costa, P. Ferrero, M. Fujimoto, D. Cosenza-Murphy and A. Guidotti (1985). "Diazepam-binding inhibitor: a neuropeptide located in selected neuronal populations of rat brain." Science **229**(4709): 179-182.
- Allen, N. J. and B. A. Barres (2009). "Neuroscience: Glia - more than just brain glue." Nature **457**(7230): 675-677.
- Alquier, T., J. Kawashima, Y. Tsuji and B. B. Kahn (2007). "Role of hypothalamic adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase in the impaired counterregulatory response induced by repetitive neuroglucopenia." Endocrinology **148**(3): 1367-1375.
- Alquier, T., C. Leloup, E. Arnaud, C. Magnan and L. Penicaud (2001). "Altered Glut4 mRNA levels in specific brain areas of hyperglycemic-hyperinsulinemic rats." Neurosci Lett **308**(2): 75-78.
- Amtul, Z., M. Uhrig, R. F. Rozmahel and K. Beyreuther (2011). "Structural insight into the differential effects of omega-3 and omega-6 fatty acids on the production of A β peptides and amyloid plaques." J Biol Chem **286**(8): 6100-6107.
- Andersson, U., K. Filipsson, C. R. Abbott, A. Woods, K. Smith, S. R. Bloom, D. Carling and C. J. Small (2004). "AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake." J Biol Chem **279**(13): 12005-12008.
- Andrews, Z. B., Z. W. Liu, N. Wallingford, D. M. Erion, E. Borok, J. M. Friedman, M. H. Tschop, M. Shanabrough, G. Cline, G. I. Shulman, A. Coppola, X. B. Gao, T. L. Horvath and S. Diano (2008). "UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals." Nature **454**(7206): 846-851.
- Araque, A., V. Parpura, R. P. Sanzgiri and P. G. Haydon (1999). "Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner." Trends Neurosci **22**(5): 208-215.
- Arлуison, M., M. Quignon, B. Thorens, C. Leloup and L. Penicaud (2004). "Immunocytochemical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain. II. Electron microscopic study." J Chem Neuroanat **28**(3): 137-146.
- Arora, S. and Anubhuti (2006). "Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review." Neuropeptides **40**(6): 375-401.
- Arsenault, D., C. Julien, C. T. Chen, R. P. Bazinet and F. Calon (2012). "Dietary intake of unsaturated fatty acids modulates physiological properties of entorhinal cortex neurons in mice." J Neurochem **122**(2): 427-443.

Attwell, D., A. M. Buchan, S. Charpak, M. Lauritzen, B. A. Macvicar and E. A. Newman (2010). "Glial and neuronal control of brain blood flow." *Nature* **468**(7321): 232-243.

Auestad, N., R. A. Korsak, J. W. Morrow and J. Edmond (1991). "Fatty acid oxidation and ketogenesis by astrocytes in primary culture." *J Neurochem* **56**(4): 1376-1386.

Azagury, D. E. and D. B. Lautz (2011). "Obesity overview: epidemiology, health and financial impact, and guidelines for qualification for surgical therapy." *Gastrointest Endosc Clin N Am* **21**(2): 189-201.

Bak, L. K., A. Schousboe and H. S. Waagepetersen (2006). "The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer." *J Neurochem* **98**(3): 641-653.

Balendiran, G. K., F. Schnutgen, G. Scapin, T. Borchers, N. Xhong, K. Lim, R. Godbout, F. Spener and J. C. Sacchettini (2000). "Crystal structure and thermodynamic analysis of human brain fatty acid-binding protein." *J Biol Chem* **275**(35): 27045-27054.

Banks, W. A. (2004). "The source of cerebral insulin." *Eur J Pharmacol* **490**(1-3): 5-12.

Banks, W. A., J. B. Owen and M. A. Erickson (2012). "Insulin in the brain: there and back again." *Pharmacol Ther* **136**(1): 82-93.

Bass, N. M., E. Raghupathy, D. E. Rhoads, J. A. Manning and R. K. Ockner (1984). "Partial purification of molecular weight 12 000 fatty acid binding proteins from rat brain and their effect on synaptosomal Na⁺-dependent amino acid uptake." *Biochemistry* **23**(26): 6539-6544.

Bates, S. H. and M. G. Myers (2004). "The role of leptin-->STAT3 signaling in neuroendocrine function: an integrative perspective." *J Mol Med (Berl)* **82**(1): 12-20.

Bates, S. H., W. H. Stearns, T. A. Dundon, M. Schubert, A. W. Tso, Y. Wang, A. S. Banks, H. J. Lavery, A. K. Haq, E. Maratos-Flier, B. G. Neel, M. W. Schwartz and M. G. Myers, Jr. (2003). "STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction." *Nature* **421**(6925): 856-859.

Bazan, N. G. (2007). "Omega-3 fatty acids, pro-inflammatory signaling and neuroprotection." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **10**(2): 136-141.

Beall, C., D. L. Hamilton, J. Gallagher, L. Logie, K. Wright, M. P. Soutar, S. Dadak, F. B. Ashford, E. Haythorne, Q. Du, A. Jovanovic, R. J. McCrimmon and M. L. Ashford (2012). "Mouse hypothalamic GT1-7 cells demonstrate AMPK-dependent intrinsic glucose-sensing behaviour." *Diabetologia* **55**(9): 2432-2444.

Belanger, M., I. Allaman and P. J. Magistretti (2011). "Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation." *Cell Metab* **14**(6): 724-738.

Belgardt, B. F., T. Okamura and J. C. Bruning (2009). "Hormone and glucose signalling in POMC and AgRP neurons." *J Physiol* **587**(Pt 22): 5305-5314.

Belsham, D. D., L. J. Fick, P. S. Dalvi, M. L. Centeno, J. A. Chalmers, P. K. Lee, Y. Wang, D. J. Drucker and M. M. Koletar (2009). "Ciliary neurotrophic factor recruitment of glucagon-like peptide-1 mediates neurogenesis, allowing immortalization of adult murine hypothalamic neurons." *FASEB J* **23**(12): 4256-4265.

Benani, A., C. Hryhorczuk, A. Gouaze, X. Fioramonti, X. Brenachot, C. Guissard, A. Krezymon, T. Duparc, A. Colom, E. Nedelec, C. Rigault, A. Lemoine, J. Gascuel, R. Gerardy-Schahn, P. Valet, C. Knauf, A. Lorsignol and L. Penicaud (2012). "Food intake adaptation to dietary fat involves PSA-dependent rewiring of the arcuate melanocortin system in mice." *J Neurosci* **32**(35): 11970-11979.

Benani, A., S. Troy, M. C. Carmona, X. Fioramonti, A. Lorsignol, C. Leloup, L. Casteilla and L. Penicaud (2007). "Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: redox regulation of food intake." *Diabetes* **56**(1): 152-160.

Benarroch, E. E. (2011). "Circumventricular organs: receptive and homeostatic functions and clinical implications." *Neurology* **77**(12): 1198-1204.

Benoit, S. C., C. J. Kemp, C. F. Elias, W. Abplanalp, J. P. Herman, S. Migrenne, A. L. Lefevre, C. Cruciani-Guglielmacci, C. Magnan, F. Yu, K. Niswender, B. G. Irani, W. L. Holland and D. J. Clegg (2009). "Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents." *J Clin Invest* **119**(9): 2577-2589.

Bernoud, N., L. Fenart, C. Benistant, J. F. Pageaux, M. P. Dehouck, P. Moliere, M. Lagarde, R. Cecchelli and J. Lecerc (1998). "Astrocytes are mainly responsible for the polyunsaturated fatty acid enrichment in blood-brain barrier endothelial cells in vitro." *J Lipid Res* **39**(9): 1816-1824.

Berthoud, H. R. (2007). "Interactions between the "cognitive" and "metabolic" brain in the control of food intake." *Physiol Behav* **91**(5): 486-498.

Beverly, J. L. and R. J. Martin (1991). "Influence of fatty acid oxidation in lateral hypothalamus on food intake and body composition." *Am J Physiol* **261**(2 Pt 2): R339-343.

Bewick, G. A., J. V. Gardiner, W. S. Dhillon, A. S. Kent, N. E. White, Z. Webster, M. A. Ghatei and S. R. Bloom (2005). "Post-embryonic ablation of AgRP neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype." *FASEB J* **19**(12): 1680-1682.

Bi, S., Y. J. Kim and F. Zheng (2012). "Dorsomedial hypothalamic NPY and energy balance control." *Neuropeptides* **46**(6): 309-314.

Bicknell, A. B. (2008). "The tissue-specific processing of pro-opiomelanocortin." *J Neuroendocrinol* **20**(6): 692-699.

Black, P. N. and C. C. DiRusso (2003). "Transmembrane movement of exogenous long-chain fatty acids: proteins, enzymes, and vectorial esterification." *Microbiol Mol Biol Rev* **67**(3): 454-472, table of contents.

Blanco Martinez de Morentin, P., C. R. Gonzalez, A. K. Saha, L. Martins, C. Dieguez, A. Vidal-Puig, M. Tena-Sempere and M. Lopez (2011). "Hypothalamic AMP-activated protein kinase as a mediator of whole body energy balance." *Rev Endocr Metab Disord* **12**(3): 127-140.

Blazquez, C., A. Woods, M. L. de Ceballos, D. Carling and M. Guzman (1999). "The AMP-activated protein kinase is involved in the regulation of ketone body production by astrocytes." *J Neurochem* **73**(4): 1674-1682.

Bloksgaard, M., S. Bek, A. B. Marcher, D. Neess, J. Brewer, H. K. Hannibal-Bach, T. Helledie, C. Fenger, M. Due, Z. Berzina, R. Neubert, J. Chemnitz, B. Finsen, A. Clemmensen, J. Wilbertz, H. Saxtorph, J. Knudsen, L. Bagatolli and S. Mandrup (2012). "The acyl-CoA binding protein is required for normal epidermal barrier function in mice." *J Lipid Res* **53**(10): 2162-2174.

Bloksgaard, M., D. Neess, N. J. Faergeman and S. Mandrup (2014). "Acyl-CoA binding protein and epidermal barrier function." *Biochim Biophys Acta* **1841**(3): 369-376.

Bloomquist, B. T., B. A. Eipper and R. E. Mains (1991). "Prohormone-converting enzymes: regulation and evaluation of function using antisense RNA." *Mol Endocrinol* **5**(12): 2014-2024.

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

Borg, M. A., W. V. Tamborlane, G. I. Shulman and R. S. Sherwin (2003). "Local lactate perfusion of the ventromedial hypothalamus suppresses hypoglycemic counterregulation." *Diabetes* **52**(3): 663-666.

Borg, M. L., S. F. Omran, J. Weir, P. J. Meikle and M. J. Watt (2012). "Consumption of a high-fat diet, but not regular endurance exercise training, regulates hypothalamic lipid accumulation in mice." *J Physiol* **590**(Pt 17): 4377-4389.

Bray, G. A. and D. H. Ryan (2014). "Update on obesity pharmacotherapy." *Ann N Y Acad Sci* **1311**: 1-13.

Broberger, C., J. Johansen, C. Johansson, M. Schalling and T. Hokfelt (1998). "The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(25): 15043-15048.

Broberger, C., M. Landry, H. Wong, J. N. Walsh and T. Hokfelt (1997). "Subtypes Y1 and Y2 of the neuropeptide Y receptor are respectively expressed in pro-opiomelanocortin- and neuropeptide-Y-containing neurons of the rat hypothalamic arcuate nucleus." *Neuroendocrinology* **66**(6): 393-408.

Brosche, T. and D. Platt (1998). "The biological significance of plasmalogens in defense against oxidative damage." *Exp Gerontol* **33**(5): 363-369.

Bruning, J. C., D. Gautam, D. J. Burks, J. Gillette, M. Schubert, P. C. Orban, R. Klein, W. Krone, D. Muller-Wieland and C. R. Kahn (2000). "Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction." *Science* **289**(5487): 2122-2125.

Bushong, E. A., M. E. Martone, Y. Z. Jones and M. H. Ellisman (2002). "Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains." *J Neurosci* **22**(1): 183-192.

Cangiano, C., P. Cardelli-Cangiano, A. Cascino, M. A. Patrizi, F. Barberini, F. Rossi Fanelli, L. Capocaccia and R. Strom (1983). "On the stimulation by insulin of tryptophan transport across the blood-brain barrier." *Biochem Int* **7**(5): 617-627.

Cansell, C., R. G. Denis, A. Joly-Amado, J. Castel and S. Luquet (2012). "Arcuate AgRP neurons and the regulation of energy balance." *Front Endocrinol (Lausanne)* **3**: 169.

Cartoni, C., K. Yasumatsu, T. Ohkuri, N. Shigemura, R. Yoshida, N. Godinot, J. le Coutre, Y. Ninomiya and S. Damak (2010). "Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120." *J Neurosci* **30**(25): 8376-8382.

Cascio, G., G. Schiera and I. Di Liegro (2012). "Dietary fatty acids in metabolic syndrome, diabetes and cardiovascular diseases." *Curr Diabetes Rev* **8**(1): 2-17.

Chari, M., C. S. Yang, C. K. Lam, K. Lee, P. Mighiu, A. Kokorovic, G. W. Cheung, T. Y. Lai, P. Y. Wang and T. K. Lam (2011). "Glucose transporter-1 in the hypothalamic glial cells mediates glucose sensing to regulate glucose production in vivo." *Diabetes* **60**(7): 1901-1906.

Chaudhari, N., E. Pereira and S. D. Roper (2009). "Taste receptors for umami: the case for multiple receptors." *Am J Clin Nutr* **90**(3): 738S-742S.

Chayer, C. and M. Freedman (2001). "Frontal lobe functions." *Curr Neurol Neurosci Rep* **1**(6): 547-552.

Chen, C. and N. G. Bazan (2005). "Lipid signaling: sleep, synaptic plasticity, and neuroprotection." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **77**(1-4): 65-76.

Chen, C. T. and R. P. Bazinet (2014). "beta-oxidation and rapid metabolism, but not uptake regulate brain eicosapentaenoic acid levels." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*.

Chih, C. P. and E. L. Roberts Jr (2003). "Energy substrates for neurons during neural activity: a critical review of the astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis." *J Cereb Blood Flow Metab* **23**(11): 1263-1281.

Chronwall, B. M., D. A. DiMaggio, V. J. Massari, V. M. Pickel, D. A. Ruggiero and T. L. O'Donohue (1985). "The anatomy of neuropeptide-Y-containing neurons in rat brain." *Neuroscience* **15**(4): 1159-1181.

Cintra, D. E., E. R. Ropelle, J. C. Moraes, J. R. Pauli, J. Morari, C. T. Souza, R. Grimaldi, M. Stahl, J. B. Carvalheira, M. J. Saad and L. A. Velloso (2012). "Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity." *PLoS One* **7**(1): e30571.

Clapham, J. C. (2012). "Central control of thermogenesis." *Neuropharmacology* **63**(1): 111-123.

Claret, M., M. A. Smith, R. L. Batterham, C. Selman, A. I. Choudhury, L. G. Fryer, M. Clements, H. Al-Qassab, H. Heffron, A. W. Xu, J. R. Speakman, G. S. Barsh, B. Viollet, S. Vaulont, M. L. Ashford,

D. Carling and D. J. Withers (2007). "AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons." J Clin Invest **117**(8): 2325-2336.

Clarke, D. W., L. Mudd, F. T. Boyd, Jr., M. Fields and M. K. Raizada (1986). "Insulin is released from rat brain neuronal cells in culture." J Neurochem **47**(3): 831-836.

Clement, L., C. Cruciani-Guglielmacci, C. Magnan, M. Vincent, L. Douared, M. Orosco, F. Assimacopoulos-Jeannet, L. Penicaud and A. Ktorza (2002). "Intracerebroventricular infusion of a triglyceride emulsion leads to both altered insulin secretion and hepatic glucose production in rats." Pflugers Arch **445**(3): 375-380.

Coe, N. R., A. J. Smith, B. I. Frohnert, P. A. Watkins and D. A. Bernlohr (1999). "The fatty acid transport protein (FATP1) is a very long chain acyl-CoA synthetase." J Biol Chem **274**(51): 36300-36304.

Cohen Simonsen, A., U. Bernchou Jensen, N. J. Faergeman, J. Knudsen and O. G. Mouritsen (2003). "Acyl-coenzyme A organizes laterally in membranes and is recognized specifically by acyl-coenzyme A binding protein." FEBS Lett **552**(2-3): 253-258.

Coleman, R. A. and D. P. Lee (2004). "Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation." Prog Lipid Res **43**(2): 134-176.

Coluccia, A., P. Borracci, G. Renna, A. Giustino, T. Latronico, P. Riccio and M. R. Carratu (2009). "Developmental omega-3 supplementation improves motor skills in juvenile-adult rats." Int J Dev Neurosci **27**(6): 599-605.

Compere, V., S. Li, J. Leprince, M. C. Tonon, H. Vaudry and G. Pelletier (2003). "Effect of intracerebroventricular administration of the octadecaneuropeptide on the expression of pro-opiomelanocortin, neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone mRNAs in rat hypothalamus." J Neuroendocrinol **15**(2): 197-203.

Compere, V., S. Li, J. Leprince, M. C. Tonon, H. Vaudry and G. Pelletier (2005). "In vivo action of a new octadecaneuropeptide antagonist on neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone mRNA levels in rat." Brain Res Mol Brain Res **141**(2): 156-160.

Cone, R. D. (2005). "Anatomy and regulation of the central melanocortin system." Nat Neurosci **8**(5): 571-578.

Connolly, J., T. Romano and M. Patruno (1999). "Selections from current literature: effects of dieting and exercise on resting metabolic rate and implications for weight management." Fam Pract **16**(2): 196-201.

Connor, S., G. Tenorio, M. T. Clandinin and Y. Sauve (2012). "DHA supplementation enhances high-frequency, stimulation-induced synaptic transmission in mouse hippocampus." Appl Physiol Nutr Metab **37**(5): 880-887.

Contreras, C., F. Gonzalez, J. Ferno, C. Dieguez, K. Rahmouni, R. Nogueiras and M. Lopez (2014). "The brain and brown fat." Ann Med: 1-19.

Coraci, I. S., J. Husemann, J. W. Berman, C. Hulette, J. H. Dufour, G. K. Campanella, A. D. Luster, S. C. Silverstein and J. B. El-Khoury (2002). "CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils." Am J Pathol **160**(1): 101-112.

Costa, E., M. G. Corda and A. Guidotti (1983). "On a brain polypeptide functioning as a putative effector for the recognition sites of benzodiazepine and beta-carboline derivatives." Neuropharmacology **22**(12B): 1481-1492.

Costa, E. and A. Guidotti (1991). "Diazepam binding inhibitor (DBI): a peptide with multiple biological actions." Life Sci **49**(5): 325-344.

Cota, D., K. Proulx, K. A. Smith, S. C. Kozma, G. Thomas, S. C. Woods and R. J. Seeley (2006). "Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake." Science **312**(5775): 927-930.

Cruciani-Guglielmacci, C., A. Hervalet, L. Douared, N. M. Sanders, B. E. Levin, A. Ktorza and C. Magnan (2004). "Beta oxidation in the brain is required for the effects of non-esterified fatty acids on glucose-induced insulin secretion in rats." *Diabetologia* **47**(11): 2032-2038.

Cummings, D. E., J. Q. Purnell, R. S. Frayo, K. Schmidova, B. E. Wisse and D. S. Weigle (2001). "A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans." *Diabetes* **50**(8): 1714-1719.

Cunnane, S. C., C. R. Nadeau and S. S. Likhodii (2001). "NMR and isotope ratio mass spectrometry studies of in vivo uptake and metabolism of polyunsaturates by the developing rat brain." *J Mol Neurosci* **16**(2-3): 173-180; discussion 215-121.

Dai, Y., M. J. Wolfgang, S. H. Cha and M. D. Lane (2007). "Localization and effect of ectopic expression of CPT1c in CNS feeding centers." *Biochem Biophys Res Commun* **359**(3): 469-474.

Dale, N. (2011). "Purinergic signaling in hypothalamic tanycytes: potential roles in chemosensing." *Semin Cell Dev Biol* **22**(2): 237-244.

Dalvi, P. S., A. Nazarians-Armavil, S. Tung and D. D. Belsham (2011). "Immortalized neurons for the study of hypothalamic function." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **300**(5): R1030-1052.

de Mateos-Verchere, J. G., J. Leprince, M. C. Tonon, H. Vaudry and J. Costentin (2001). "The octadecaneuropeptide [diazepam-binding inhibitor (33-50)] exerts potent anorexigenic effects in rodents." *Eur J Pharmacol* **414**(2-3): 225-231.

de Quidt, M. E. and P. C. Emson (1986). "Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system--II. Immunohistochemical analysis." *Neuroscience* **18**(3): 545-618.

Dezaki, K., H. Hosoda, M. Kakei, S. Hashiguchi, M. Watanabe, K. Kangawa and T. Yada (2004). "Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca²⁺ signaling in beta-cells: implication in the glycemic control in rodents." *Diabetes* **53**(12): 3142-3151.

Dhopeswarkar, G. A. and J. F. Mead (1973). "Uptake and transport of fatty acids into the brain and the role of the blood-brain barrier system." *Adv Lipid Res* **11**(0): 109-142.

Duan, X., E. Kang, C. Y. Liu, G. L. Ming and H. Song (2008). "Development of neural stem cell in the adult brain." *Curr Opin Neurobiol* **18**(1): 108-115.

Dunn-Meynell, A. A., V. H. Routh, L. Kang, L. Gaspers and B. E. Levin (2002). "Glucokinase is the likely mediator of glucosensing in both glucose-excited and glucose-inhibited central neurons." *Diabetes* **51**(7): 2056-2065.

Dutta-Roy, A. K. (2000). "Cellular uptake of long-chain fatty acids: role of membrane-associated fatty-acid-binding/transport proteins." *Cell Mol Life Sci* **57**(10): 1360-1372.

Earnest, D. J., F. Q. Liang, S. DiGiorgio, M. Gallagher, B. Harvey, B. Earnest and G. Seigel (1999). "Establishment and characterization of adenoviral E1A immortalized cell lines derived from the rat suprachiasmatic nucleus." *J Neurobiol* **39**(1): 1-13.

Eaton, S., K. Bartlett and M. Pourfarzam (1996). "Mammalian mitochondrial beta-oxidation." *Biochem J* **320** (Pt 2): 345-357.

Edmond, J. (1992). "Energy metabolism in developing brain cells." *Can J Physiol Pharmacol* **70** Suppl: S118-129.

Edmond, J. (2001). "Essential polyunsaturated fatty acids and the barrier to the brain: the components of a model for transport." *J Mol Neurosci* **16**(2-3): 181-193; discussion 215-121.

Edmond, J., R. A. Robbins, J. D. Bergstrom, R. A. Cole and J. de Vellis (1987). "Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture." *J Neurosci Res* **18**(4): 551-561.

El-Assaad, W., J. Buteau, M. L. Peyot, C. Nolan, R. Roduit, S. Hardy, E. Joly, G. Dbaibo, L. Rosenberg and M. Prentki (2003). "Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death." *Endocrinology* **144**(9): 4154-4163.

El Messari, S., A. Ait-Ikhlef, D. H. Ambroise, L. Penicaud and M. Arluison (2002). "Expression of insulin-responsive glucose transporter GLUT4 mRNA in the rat brain and spinal cord: an in situ hybridization study." *J Chem Neuroanat* **24**(4): 225-242.

Elle, I. C., K. T. Simonsen, L. C. Olsen, P. K. Birck, S. Ehmsen, S. Tuck, T. T. Le and N. J. Faergeman (2011). "Tissue- and paralogue-specific functions of acyl-CoA-binding proteins in lipid metabolism in *Caenorhabditis elegans*." *Biochem J* **437**(2): 231-241.

Emsley, J. G. and J. D. Macklis (2006). "Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS." *Neuron Glia Biol* **2**(3): 175-186.

Engelhardt, B. and L. Sorokin (2009). "The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction." *Semin Immunopathol* **31**(4): 497-511.

Etschmaier, K., T. Becker, T. O. Eichmann, C. Schweinzer, M. Scholler, C. Tam-Amersdorfer, M. Poeckl, R. Schuligoi, A. Kober, A. P. Chirackal Manavalan, G. N. Rechberger, I. E. Streith, R. Zechner, R. Zimmermann and U. Panzenboeck (2011). "Adipose triglyceride lipase affects triacylglycerol metabolism at brain barriers." *J Neurochem* **119**(5): 1016-1028.

Faergeman, N. J. and J. Knudsen (1997). "Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling." *Biochem J* **323** (Pt 1): 1-12.

Faergeman, N. J., M. Wadum, S. Feddersen, M. Burton, B. B. Kragelund and J. Knudsen (2007). "Acyl-CoA binding proteins; structural and functional conservation over 2000 MYA." *Mol Cell Biochem* **299**(1-2): 55-65.

Farina, C., F. Aloisi and E. Meinl (2007). "Astrocytes are active players in cerebral innate immunity." *Trends Immunol* **28**(3): 138-145.

Farooqi, I. S. and S. O'Rahilly (2005). "Monogenic obesity in humans." *Annu Rev Med* **56**: 443-458.

Fick, L. J., G. H. Fick and D. D. Belsham (2011). "Palmitate alters the rhythmic expression of molecular clock genes and orexigenic neuropeptide Y mRNA levels within immortalized, hypothalamic neurons." *Biochem Biophys Res Commun* **413**(3): 414-419.

Fields, R. D. and B. Stevens-Graham (2002). "New insights into neuron-glia communication." *Science* **298**(5593): 556-562.

Fioramonti, X., A. Lorsignol, A. Taupignon and L. Penicaud (2004). "A new ATP-sensitive K⁺ channel-independent mechanism is involved in glucose-excited neurons of mouse arcuate nucleus." *Diabetes* **53**(11): 2767-2775.

Fitscher, B. A., H. D. Riedel, K. C. Young and W. Stremmel (1998). "Tissue distribution and cDNA cloning of a human fatty acid transport protein (hsFATP4)." *Biochim Biophys Acta* **1443**(3): 381-385.

Formiguera, X. and A. Canton (2004). "Obesity: epidemiology and clinical aspects." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **18**(6): 1125-1146.

Frayling, C., R. Britton and N. Dale (2011). "ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanycytes." *J Physiol* **589**(Pt 9): 2275-2286.

Friedman, J. M. and J. L. Halaas (1998). "Leptin and the regulation of body weight in mammals." *Nature* **395**(6704): 763-770.

Fukao, T. (2003). "[Molecular studies on inborn errors of ketone body metabolism]." *Seikagaku* **75**(4): 293-297.

Gaigg, B., T. B. Neergaard, R. Schneiter, J. K. Hansen, N. J. Faergeman, N. A. Jensen, J. R. Andersen, J. Friis, R. Sandhoff, H. D. Schroder and J. Knudsen (2001). "Depletion of acyl-

coenzyme A-binding protein affects sphingolipid synthesis and causes vesicle accumulation and membrane defects in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Biol Cell **12**(4): 1147-1160.

Gandhi, G. K., N. F. Cruz, K. K. Ball and G. A. Dienel (2009). "Astrocytes are poised for lactate trafficking and release from activated brain and for supply of glucose to neurons." J Neurochem **111**(2): 522-536.

Gao, S., N. Casals, W. Keung, T. H. Moran and G. D. Lopaschuk (2013). "Differential effects of central ghrelin on fatty acid metabolism in hypothalamic ventral medial and arcuate nuclei." Physiol Behav **118**: 165-170.

Gao, S., W. Keung, D. Serra, W. Wang, P. Carrasco, N. Casals, F. G. Hegardt, T. H. Moran and G. D. Lopaschuk (2011). "Malonyl-CoA mediates leptin hypothalamic control of feeding independent of inhibition of CPT-1a." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **301**(1): R209-217.

Gao, S., K. P. Kinzig, S. Aja, K. A. Scott, W. Keung, S. Kelly, K. Strynadka, S. Chohnan, W. W. Smith, K. L. Tamashiro, E. E. Ladenheim, G. V. Ronnett, Y. Tu, M. J. Birnbaum, G. D. Lopaschuk and T. H. Moran (2007). "Leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase to inhibit food intake." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(44): 17358-17363.

Gao, S. and M. D. Lane (2003). "Effect of the anorectic fatty acid synthase inhibitor C75 on neuronal activity in the hypothalamus and brainstem." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 5628-5633.

Gao, S., T. H. Moran, G. D. Lopaschuk and A. A. Butler (2013). "Hypothalamic malonyl-CoA and the control of food intake." Physiol Behav **122C**: 17-24.

Gao, S., G. Zhu, X. Gao, D. Wu, P. Carrasco, N. Casals, F. G. Hegardt, T. H. Moran and G. D. Lopaschuk (2011). "Important roles of brain-specific carnitine palmitoyltransferase and ceramide metabolism in leptin hypothalamic control of feeding." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(23): 9691-9696.

Gardiner, J. V., W. M. Kong, H. Ward, K. G. Murphy, W. S. Dhillon and S. R. Bloom (2005). "AAV mediated expression of anti-sense neuropeptide Y cRNA in the arcuate nucleus of rats results in decreased weight gain and food intake." Biochem Biophys Res Commun **327**(4): 1088-1093.

Garfield, A. S., D. D. Lam, O. J. Marston, M. J. Przydzial and L. K. Heisler (2009). "Role of central melanocortin pathways in energy homeostasis." Trends Endocrinol Metab **20**(5): 203-215.

Gavillet, M., I. Allaman and P. J. Magistretti (2008). "Modulation of astrocytic metabolic phenotype by proinflammatory cytokines." Glia **56**(9): 975-989.

Gehlert, D. R. (2004). "Introduction to the reviews on neuropeptide Y." Neuropeptides **38**(4): 135-140.

Ghamari-Langroudi, M., D. Srisai and R. D. Cone (2011). "Multinodal regulation of the arcuate/paraventricular nucleus circuit by leptin." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(1): 355-360.

Giaume, C. and K. D. McCarthy (1996). "Control of gap-junctional communication in astrocytic networks." Trends Neurosci **19**(8): 319-325.

Glees, P. and K. Meller (1964). "The Finer Structure of Synapses and Neurones. A Review of Recent Electronmicroscopical Studies." Paraplegia **2**: 77-95.

Glickstein, M. (2007). "What does the cerebellum really do?" Curr Biol **17**(19): R824-827.

Gregor, M. F. and G. S. Hotamisligil (2011). "Inflammatory mechanisms in obesity." Annu Rev Immunol **29**: 415-445.

Grimes, C. A. and R. S. Jope (2001). "The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling." Prog Neurobiol **65**(4): 391-426.

Grove, K. L., S. Allen, B. E. Grayson and M. S. Smith (2003). "Postnatal development of the hypothalamic neuropeptide Y system." Neuroscience **116**(2): 393-406.

Guan, X. M., H. Yu, M. Trumbauer, E. Frazier, L. H. Van der Ploeg and H. Chen (1998). "Induction of neuropeptide Y expression in dorsomedial hypothalamus of diet-induced obese mice." Neuroreport **9**(15): 3415-3419.

Guillod-Maximin, E., A. Lorsignol, T. Alquier and L. Penicaud (2004). "Acute intracarotid glucose injection towards the brain induces specific c-fos activation in hypothalamic nuclei: involvement of astrocytes in cerebral glucose-sensing in rats." J Neuroendocrinol **16**(5): 464-471.

Gupta, S., A. G. Knight, S. Gupta, J. N. Keller and A. J. Bruce-Keller (2012). "Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes." J Neurochem **120**(6): 1060-1071.

Haast, R. A. and A. J. Kiliaan (2014). "Impact of fatty acids on brain circulation, structure and function." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.

Hagan, M. M., P. A. Rushing, L. M. Pritchard, M. W. Schwartz, A. M. Strack, L. H. Van Der Ploeg, S. C. Woods and R. J. Seeley (2000). "Long-term orexigenic effects of AgRP-(83---132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **279**(1): R47-52.

Hamilton, J. A. (1999). "Transport of fatty acids across membranes by the diffusion mechanism." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **60**(5-6): 291-297.

Hamilton, J. A. and K. Brunaldi (2007). "A model for fatty acid transport into the brain." J Mol Neurosci **33**(1): 12-17.

Han, S. M., C. Namkoong, P. G. Jang, I. S. Park, S. W. Hong, H. Katakami, S. Chun, S. W. Kim, J. Y. Park, K. U. Lee and M. S. Kim (2005). "Hypothalamic AMP-activated protein kinase mediates counter-regulatory responses to hypoglycaemia in rats." Diabetologia **48**(10): 2170-2178.

Hardie, D. G., F. A. Ross and S. A. Hawley (2012). "AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(4): 251-262.

Harms, K. J. and A. Dunaevsky (2007). "Dendritic spine plasticity: looking beyond development." Brain Res **1184**: 65-71.

Harrold, J. A., G. Williams and P. S. Widdowson (2000). "Early leptin response to a palatable diet predicts dietary obesity in rats: key role of melanocortin-4 receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus." J Neurochem **74**(3): 1224-1228.

Haskell-Luevano, C., P. Chen, C. Li, K. Chang, M. S. Smith, J. L. Cameron and R. D. Cone (1999). "Characterization of the neuroanatomical distribution of agouti-related protein immunoreactivity in the rhesus monkey and the rat." Endocrinology **140**(3): 1408-1415.

Hatch, G. M., A. J. Smith, F. Y. Xu, A. M. Hall and D. A. Bernlohr (2002). "FATP1 channels exogenous FA into 1,2,3-triacyl-sn-glycerol and down-regulates sphingomyelin and cholesterol metabolism in growing 293 cells." J Lipid Res **43**(9): 1380-1389.

Haus, J. M., S. R. Kashyap, T. Kasumov, R. Zhang, K. R. Kelly, R. A. Defronzo and J. P. Kirwan (2009). "Plasma ceramides are elevated in obese subjects with type 2 diabetes and correlate with the severity of insulin resistance." Diabetes **58**(2): 337-343.

Havel, P. J. (2001). "Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis." Exp Biol Med (Maywood) **226**(11): 963-977.

Hawkins, B. T. and T. P. Davis (2005). "The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease." Pharmacol Rev **57**(2): 173-185.

He, W., T. K. Lam, S. Obici and L. Rossetti (2006). "Molecular disruption of hypothalamic nutrient sensing induces obesity." Nat Neurosci **9**(2): 227-233.

Hebebrand, J. and A. Hinney (2009). "Environmental and genetic risk factors in obesity." Child Adolesc Psychiatr Clin N Am **18**(1): 83-94.

Herculano-Houzel, S. (2014). "The glia/neuron ratio: How it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution." Glia.

Herrero-Mendez, A., A. Almeida, E. Fernandez, C. Maestre, S. Moncada and J. P. Bolanos (2009). "The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1." *Nat Cell Biol* **11**(6): 747-752.

Herrmann, T., F. Buchkremer, I. Gosch, A. M. Hall, D. A. Bernlohr and W. Stremmel (2001). "Mouse fatty acid transport protein 4 (FATP4): characterization of the gene and functional assessment as a very long chain acyl-CoA synthetase." *Gene* **270**(1-2): 31-40.

Hill, J. W. (2012). "PVN pathways controlling energy homeostasis." *Indian J Endocrinol Metab* **16**(Suppl 3): S627-636.

Horvath, T. L., B. Sarman, C. Garcia-Caceres, P. J. Enriori, P. Sotonyi, M. Shanabrough, E. Borok, J. Argente, J. A. Chowen, D. Perez-Tilve, P. T. Pfluger, H. S. Bronneke, B. E. Levin, S. Diano, M. A. Cowley and M. H. Tschop (2010). "Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(33): 14875-14880.

Howarth, C., P. Gleeson and D. Attwell (2012). "Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum." *J Cereb Blood Flow Metab* **32**(7): 1222-1232.

Hu, F. B., J. E. Manson and W. C. Willett (2001). "Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review." *J Am Coll Nutr* **20**(1): 5-19.

Hu, Z., S. H. Cha, S. Chohnan and M. D. Lane (2003). "Hypothalamic malonyl-CoA as a mediator of feeding behavior." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(22): 12624-12629.

Hu, Z., Y. Dai, M. Prentki, S. Chohnan and M. D. Lane (2005). "A role for hypothalamic malonyl-CoA in the control of food intake." *J Biol Chem* **280**(48): 39681-39683.

Huang, H., B. P. Atshaves, A. Frolov, A. B. Kier and F. Schroeder (2005). "Acyl-coenzyme A binding protein expression alters liver fatty acyl-coenzyme A metabolism." *Biochemistry* **44**(30): 10282-10297.

Huang, X. F., M. Han, T. South and L. Storlien (2003). "Altered levels of POMC, AgRP and MC4-R mRNA expression in the hypothalamus and other parts of the limbic system of mice prone or resistant to chronic high-energy diet-induced obesity." *Brain Res* **992**(1): 9-19.

Husemann, J., J. D. Loike, R. Anankov, M. Febbraio and S. C. Silverstein (2002). "Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system." *Glia* **40**(2): 195-205.

Hussain, G., F. Schmitt, J. P. Loeffler and J. L. Gonzalez de Aguilar (2013). "Fattening the brain: a brief of recent research." *Front Cell Neurosci* **7**: 144.

Iglesias, M. A., J. M. Ye, G. Frangioudakis, A. K. Saha, E. Tomas, N. B. Ruderman, G. J. Cooney and E. W. Kraegen (2002). "AICAR administration causes an apparent enhancement of muscle and liver insulin action in insulin-resistant high-fat-fed rats." *Diabetes* **51**(10): 2886-2894.

Islinger, M., S. Grille, H. D. Fahimi and M. Schrader (2012). "The peroxisome: an update on mysteries." *Histochem Cell Biol* **137**(5): 547-574.

Jo, Y. H., Y. Su, R. Gutierrez-Juarez and S. Chua, Jr. (2009). "Oleic acid directly regulates POMC neuron excitability in the hypothalamus." *J Neurophysiol* **101**(5): 2305-2316.

Jones, R. G., D. R. Plas, S. Kubek, M. Buzzai, J. Mu, Y. Xu, M. J. Birnbaum and C. B. Thompson (2005). "AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint." *Mol Cell* **18**(3): 283-293.

Jordan, S. D., A. C. Konner and J. C. Bruning (2010). "Sensing the fuels: glucose and lipid signaling in the CNS controlling energy homeostasis." *Cell Mol Life Sci* **67**(19): 3255-3273.

Jurcovicova, J. (2014). "Glucose transport in brain - effect of inflammation." *Endocr Regul* **48**(1): 35-48.

Kacem, K., P. Lacombe, J. Seylaz and G. Bonvento (1998). "Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study." *Glia* **23**(1): 1-10.

Kahn, B. B., T. Alquier, D. Carling and D. G. Hardie (2005). "AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism." *Cell Metabolism* **1**(1): 15-25.

Kalra, S. P., M. G. Dube, S. Pu, B. Xu, T. L. Horvath and P. S. Kalra (1999). "Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight." *Endocr Rev* **20**(1): 68-100.

Kang, L., A. A. Dunn-Meynell, V. H. Routh, L. D. Gaspers, Y. Nagata, T. Nishimura, J. Eiki, B. B. Zhang and B. E. Levin (2006). "Glucokinase is a critical regulator of ventromedial hypothalamic neuronal glucosensing." *Diabetes* **55**(2): 412-420.

Kang, L., V. H. Routh, E. V. Kuzhikandathil, L. D. Gaspers and B. E. Levin (2004). "Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons." *Diabetes* **53**(3): 549-559.

Kanwal, A. and S. K. Banerjee (2013). "SGLT inhibitors: a novel target for diabetes." *Pharm Pat Anal* **2**(1): 77-91.

Karmi, A., P. Iozzo, A. Viljanen, J. Hirvonen, B. A. Fielding, K. Virtanen, V. Oikonen, J. Kempainen, T. Viljanen, L. Guiducci, M. Haaparanta-Solin, K. Nagren, O. Solin and P. Nuutila (2010). "Increased brain fatty acid uptake in metabolic syndrome." *Diabetes* **59**(9): 2171-2177.

Karnani, M. M., J. Apergis-Schoute, A. Adamantidis, L. T. Jensen, L. de Lecea, L. Fugger and D. Burdakov (2011). "Activation of central orexin/hypocretin neurons by dietary amino acids." *Neuron* **72**(4): 616-629.

Kasser, T. R., R. B. Harris and R. J. Martin (1985). "Level of satiety: fatty acid and glucose metabolism in three brain sites associated with feeding." *Am J Physiol* **248**(4 Pt 2): R447-452.

Kastin, A. J. and V. Akerstrom (2001). "Glucose and insulin increase the transport of leptin through the blood-brain barrier in normal mice but not in streptozotocin-diabetic mice." *Neuroendocrinology* **73**(4): 237-242.

Katsura, M., S. Ohkuma, X. Jun, A. Tsujimura and K. Kuriyama (1995). "Ethanol stimulates diazepam binding inhibitor (DBI) mRNA expression in primary cultured neurons." *Brain Res Mol Brain Res* **34**(2): 355-359.

Kawaguchi, S., A. Shinozaki, M. Obinata, K. Saigo, Y. Sakaki and H. Tei (2007). "Establishment of cell lines derived from the rat suprachiasmatic nucleus." *Biochem Biophys Res Commun* **355**(2): 555-561.

Kawashima, J., T. Alquier, Y. Tsuji, O. D. Peroni and B. B. Kahn (2012). "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase is not involved in hypothalamic AMP-activated protein kinase activation by neuroglucopenia." *PLoS One* **7**(5): e36335.

Keirstead, H. S. and W. F. Blakemore (1999). "The role of oligodendrocytes and oligodendrocyte progenitors in CNS remyelination." *Adv Exp Med Biol* **468**: 183-197.

Kennedy, G. C. (1953). "The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **140**(901): 578-596.

Kerner, J. and C. Hoppel (2000). "Fatty acid import into mitochondria." *Biochim Biophys Acta* **1486**(1): 1-17.

Kesterson, R. A., D. Huszar, C. A. Lynch, R. B. Simerly and R. D. Cone (1997). "Induction of neuropeptide Y gene expression in the dorsal medial hypothalamic nucleus in two models of the agouti obesity syndrome." *Mol Endocrinol* **11**(5): 630-637.

Kim, E. K., I. Miller, S. Aja, L. E. Landree, M. Pinn, J. McFadden, F. P. Kuhajda, T. H. Moran and G. V. Ronnett (2004). "C75, a fatty acid synthase inhibitor, reduces food intake via hypothalamic AMP-activated protein kinase." *J Biol Chem* **279**(19): 19970-19976.

Kim, E. K., I. Miller, L. E. Landree, F. F. Borisy-Rudin, P. Brown, T. Tihan, C. A. Townsend, L. A. Witters, T. H. Moran, F. P. Kuhajda and G. V. Ronnett (2002). "Expression of FAS within hypothalamic neurons: a model for decreased food intake after C75 treatment." Am J Physiol Endocrinol Metab **283**(5): E867-879.

Kim, M. S. and K. U. Lee (2005). "Role of hypothalamic 5'-AMP-activated protein kinase in the regulation of food intake and energy homeostasis." J Mol Med (Berl) **83**(7): 514-520.

Kim, M. S., J. Y. Park, C. Namkoong, P. G. Jang, J. W. Ryu, H. S. Song, J. Y. Yun, I. S. Namgoong, J. Ha, I. S. Park, I. K. Lee, B. Viollet, J. H. Youn, H. K. Lee and K. U. Lee (2004). "Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase." Nat Med **10**(7): 727-733.

Kimes, A. S., D. Sweeney, E. D. London and S. I. Rapoport (1983). "Palmitate incorporation into different brain regions in the awake rat." Brain Res **274**(2): 291-301.

King, B. M. (2006). "The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight." Physiol Behav **87**(2): 221-244.

Kistler-Heer, V., M. E. Lauber and W. Lichtensteiger (1998). "Different developmental patterns of melanocortin MC3 and MC4 receptor mRNA: predominance of Mc4 in fetal rat nervous system." J Neuroendocrinol **10**(2): 133-146.

Kokoeva, M. V., H. Yin and J. S. Flier (2007). "Evidence for constitutive neural cell proliferation in the adult murine hypothalamus." J Comp Neurol **505**(2): 209-220.

Lage, R., C. Dieguez, A. Vidal-Puig and M. Lopez (2008). "AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis." Trends Mol Med **14**(12): 539-549.

Lam, T. K., R. Gutierrez-Juarez, A. Pociu and L. Rossetti (2005). "Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism." Science **309**(5736): 943-947.

Lam, T. K., A. Pociu, R. Gutierrez-Juarez, S. Obici, J. Bryan, L. Aguilar-Bryan, G. J. Schwartz and L. Rossetti (2005). "Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis." Nat Med **11**(3): 320-327.

Lamy, C. M., H. Sanno, G. Labouebe, A. Picard, C. Magnan, J. Y. Chatton and B. Thorens (2014). "Hypoglycemia-Activated GLUT2 Neurons of the Nucleus Tractus Solitarius Stimulate Vagal Activity and Glucagon Secretion." Cell Metab **19**(3): 527-538.

Landree, L. E., A. L. Hanlon, D. W. Strong, G. Rumbaugh, I. M. Miller, J. N. Thupari, E. C. Connolly, R. L. Haganir, C. Richardson, L. A. Witters, F. P. Kuhajda and G. V. Ronnett (2004). "C75, a fatty acid synthase inhibitor, modulates AMP-activated protein kinase to alter neuronal energy metabolism." J Biol Chem **279**(5): 3817-3827.

Lanfray, D., S. Arthaud, J. Ouellet, V. Compere, J. L. Do Rego, J. Leprince, B. Lefranc, H. Castel, C. Bouchard, B. Monge-Roffarello, D. Richard, G. Pelletier, H. Vaudry, M. C. Tonon and F. Morin (2013). "Gliotransmission and brain glucose sensing: critical role of endozepines." Diabetes **62**(3): 801-810.

Langlet, F., A. Mullier, S. G. Bouret, V. Prevot and B. Dehouck (2013). "Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain." J Comp Neurol **521**(15): 3389-3405.

Laughton, J. D., P. Bittar, Y. Charnay, L. Pellerin, E. Kovari, P. J. Magistretti and C. Bouras (2007). "Metabolic compartmentalization in the human cortex and hippocampus: evidence for a cell- and region-specific localization of lactate dehydrogenase 5 and pyruvate dehydrogenase." BMC Neurosci **8**: 35.

Le Foll, C., A. A. Dunn-Meynell, H. M. Miziorko and B. E. Levin (2014). "Regulation of hypothalamic neuronal sensing and food intake by ketone bodies and Fatty acids." Diabetes **63**(4): 1259-1269.

Le Foll, C., B. G. Irani, C. Magnan, A. A. Dunn-Meynell and B. E. Levin (2009). "Characteristics and mechanisms of hypothalamic neuronal fatty acid sensing." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **297**(3): R655-664.

Le Stunff, H., N. Coant, S. Migrenne and C. Magnan (2013). "Targeting lipid sensing in the central nervous system: new therapy against the development of obesity and type 2 diabetes." Expert Opin Ther Targets **17**(5): 545-555.

Leino, R. L., D. Z. Gerhart, A. M. van Bueren, A. L. McCall and L. R. Drewes (1997). "Ultrastructural localization of GLUT 1 and GLUT 3 glucose transporters in rat brain." J Neurosci Res **49**(5): 617-626.

Leloup, C., M. Arluison, N. Lepetit, N. Cartier, P. Marfaing-Jallat, P. Ferre and L. Penicaud (1994). "Glucose transporter 2 (GLUT 2): expression in specific brain nuclei." Brain Res **638**(1-2): 221-226.

Levin, B. E. (2006). "Metabolic sensing neurons and the control of energy homeostasis." Physiol Behav **89**(4): 486-489.

Levin, B. E., C. Magnan, A. Dunn-Meynell and C. Le Foll (2011). "Metabolic sensing and the brain: who, what, where, and how?" Endocrinology **152**(7): 2552-2557.

Levin, B. E., V. H. Routh, L. Kang, N. M. Sanders and A. A. Dunn-Meynell (2004). "Neuronal glucosensing: what do we know after 50 years?" Diabetes **53**(10): 2521-2528.

Lissner, L., T. L. Visscher, A. Rissanen, B. L. Heitmann, Prevention and O. Public Health Task Force of European Association for the Study of (2013). "Monitoring the obesity epidemic into the 21st century--weighing the evidence." Obes Facts **6**(6): 561-565.

Liu, H., H. Yang, D. Wang, Y. Liu, X. Liu, Y. Li, L. Xie and G. Wang (2009). "Insulin regulates P-glycoprotein in rat brain microvessel endothelial cells via an insulin receptor-mediated PKC/NF-kappaB pathway but not a PI3K/Akt pathway." Eur J Pharmacol **602**(2-3): 277-282.

Liu, J. W., F. G. Almaguel, L. Bu, D. D. De Leon and M. De Leon (2008). "Expression of E-FABP in PC12 cells increases neurite extension during differentiation: involvement of n-3 and n-6 fatty acids." J Neurochem **106**(5): 2015-2029.

Lo, C. M., L. Ma, D. M. Zhang, R. Lee, A. Qin, M. Liu, S. C. Woods, R. R. Sakai, H. E. Raybould and P. Tso (2007). "Mechanism of the induction of brain c-Fos-positive neurons by lipid absorption." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **292**(1): R268-273.

Loftus, T. M., D. E. Jaworsky, G. L. Frehywot, C. A. Townsend, G. V. Ronnett, M. D. Lane and F. P. Kuhajda (2000). "Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors." Science **288**(5475): 2379-2381.

Loomis, W. F., M. M. Behrens, M. E. Williams and C. Anjard (2010). "Pregnenolone sulfate and cortisol induce secretion of acyl-CoA-binding protein and its conversion into endozepines from astrocytes." J Biol Chem **285**(28): 21359-21365.

Lopez, M., R. Lage, A. K. Saha, D. Perez-Tilve, M. J. Vazquez, L. Varela, S. Sangiao-Alvarellos, S. Tovar, K. Raghay, S. Rodriguez-Cuenca, R. M. Deoliveira, T. Castaneda, R. Datta, J. Z. Dong, M. Culler, M. W. Sleeman, C. V. Alvarez, R. Gallego, C. J. Lelliott, D. Carling, M. H. Tschop, C. Dieguez and A. Vidal-Puig (2008). "Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin." Cell Metab **7**(5): 389-399.

Lorente-Cebrian, S., A. G. Costa, S. Navas-Carretero, M. Zabala, J. A. Martinez and M. J. Moreno-Aliaga (2013). "Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases: a review of the evidence." J Physiol Biochem **69**(3): 633-651.

Lovatt, D., U. Sonnewald, H. S. Waagepetersen, A. Schousboe, W. He, J. H. Lin, X. Han, T. Takano, S. Wang, F. J. Sim, S. A. Goldman and M. Nedergaard (2007). "The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex." J Neurosci **27**(45): 12255-12266.

Luchsinger, J. A., M. X. Tang, S. Shea and R. Mayeux (2004). "Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease." *Neurology* **63**(7): 1187-1192.

Lynch, R. M., L. S. Tompkins, H. L. Brooks, A. A. Dunn-Meynell and B. E. Levin (2000). "Localization of glucokinase gene expression in the rat brain." *Diabetes* **49**(5): 693-700.

Madadi, G., P. S. Dalvi and D. D. Belsham (2008). "Regulation of brain insulin mRNA by glucose and glucagon-like peptide 1." *Biochem Biophys Res Commun* **376**(4): 694-699.

Magistretti, P. J. and L. Pellerin (1999). "Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain." *News Physiol Sci* **14**: 177-182.

Maher, F., T. M. Davies-Hill, P. G. Lysko, R. C. Henneberry and I. A. Simpson (1991). "Expression of two glucose transporters, GLUT1 and GLUT3, in cultured cerebellar neurons: Evidence for neuron-specific expression of GLUT3." *Mol Cell Neurosci* **2**(4): 351-360.

Marino, J. S., Y. Xu and J. W. Hill (2011). "Central insulin and leptin-mediated autonomic control of glucose homeostasis." *Trends Endocrinol Metab* **22**(7): 275-285.

Marty, N., M. Dallaporta, M. Foretz, M. Emery, D. Tarussio, I. Bady, C. Binnert, F. Beermann and B. Thorens (2005). "Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors." *J Clin Invest* **115**(12): 3545-3553.

Marty, N., M. Dallaporta and B. Thorens (2007). "Brain glucose sensing, counterregulation, and energy homeostasis." *Physiology (Bethesda)* **22**: 241-251.

Mashek, D. G., L. O. Li and R. A. Coleman (2007). "Long-chain acyl-CoA synthetases and fatty acid channeling." *Future Lipidol* **2**(4): 465-476.

Matsuda, K., K. Kojima, K. Wada, K. Maruyama, J. Leprince, M. C. Tonon, M. Uchiyama and H. Vaudry (2010). "The anorexigenic action of the octadecaneuropeptide (ODN) in goldfish is mediated through the MC4R- and subsequently the CRH receptor-signaling pathways." *J Mol Neurosci* **42**(1): 74-79.

Matsushita, T., Y. Amagai, K. Terai, T. Kojima, M. Obinata and S. Hashimoto (2006). "A novel neuronal cell line derived from the ventrolateral region of the suprachiasmatic nucleus." *Neuroscience* **140**(3): 849-856.

Maurin, A. C., C. Jousse, J. Averous, L. Parry, A. Bruhat, Y. Cherasse, H. Zeng, Y. Zhang, H. P. Harding, D. Ron and P. Fafournoux (2005). "The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores." *Cell Metab* **1**(4): 273-277.

Mayer, C. M. and D. D. Belsham (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**(2): 576-585.

Mayer, J. (1955). "Regulation of energy intake and the body weight: the glucostatic theory and the lipostatic hypothesis." *Ann N Y Acad Sci* **63**(1): 15-43.

McCrimmon, R. J., M. Shaw, X. Fan, H. Cheng, Y. Ding, M. C. Vella, L. Zhou, E. C. McNay and R. S. Sherwin (2008). "Key role for AMP-activated protein kinase in the ventromedial hypothalamus in regulating counterregulatory hormone responses to acute hypoglycemia." *Diabetes* **57**(2): 444-450.

McMinn, J. E., D. G. Baskin and M. W. Schwartz (2000). "Neuroendocrine mechanisms regulating food intake and body weight." *Obes Rev* **1**(1): 37-46.

Meegalla, R. L., J. T. Billheimer and D. Cheng (2002). "Concerted elevation of acyl-coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) activity through independent stimulation of mRNA expression of DGAT1 and DGAT2 by carbohydrate and insulin." *Biochem Biophys Res Commun* **298**(3): 317-323.

Mehran, A. E., N. M. Templeman, G. S. Brigidi, G. E. Lim, K. Y. Chu, X. Hu, J. D. Botzelli, A. Asadi, B. G. Hoffman, T. J. Kieffer, S. X. Bamji, S. M. Clee and J. D. Johnson (2012). "Hyperinsulinemia

drives diet-induced obesity independently of brain insulin production." *Cell Metab* **16**(6): 723-737.

Mellon, P. L., J. J. Windle, P. C. Goldsmith, C. A. Padula, J. L. Roberts and R. I. Weiner (1990). "Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis." *Neuron* **5**(1): 1-10.

Melnick, I., N. Pronchuk, M. A. Cowley, K. L. Grove and W. F. Colmers (2007). "Developmental switch in neuropeptide Y and melanocortin effects in the paraventricular nucleus of the hypothalamus." *Neuron* **56**(6): 1103-1115.

Menard, C. R., K. J. Goodman, T. N. Corso, J. T. Brenna and S. C. Cunnane (1998). "Recycling of carbon into lipids synthesized de novo is a quantitatively important pathway of alpha-[U-13C]linolenate utilization in the developing rat brain." *J Neurochem* **71**(5): 2151-2158.

Mera, P., J. F. Mir, G. Fabrias, J. Casas, A. S. Costa, M. I. Malandrino, J. A. Fernandez-Lopez, X. Remesar, S. Gao, S. Chohnan, M. S. Rodriguez-Pena, H. Petry, G. Asins, F. G. Hegardt, L. Herrero and D. Serra (2014). "Long-Term Increased Carnitine Palmitoyltransferase 1A Expression in Ventromedial Hypothalamus Causes Hyperphagia and Alters the Hypothalamic Lipidomic Profile." *PLoS One* **9**(5): e97195.

Migrenne, S., C. Le Foll, B. E. Levin and C. Magnan (2011). "Brain lipid sensing and nervous control of energy balance." *Diabetes Metab* **37**(2): 83-88.

Migrenne, S., N. Marsollier, C. Cruciani-Guglielmacci and C. Magnan (2006). "Importance of the gut-brain axis in the control of glucose homeostasis." *Curr Opin Pharmacol* **6**(6): 592-597.

Millan, C., F. Martinez, C. Cortes-Campos, I. Lizama, M. J. Yanez, P. Llanos, K. Reinicke, F. Rodriguez, B. Peruzzo, F. Nualart and M. A. Garcia (2010). "Glial glucokinase expression in adult and post-natal development of the hypothalamic region." *ASN Neuro* **2**(3): e00035.

Miller, J. C., J. M. Gnaedinger and S. I. Rapoport (1987). "Utilization of plasma fatty acid in rat brain: distribution of [14C]palmitate between oxidative and synthetic pathways." *J Neurochem* **49**(5): 1507-1514.

Minokoshi, Y., T. Alquier, N. Furukawa, Y. B. Kim, A. Lee, B. Xue, J. Mu, F. Fougelle, P. Ferre, M. J. Birnbaum, B. J. Stuck and B. B. Kahn (2004). "AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus." *Nature* **428**(6982): 569-574.

Mitchell, R. W., C. L. Edmundson, D. W. Miller and G. M. Hatch (2009). "On the mechanism of oleate transport across human brain microvessel endothelial cells." *J Neurochem* **110**(3): 1049-1057.

Mitchell, R. W. and G. M. Hatch (2011). "Fatty acid transport into the brain: of fatty acid fables and lipid tails." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **85**(5): 293-302.

Mitchell, R. W., N. H. On, M. R. Del Bigio, D. W. Miller and G. M. Hatch (2011). "Fatty acid transport protein expression in human brain and potential role in fatty acid transport across human brain microvessel endothelial cells." *J Neurochem* **117**(4): 735-746.

Mokdad, A. H., E. S. Ford, B. A. Bowman, W. H. Dietz, F. Vinicor, V. S. Bales and J. S. Marks (2003). "Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001." *JAMA* **289**(1): 76-79.

Moore, S. A. (2001). "Polyunsaturated fatty acid synthesis and release by brain-derived cells in vitro." *J Mol Neurosci* **16**(2-3): 195-200; discussion 215-121.

Moreira, J. D., L. Knorr, M. Ganzella, A. P. Thomazi, C. G. de Souza, D. G. de Souza, C. F. Pitta, T. Mello e Souza, S. Wofchuk, E. Elisabetsky, L. Vinade, M. L. Perry and D. O. Souza (2010). "Omega-3 fatty acids deprivation affects ontogeny of glutamatergic synapses in rats: relevance for behavior alterations." *Neurochem Int* **56**(6-7): 753-759.

Morgan, K., S. Obici and L. Rossetti (2004). "Hypothalamic responses to long-chain fatty acids are nutritionally regulated." *J Biol Chem* **279**(30): 31139-31148.

Morris, A. A. (2005). "Cerebral ketone body metabolism." *J Inherit Metab Dis* **28**(2): 109-121.

Morris, P. and H. Bachelard (2003). "Reflections on the application of ¹³C-MRS to research on brain metabolism." *NMR Biomed* **16**(6-7): 303-312.

Morton, G. J., J. E. Blevins, F. Kim, M. Matsen and D. P. Figlewicz (2009). "The action of leptin in the ventral tegmental area to decrease food intake is dependent on Jak-2 signaling." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**(1): E202-210.

Morton, G. J., D. E. Cummings, D. G. Baskin, G. S. Barsh and M. W. Schwartz (2006). "Central nervous system control of food intake and body weight." *Nature* **443**(7109): 289-295.

Mouille, V. S., C. Cansell, S. Luquet and C. Cruciani-Guglielmacci (2012). "The multiple roles of fatty acid handling proteins in brain." *Front Physiol* **3**: 385.

Mouille, V. S., C. Le Foll, E. Philippe, N. Kassis, C. Rouch, N. Marsollier, L. C. Bui, C. Guissard, J. Dairou, A. Lorsignol, L. Penicaud, B. E. Levin, C. Cruciani-Guglielmacci and C. Magnan (2013). "Fatty acid transporter CD36 mediates hypothalamic effect of fatty acids on food intake in rats." *PLoS One* **8**(9): e74021.

Mountjoy, K. G. (2010). "Functions for pro-opiomelanocortin-derived peptides in obesity and diabetes." *Biochem J* **428**(3): 305-324.

Mountjoy, P. D. and G. A. Rutter (2007). "Glucose sensing by hypothalamic neurones and pancreatic islet cells: AMPle evidence for common mechanisms?" *Exp Physiol* **92**(2): 311-319.

Mueckler, M. and B. Thorens (2013). "The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters." *Mol Aspects Med* **34**(2-3): 121-138.

Mukherjee, P. K., V. L. Marcheselli, C. N. Serhan and N. G. Bazan (2004). "Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(22): 8491-8496.

Muoio, V., P. B. Persson and M. M. Sendeski (2014). "The neurovascular unit - concept review." *Acta Physiol (Oxf)* **210**(4): 790-798.

Murin, R., M. Cesar, B. S. Kowtharapu, S. Verleysdonk and B. Hamprecht (2009). "Expression of pyruvate carboxylase in cultured oligodendroglial, microglial and ependymal cells." *Neurochem Res* **34**(3): 480-489.

Murphy, B. A., K. A. Fakira, Z. Song, A. Beuve and V. H. Routh (2009). "AMP-activated protein kinase and nitric oxide regulate the glucose sensitivity of ventromedial hypothalamic glucose-inhibited neurons." *Am J Physiol Cell Physiol* **297**(3): C750-758.

Nakamura, M. T., B. E. Yudell and J. J. Loor (2014). "Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids." *Prog Lipid Res* **53**: 124-144.

Navarrete, M. and A. Araque (2014). "The Cajal school and the physiological role of astrocytes: a way of thinking." *Front Neuroanat* **8**: 33.

Ndubaku, U. and M. E. de Bellard (2008). "Glial cells: old cells with new twists." *Acta Histochem* **110**(3): 182-195.

Neary, N. M., A. P. Goldstone and S. R. Bloom (2004). "Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus." *Clin Endocrinol (Oxf)* **60**(2): 153-160.

Neess, D., M. Bloksgaard, S. Bek, A. B. Marcher, I. C. Elle, T. Helledie, M. Due, V. Pagmantidis, B. Finsen, J. Wilbertz, M. Kruhoffer, N. Faergeman and S. Mandrup (2011). "Disruption of the acyl-CoA-binding protein gene delays hepatic adaptation to metabolic changes at weaning." *J Biol Chem* **286**(5): 3460-3472.

Nehlig, A., E. Wittendorp-Rechenmann and C. D. Lam (2004). "Selective uptake of [¹⁴C]-2-deoxyglucose by neurons and astrocytes: high-resolution microautoradiographic imaging by cellular ¹⁴C-trajectory combined with immunohistochemistry." *J Cereb Blood Flow Metab* **24**(9): 1004-1014.

Nguyen, A. D., N. F. Mitchell, S. Lin, L. Macia, E. Yulyaningsih, P. A. Baldock, R. F. Enriquez, L. Zhang, Y. C. Shi, S. Zolotukhin, H. Herzog and A. Sainsbury (2012). "Y1 and Y5 receptors are both required for the regulation of food intake and energy homeostasis in mice." *PLoS One* **7**(6): e40191.

Niswender, K. D., C. D. Morrison, D. J. Clegg, R. Olson, D. G. Baskin, M. G. Myers, Jr., R. J. Seeley and M. W. Schwartz (2003). "Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia." *Diabetes* **52**(2): 227-231.

Nitz, I., M. L. Kruse, M. Klapper and F. Doring (2011). "Specific regulation of low-abundance transcript variants encoding human Acyl-CoA binding protein (ACBP) isoforms." *J Cell Mol Med* **15**(4): 909-927.

Nolan, C. J., M. S. Madiraju, V. Delghingaro-Augusto, M. L. Peyot and M. Prentki (2006). "Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion." *Diabetes* **55 Suppl 2**: S16-23.

Obici, S., Z. Feng, A. Arduini, R. Conti and L. Rossetti (2003). "Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production." *Nat Med* **9**(6): 756-761.

Obici, S., Z. Feng, K. Morgan, D. Stein, G. Karkanas and L. Rossetti (2002). "Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake." *Diabetes* **51**(2): 271-275.

Ogretmen, B. and Y. A. Hannun (2004). "Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment." *Nat Rev Cancer* **4**(8): 604-616.

Ogunbode, A. M., M. Ladipo, I. O. Ajayi and A. A. Fatiregun (2011). "Obesity: an emerging disease." *Niger J Clin Pract* **14**(4): 390-394.

Oh, D. Y., S. Talukdar, E. J. Bae, T. Imamura, H. Morinaga, W. Fan, P. Li, W. J. Lu, S. M. Watkins and J. M. Olefsky (2010). "GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects." *Cell* **142**(5): 687-698.

Ono, H., A. Pocai, Y. Wang, H. Sakoda, T. Asano, J. M. Backer, G. J. Schwartz and L. Rossetti (2008). "Activation of hypothalamic S6 kinase mediates diet-induced hepatic insulin resistance in rats." *J Clin Invest* **118**(8): 2959-2968.

Oomura, Y., T. Nakamura, M. Sugimori and Y. Yamada (1975). "Effect of free fatty acid on the rat lateral hypothalamic neurons." *Physiol Behav* **14**(04): 483-486.

Orellana, J. A., P. J. Saez, C. Cortes-Campos, R. J. Elizondo, K. F. Shoji, S. Contreras-Duarte, V. Figueroa, V. Velarde, J. X. Jiang, F. Nualart, J. C. Saez and M. A. Garcia (2012). "Glucose increases intracellular free Ca²⁺ in tanycytes via ATP released through connexin 43 hemichannels." *Glia* **60**(1): 53-68.

Ostenson, C. G., B. Ahren, S. Karlsson, J. Knudsen and S. Efendic (1994). "Inhibition by rat diazepam-binding inhibitor/acyl-CoA-binding protein of glucose-induced insulin secretion in the rat." *Eur J Endocrinol* **131**(2): 201-204.

Ouellet, M., V. Emond, C. T. Chen, C. Julien, F. Bourasset, S. Oddo, F. LaFerla, R. P. Bazinet and F. Calon (2009). "Diffusion of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids through the blood-brain barrier: An in situ cerebral perfusion study." *Neurochem Int* **55**(7): 476-482.

Owada, Y., I. Suzuki, T. Noda and H. Kondo (2002). "Analysis on the phenotype of E-FABP-gene knockout mice." *Mol Cell Biochem* **239**(1-2): 83-86.

Owada, Y., T. Yoshimoto and H. Kondo (1996). "Increased expression of the mRNA for brain- and skin-type but not heart-type fatty acid binding proteins following kainic acid systemic administration in the hippocampal glia of adult rats." *Brain Res Mol Brain Res* **42**(1): 156-160.

Parpura, V. and U. Mohideen (2008). "Molecular form follows function: (un)snaring the SNAREs." *Trends Neurosci* **31**(9): 435-443.

Pellegri, G., C. Rossier, P. J. Magistretti and J. L. Martin (1996). "Cloning, localization and induction of mouse brain glycogen synthase." Brain Res Mol Brain Res **38**(2): 191-199.

Penfield, W. (1934). "The Influence of the Diencephalon and Hypophysis Upon General Autonomic Function." Can Med Assoc J **30**(6): 589-598.

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

Pinto, S., A. G. Roseberry, H. Liu, S. Diano, M. Shanabrough, X. Cai, J. M. Friedman and T. L. Horvath (2004). "Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin." Science **304**(5667): 110-115.

Pocai, A., T. K. Lam, R. Gutierrez-Juarez, S. Obici, G. J. Schwartz, J. Bryan, L. Aguilar-Bryan and L. Rossetti (2005). "Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production." Nature **434**(7036): 1026-1031.

Pocai, A., T. K. Lam, S. Obici, R. Gutierrez-Juarez, E. D. Muse, A. Arduini and L. Rossetti (2006). "Restoration of hypothalamic lipid sensing normalizes energy and glucose homeostasis in overfed rats." J Clin Invest **116**(4): 1081-1091.

Pocai, A., S. Obici, G. J. Schwartz and L. Rossetti (2005). "A brain-liver circuit regulates glucose homeostasis." Cell Metab **1**(1): 53-61.

Polonsky, K. S., B. D. Given and E. Van Cauter (1988). "Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects." J Clin Invest **81**(2): 442-448.

Porrini, M., A. Santangelo, R. Crovetto, P. Riso, G. Testolin and J. E. Blundell (1997). "Weight, protein, fat, and timing of preloads affect food intake." Physiol Behav **62**(3): 563-570.

Prebil, M., J. Jensen, R. Zorec and M. Kreft (2011). "Astrocytes and energy metabolism." Arch Physiol Biochem **117**(2): 64-69.

Prentki, M., E. Joly, W. El-Assaad and R. Roduit (2002). "Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipototoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes." Diabetes **51 Suppl 3**: S405-413.

Prentki, M., F. M. Matschinsky and S. R. Madiraju (2013). "Metabolic Signaling in Fuel-Induced Insulin Secretion." Cell Metab.

Prentki, M. and C. J. Nolan (2006). "Islet beta cell failure in type 2 diabetes." J Clin Invest **116**(7): 1802-1812.

Price, N., F. van der Leij, V. Jackson, C. Corstorphine, R. Thomson, A. Sorensen and V. Zammit (2002). "A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I." Genomics **80**(4): 433-442.

Prichard, J., D. Rothman, E. Novotny, O. Petroff, T. Kuwabara, M. Avison, A. Howseman, C. Hanstock and R. Shulman (1991). "Lactate rise detected by ¹H NMR in human visual cortex during physiologic stimulation." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(13): 5829-5831.

Pritchard, L. E., A. V. Turnbull and A. White (2002). "Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity." J Endocrinol **172**(3): 411-421.

Proulx, K., D. Cota, S. C. Woods and R. J. Seeley (2008). "Fatty acid synthase inhibitors modulate energy balance via mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in the central nervous system." Diabetes **57**(12): 3231-3238.

Ramirez, S., L. Martins, J. Jacas, P. Carrasco, M. Pozo, J. Clotet, D. Serra, F. G. Hegardt, C. Dieguez, M. Lopez and N. Casals (2013). "Hypothalamic ceramide levels regulated by CPT1C mediate the orexigenic effect of ghrelin." Diabetes **62**(7): 2329-2337.

Rapoport, S. I. (2001). "In vivo fatty acid incorporation into brain phospholipids in relation to plasma availability, signal transduction and membrane remodeling." J Mol Neurosci **16**(2-3): 243-261; discussion 279-284.

Rasmussen, J. T., N. J. Faergeman, K. Kristiansen and J. Knudsen (1994). "Acyl-CoA-binding protein (ACBP) can mediate intermembrane acyl-CoA transport and donate acyl-CoA for beta-oxidation and glycerolipid synthesis." *Biochem J* **299** (Pt 1): 165-170.

Resh, M. D. (1999). "Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins." *Biochim Biophys Acta* **1451**(1): 1-16.

Richieri, G. V. and A. M. Kleinfeld (1995). "Unbound free fatty acid levels in human serum." *J Lipid Res* **36**(2): 229-240.

Rochester, C. D. and O. Akiyode (2014). "Novel and emerging diabetes mellitus drug therapies for the type 2 diabetes patient." *World J Diabetes* **5**(3): 305-315.

Rodriguez, E. M., J. L. Blazquez, F. E. Pastor, B. Pelaez, P. Pena, B. Peruzzo and P. Amat (2005). "Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction." *Int Rev Cytol* **247**: 89-164.

Roduit, R., C. Nolan, C. Alarcon, P. Moore, A. Barbeau, V. Delghingaro-Augusto, E. Przybykowski, J. Morin, F. Masse, B. Massie, N. Ruderman, C. Rhodes, V. Poitout and M. Prentki (2004). "A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli." *Diabetes* **53**(4): 1007-1019.

Rogers, P. J. and J. E. Blundell (1994). "Reanalysis of the effects of phenylalanine, alanine, and aspartame on food intake in human subjects." *Physiol Behav* **56**(2): 247-250.

Rossi, M., M. S. Kim, D. G. Morgan, C. J. Small, C. M. Edwards, D. Sunter, S. Abusnana, A. P. Goldstone, S. H. Russell, S. A. Stanley, D. M. Smith, K. Yagaloff, M. A. Ghatei and S. R. Bloom (1998). "A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo." *Endocrinology* **139**(10): 4428-4431.

Rouach, N., A. Koulakoff, V. Abudara, K. Willecke and C. Giaume (2008). "Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission." *Science* **322**(5907): 1551-1555.

Routh, V. H. (2002). "Glucose-sensing neurons: are they physiologically relevant?" *Physiol Behav* **76**(3): 403-413.

Routh, V. H. (2010). "Glucose sensing neurons in the ventromedial hypothalamus." *Sensors (Basel)* **10**(10): 9002-9025.

Ruderman, N. B., A. K. Saha and E. W. Kraegen (2003). "Minireview: malonyl CoA, AMP-activated protein kinase, and adiposity." *Endocrinology* **144**(12): 5166-5171.

Salvi, R., E. Castillo, M. J. Voirol, M. Glauser, J. P. Rey, R. C. Gaillard, P. Vollenweider and F. P. Pralong (2006). "Gonadotropin-releasing hormone-expressing neurons immortalized conditionally are activated by insulin: implication of the mitogen-activated protein kinase pathway." *Endocrinology* **147**(2): 816-826.

Sanz, C., I. Roncero, P. Vazquez, M. A. Navas and E. Blazquez (2007). "Effects of glucose and insulin on glucokinase activity in rat hypothalamus." *J Endocrinol* **193**(2): 259-267.

Schaffer, J. E. and H. F. Lodish (1994). "Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein." *Cell* **79**(3): 427-436.

Schmid, R. S., Y. Yokota and E. S. Anton (2006). "Generation and characterization of brain lipid-binding protein promoter-based transgenic mouse models for the study of radial glia." *Glia* **53**(4): 345-351.

Schneeberger, M., R. Gomis and M. Claret (2014). "Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance." *J Endocrinol* **220**(2): T25-46.

Schwartz, M. W., S. C. Woods, D. Porte, Jr., R. J. Seeley and D. G. Baskin (2000). "Central nervous system control of food intake." *Nature* **404**(6778): 661-671.

Schwinkendorf, D. R., N. G. Tsatsos, B. A. Gosnell and D. G. Mashek (2010). "Effects of central administration of distinct fatty acids on hypothalamic neuropeptide expression and energy metabolism." *Int J Obes (Lond)* **35**(3): 336-344.

Schwinkendorf, D. R., N. G. Tsatsos, B. A. Gosnell and D. G. Mashek (2011). "Effects of central administration of distinct fatty acids on hypothalamic neuropeptide expression and energy metabolism." *Int J Obes (Lond)* **35**(3): 336-344.

Sellner, P. A., W. Chu, J. F. Glatz and N. E. Berman (1995). "Developmental role of fatty acid-binding proteins in mouse brain." *Brain Res Dev Brain Res* **89**(1): 33-46.

Sen, N. and S. H. Snyder (2010). "Protein modifications involved in neurotransmitter and gasotransmitter signaling." *Trends Neurosci* **33**(11): 493-502.

Seo, S., S. Ju, H. Chung, D. Lee and S. Park (2008). "Acute effects of glucagon-like peptide-1 on hypothalamic neuropeptide and AMP activated kinase expression in fasted rats." *Endocr J* **55**(5): 867-874.

Serhan, C. N., J. Dalli, R. A. Colas, J. W. Winkler and N. Chiang (2014). "Protectins and maresins: New pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome." *Biochim Biophys Acta*.

Shaikh, S. R., J. J. Kinnun, X. Leng, J. A. Williams and S. R. Wassall (2014). "How polyunsaturated fatty acids modify molecular organization in membranes: Insight from NMR studies of model systems." *Biochim Biophys Acta*.

Shi, Y. C., J. Lau, Z. Lin, H. Zhang, L. Zhai, G. Sperk, R. Heilbronn, M. Mietzsch, S. Weger, X. F. Huang, R. F. Enriquez, P. A. Baldock, L. Zhang, A. Sainsbury, H. Herzog and S. Lin (2013). "Arcuate NPY controls sympathetic output and BAT function via a relay of tyrosine hydroxylase neurons in the PVN." *Cell Metab* **17**(2): 236-248.

Shimizu, H., H. Arima, M. Watanabe, M. Goto, R. Banno, I. Sato, N. Ozaki, H. Nagasaki and Y. Oiso (2008). "Glucocorticoids increase neuropeptide Y and agouti-related peptide gene expression via adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling in the arcuate nucleus of rats." *Endocrinology* **149**(9): 4544-4553.

Shimokawa, T., M. V. Kumar and M. D. Lane (2002). "Effect of a fatty acid synthase inhibitor on food intake and expression of hypothalamic neuropeptides." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1): 66-71.

Sierra, A. Y., E. Gratacos, P. Carrasco, J. Clotet, J. Urena, D. Serra, G. Asins, F. G. Hegardt and N. Casals (2008). "CPT1c is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyltransferase activity." *J Biol Chem* **283**(11): 6878-6885.

Simpson, I. A., D. Dwyer, D. Malide, K. H. Moley, A. Travis and S. J. Vannucci (2008). "The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**(2): E242-253.

Singh, R. B., S. Gupta, P. Dherange, F. De Meester, A. Wilczynska, S. E. Alam, D. Pella and D. W. Wilson (2012). "Metabolic syndrome: a brain disease." *Can J Physiol Pharmacol* **90**(9): 1171-1183.

Small, C. J., M. S. Kim, S. A. Stanley, J. R. Mitchell, K. Murphy, D. G. Morgan, M. A. Ghatei and S. R. Bloom (2001). "Effects of chronic central nervous system administration of agouti-related protein in pair-fed animals." *Diabetes* **50**(2): 248-254.

Smith, P. M. and A. V. Ferguson (2008). "Neurophysiology of hunger and satiety." *Dev Disabil Res Rev* **14**(2): 96-104.

Sofroniew, M. V. and H. V. Vinters (2010). "Astrocytes: biology and pathology." *Acta Neuropathol* **119**(1): 7-35.

Sokoloff, L., M. Reivich, C. Kennedy, M. H. Des Rosiers, C. S. Patlak, K. D. Pettigrew, O. Sakurada and M. Shinohara (1977). "The [¹⁴C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat." *J Neurochem* **28**(5): 897-916.

Song, B. J., A. Elbert, T. Rahman, S. K. Orr, C. T. Chen, M. Febbraio and R. P. Bazinet (2010). "Genetic ablation of CD36 does not alter mouse brain polyunsaturated fatty acid concentrations." Lipids **45**(4): 291-299.

Sorensen, A., M. T. Travers, R. G. Vernon, N. T. Price and M. C. Barber (2002). "Localization of messenger RNAs encoding enzymes associated with malonyl-CoA metabolism in mouse brain." Brain Res Gene Expr Patterns **1**(3-4): 167-173.

Spasic, M. R., P. Callaerts and K. K. Norga (2009). "AMP-activated protein kinase (AMPK) molecular crossroad for metabolic control and survival of neurons." Neuroscientist **15**(4): 309-316.

Stahl, A., D. J. Hirsch, R. E. Gimeno, S. Punreddy, P. Ge, N. Watson, S. Patel, M. Kotler, A. Raimondi, L. A. Tartaglia and H. F. Lodish (1999). "Identification of the major intestinal fatty acid transport protein." Mol Cell **4**(3): 299-308.

Stanley, B. G., A. S. Chin and S. F. Leibowitz (1985). "Feeding and drinking elicited by central injection of neuropeptide Y: evidence for a hypothalamic site(s) of action." Brain Res Bull **14**(6): 521-524.

Stark, R., S. E. Ashley and Z. B. Andrews (2013). "AMPK and the neuroendocrine regulation of appetite and energy expenditure." Mol Cell Endocrinol **366**(2): 215-223.

Stolarczyk, E., C. Guissard, A. Michau, P. C. Even, A. Grosfeld, P. Serradas, A. Lorsignol, L. Penicaud, E. Brot-Laroche, A. Leturque and M. Le Gall (2010). "Detection of extracellular glucose by GLUT2 contributes to hypothalamic control of food intake." Am J Physiol Endocrinol Metab **298**(5): E1078-1087.

Stumvoll, M., B. J. Goldstein and T. W. van Haefen (2005). "Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy." Lancet **365**(9467): 1333-1346.

Su, Y., T. K. Lam, W. He, A. Poci, J. Bryan, L. Aguilar-Bryan and R. Gutierrez-Juarez (2012). "Hypothalamic leucine metabolism regulates liver glucose production." Diabetes **61**(1): 85-93.

Sun, X., M. Tang, J. Zhang and J. D. Chen (2006). "Excitatory effects of gastric electrical stimulation on gastric distension responsive neurons in ventromedial hypothalamus (VMH) in rats." Neurosci Res **55**(4): 451-457.

Sutherland, V. L., M. McReynolds, L. S. Tompkins, H. L. Brooks and R. M. Lynch (2005). "Developmental expression of glucokinase in rat hypothalamus." Brain Res Dev Brain Res **154**(2): 255-258.

Suzuki, A., S. A. Stern, O. Bozdagi, G. W. Huntley, R. H. Walker, P. J. Magistretti and C. M. Alberini (2011). "Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation." Cell **144**(5): 810-823.

Takeuchi, K. and K. Reue (2009). "Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis." Am J Physiol Endocrinol Metab **296**(6): E1195-1209.

Tan, T., Y. Xiang, C. Chang and Z. Zhou (2014). "Alteration of Regulatory T Cells in Type 1 Diabetes Mellitus: A Comprehensive Review." Clin Rev Allergy Immunol.

Tatemoto, K., M. Carlquist and V. Mutt (1982). "Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide." Nature **296**(5858): 659-660.

Taylor, P. M. (2014). "Role of amino acid transporters in amino acid sensing." Am J Clin Nutr **99**(1): 223S-230S.

Tein, I. (2013). "Disorders of fatty acid oxidation." Handb Clin Neurol **113**: 1675-1688.

Temple, S. (2001). "The development of neural stem cells." Nature **414**(6859): 112-117.

Thaler, J. P., C. X. Yi, E. A. Schur, S. J. Guyenet, B. H. Hwang, M. O. Dietrich, X. Zhao, D. A. Sarruf, V. Izgur, K. R. Maravilla, H. T. Nguyen, J. D. Fischer, M. E. Matsen, B. E. Wisse, G. J. Morton, T. L. Horvath, D. G. Baskin, M. H. Tschop and M. W. Schwartz (2012). "Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans." J Clin Invest **122**(1): 153-162.

Theis, M., G. Sohl, J. Eiberger and K. Willecke (2005). "Emerging complexities in identity and function of glial connexins." Trends Neurosci **28**(4): 188-195.

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

Thorens, B. and M. Mueckler (2010). "Glucose transporters in the 21st Century." Am J Physiol Endocrinol Metab **298**(2): E141-145.

Tong, L. and H. J. Harwood, Jr. (2006). "Acetyl-coenzyme A carboxylases: versatile targets for drug discovery." J Cell Biochem **99**(6): 1476-1488.

Tonon, M. C., L. Desy, P. Nicolas, H. Vaudry and G. Pelletier (1990). "Immunocytochemical localization of the endogenous benzodiazepine ligand octadecaneuropeptide (ODN) in the rat brain." Neuropeptides **15**(1): 17-24.

Tu, Y., J. N. Thupari, E. K. Kim, M. L. Pinn, T. H. Moran, G. V. Ronnett and F. P. Kuhajda (2005). "C75 alters central and peripheral gene expression to reduce food intake and increase energy expenditure." Endocrinology **146**(1): 486-493.

Turner, N., G. J. Cooney, E. W. Kraegen and C. R. Bruce (2014). "Fatty acid metabolism, energy expenditure and insulin resistance in muscle." J Endocrinol **220**(2): T61-79.

Turnley, A. M., D. Stapleton, R. J. Mann, L. A. Witters, B. E. Kemp and P. F. Bartlett (1999). "Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system." J Neurochem **72**(4): 1707-1716.

Unger, J. W., J. N. Livingston and A. M. Moss (1991). "Insulin receptors in the central nervous system: localization, signalling mechanisms and functional aspects." Prog Neurobiol **36**(5): 343-362.

van den Pol, A. N., Y. Yao, L. Y. Fu, K. Foo, H. Huang, R. Coppari, B. B. Lowell and C. Broberger (2009). "Neuromedin B and gastrin-releasing peptide excite arcuate nucleus neuropeptide Y neurons in a novel transgenic mouse expressing strong Renilla green fluorescent protein in NPY neurons." J Neurosci **29**(14): 4622-4639.

van der Lely, A. J., M. Tschop, M. L. Heiman and E. Ghigo (2004). "Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin." Endocr Rev **25**(3): 426-457.

Vilchez, D., S. Ros, D. Cifuentes, L. Pujadas, J. Valles, B. Garcia-Fojeda, O. Criado-Garcia, E. Fernandez-Sanchez, I. Medrano-Fernandez, J. Dominguez, M. Garcia-Rocha, E. Soriano, S. Rodriguez de Cordoba and J. J. Guinovart (2007). "Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy." Nat Neurosci **10**(11): 1407-1413.

Villanueva, E. C. and M. G. Myers, Jr. (2008). "Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology." Int J Obes (Lond) **32** Suppl 7: S8-12.

Viollet, B. and F. Andreelli (2011). "AMP-activated protein kinase and metabolic control." Handb Exp Pharmacol(203): 303-330.

Wakil, S. J. and L. A. Abu-Elheiga (2009). "Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome." J Lipid Res **50** Suppl: S138-143.

Wanders, R. J., G. A. Jansen and M. D. Lloyd (2003). "Phytanic acid alpha-oxidation, new insights into an old problem: a review." Biochim Biophys Acta **1631**(2): 119-135.

Wanders, R. J., J. P. Ruiten, I. J. L, H. R. Waterham and S. M. Houten (2010). "The enzymology of mitochondrial fatty acid beta-oxidation and its application to follow-up analysis of positive neonatal screening results." J Inherit Metab Dis **33**(5): 479-494.

Wanders, R. J. and H. R. Waterham (2006). "Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited." Annu Rev Biochem **75**: 295-332.

Wang, B. and K. Jin (2014). "Current perspectives on the link between neuroinflammation and neurogenesis." Metab Brain Dis.

Wang, H., G. Astarita, M. D. Taussig, K. G. Bharadwaj, N. V. DiPatrizio, K. A. Nave, D. Piomelli, I. J. Goldberg and R. H. Eckel (2011). "Deficiency of lipoprotein lipase in neurons modifies the regulation of energy balance and leads to obesity." *Cell Metab* **13**(1): 105-113.

Wang, H. and R. H. Eckel (2009). "Lipoprotein lipase: from gene to obesity." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**(2): E271-288.

Wang, H. and R. H. Eckel (2012). "Lipoprotein lipase in the brain and nervous system." *Annu Rev Nutr* **32**: 147-160.

Wang, H., L. H. Storlien and X. F. Huang (1999). "Influence of dietary fats on c-Fos-like immunoreactivity in mouse hypothalamus." *Brain Res* **843**(1-2): 184-192.

Wang, R., C. Cruciani-Guglielmacci, S. Migrenne, C. Magnan, V. E. Cotero and V. H. Routh (2006). "Effects of oleic acid on distinct populations of neurons in the hypothalamic arcuate nucleus are dependent on extracellular glucose levels." *J Neurophysiol* **95**(3): 1491-1498.

Wang, S., P. Khondowe, S. Chen, J. Yu, G. Shu, X. Zhu, L. Wang, P. Gao, Q. Xi, Y. Zhang and Q. Jiang (2012). "Effects of "Bioactive" amino acids leucine, glutamate, arginine and tryptophan on feed intake and mRNA expression of relative neuropeptides in broiler chicks." *J Anim Sci Biotechnol* **3**(1): 27.

Waniewski, R. A. and D. L. Martin (1998). "Preferential utilization of acetate by astrocytes is attributable to transport." *J Neurosci* **18**(14): 5225-5233.

Watanabe, A., T. Toyota, Y. Owada, T. Hayashi, Y. Iwayama, M. Matsumata, Y. Ishitsuka, A. Nakaya, M. Maekawa, T. Ohnishi, R. Arai, K. Sakurai, K. Yamada, H. Kondo, K. Hashimoto, N. Osumi and T. Yoshikawa (2007). "Fabp7 maps to a quantitative trait locus for a schizophrenia endophenotype." *PLoS Biol* **5**(11): e297.

Wauson, E. M., A. Lorente-Rodriguez and M. H. Cobb (2013). "Minireview: Nutrient sensing by G protein-coupled receptors." *Mol Endocrinol* **27**(8): 1188-1197.

Westerterp, K. R. (2004). "Diet induced thermogenesis." *Nutr Metab (Lond)* **1**(1): 5.

Wilson, B. D., M. M. Ollmann and G. S. Barsh (1999). "The role of agouti-related protein in regulating body weight." *Mol Med Today* **5**(6): 250-256.

Wirenfeldt, M., A. A. Babcock and H. V. Vinters (2011). "Microglia - insights into immune system structure, function, and reactivity in the central nervous system." *Histol Histopathol* **26**(4): 519-530.

Wolfgang, M. J., S. H. Cha, D. S. Millington, G. Cline, G. I. Shulman, A. Suwa, M. Asami, T. Kurama, T. Shimokawa and M. D. Lane (2008). "Brain-specific carnitine palmitoyl-transferase-1c: role in CNS fatty acid metabolism, food intake, and body weight." *J Neurochem* **105**(4): 1550-1559.

Wolfgang, M. J., S. H. Cha, A. Sidhaye, S. Chohnan, G. Cline, G. I. Shulman and M. D. Lane (2007). "Regulation of hypothalamic malonyl-CoA by central glucose and leptin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(49): 19285-19290.

Wolfgang, M. J., T. Kurama, Y. Dai, A. Suwa, M. Asami, S. Matsumoto, S. H. Cha, T. Shimokawa and M. D. Lane (2006). "The brain-specific carnitine palmitoyltransferase-1c regulates energy homeostasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(19): 7282-7287.

Woods, S. C. and R. J. Seeley (2000). "Adiposity signals and the control of energy homeostasis." *Nutrition* **16**(10): 894-902.

Wu, Y., M. Viana, S. Thirumangalathu and M. R. Loeken (2012). "AMP-activated protein kinase mediates effects of oxidative stress on embryo gene expression in a mouse model of diabetic embryopathy." *Diabetologia* **55**(1): 245-254.

Wyss, M. T., R. Jolivet, A. Buck, P. J. Magistretti and B. Weber (2011). "In vivo evidence for lactate as a neuronal energy source." *J Neurosci* **31**(20): 7477-7485.

Xia, T., Y. Cheng, Q. Zhang, F. Xiao, B. Liu, S. Chen and F. Guo (2012). "S6K1 in the central nervous system regulates energy expenditure via MC4R/CRH pathways in response to deprivation of an essential amino acid." *Diabetes* **61**(10): 2461-2471.

Xue, H. G., C. Y. Yang and H. Ito (2004). "The anterograde and retrograde axonal transport of biotinylated dextran amine and biocytin in the nervous system of teleosts." *Brain Res Brain Res Protoc* **13**(2): 106-114.

Yanase, H., H. Shimizu, K. Yamada and T. Iwanaga (2002). "Cellular localization of the diazepam binding inhibitor in glial cells with special reference to its coexistence with brain-type fatty acid binding protein." *Arch Histol Cytol* **65**(1): 27-36.

Yang, C. S., C. K. Lam, M. Chari, G. W. Cheung, A. Kokorovic, S. Gao, I. Leclerc, G. A. Rutter and T. K. Lam (2010). "Hypothalamic AMP-activated protein kinase regulates glucose production." *Diabetes* **59**(10): 2435-2443.

Yang, Y. K., D. A. Thompson, C. J. Dickinson, J. Wilken, G. S. Barsh, S. B. Kent and I. Gantz (1999). "Characterization of Agouti-related protein binding to melanocortin receptors." *Mol Endocrinol* **13**(1): 148-155.

Yeh, W. L., C. J. Lin and W. M. Fu (2008). "Enhancement of glucose transporter expression of brain endothelial cells by vascular endothelial growth factor derived from glioma exposed to hypoxia." *Mol Pharmacol* **73**(1): 170-177.

Yi, C. X., K. M. Habegger, J. A. Chowen, J. Stern and M. H. Tschop (2011). "A role for astrocytes in the central control of metabolism." *Neuroendocrinology* **93**(3): 143-149.

Yu, H., Y. Bi, W. Ma, L. He, L. Yuan, J. Feng and R. Xiao (2010). "Long-term effects of high lipid and high energy diet on serum lipid, brain fatty acid composition, and memory and learning ability in mice." *Int J Dev Neurosci* **28**(3): 271-276.

Zarjevski, N., I. Cusin, R. Vettor, F. Rohner-Jeanrenaud and B. Jeanrenaud (1993). "Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity." *Endocrinology* **133**(4): 1753-1758.

Zielke, H. R., C. L. Zielke and P. J. Baab (2009). "Direct measurement of oxidative metabolism in the living brain by microdialysis: a review." *J Neurochem* **109 Suppl 1**: 24-29.

Zimmermann, R., J. G. Strauss, G. Haemmerle, G. Schoiswohl, R. Birner-Gruenberger, M. Riederer, A. Lass, G. Neuberger, F. Eisenhaber, A. Hermetter and R. Zechner (2004). "Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase." *Science* **306**(5700): 1383-1386.