



# **Implication de la protéine découplante 2 (UCP2) dans la réponse au stress**

**Mémoire**

**Marie-Claude Roy**

**Maîtrise en physiologie-endocrinologie -  
Maître ès sciences (M. Sc.)**

Québec, Canada

© Marie-Claude Roy, 2014



## Résumé

Les protéines découplantes (UCPs) sont situées dans la membrane interne des mitochondries. La première découverte, UCP1, est connue pour son potentiel à découpler la synthèse de l'adénosine 5' triphosphate (ATP) de l'oxydation des substrats énergétiques, ce qui entraîne une accélération du métabolisme et une production de chaleur. La protéine découplante 2 (UCP2), est distribuée de façon ubiquitaire et semble plutôt réguler la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'utilisation des substrats énergétiques. À notre connaissance, le rôle d'UCP2 dans les différents segments de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (*hypothalamic-pituitary-adrenal* — HPA) est encore peu connu, tout comme l'implication potentielle de cette protéine dans la réponse au stress. Lors de cette étude, nous avons (i) regardé la distribution de l'ARN messenger d'*Ucp2* dans l'axe HPA, (ii) évalué les effets du stress sur l'expression d'*Ucp2* et (iii) utilisé un modèle de souris déficiente en *Ucp2* (*Ucp2* KO) afin d'évaluer la réponse au stress en l'absence d'*Ucp2*. Sans avoir détecté de différence majeure dans la réponse au stress entre les souris de type sauvage (*Wild-type* — WT) et *Ucp2* KO, il est sans équivoque qu'*Ucp2* est exprimée en abondance dans l'axe HPA et que plusieurs régions du cerveau exprimant *Ucp2* présentent une activation suite au stress.



## Abstract

Uncoupling proteins (UCPs) are located in the inner membrane of mitochondria. The first discovered uncoupling protein 1 (UCP1) is well known for its potential to uncouple adenosine 5' triphosphate (ATP) synthesis from energetic substrate oxidation, resulting in heat production. Its partially homologue uncoupling protein 2 (UCP2) is found in several tissues and has been reported to reduce reactive oxygen species (ROS) production and seems implicated in the regulation of energetic substrates. According to our knowledge, the expression of *Ucp2* in the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis has not been described yet, neither its implication in stress response. Our study presents i) the distribution of *Ucp2* mRNA in the HPA axis, ii) the effect of stress on *Ucp2* expression in the brain and HPA axis and iii) the stress response of *Ucp2* deficient mice (*Ucp2* KO) to evaluate whether or not the absence of *Ucp2* affects the stress response in mice. Although we do not detect any difference between *Ucp2* KO mice and wild type (WT) mice following a stress, we have shown that *Ucp2* is expressed in abundance in the HPA axis. Many brain regions also present an increase in *Ucp2* expression after a stress.



# Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>v</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>vii</b>
<b>Liste des figures et tableaux</b> .....	<b>ix</b>
<b>Liste des abréviations et sigles</b> .....	<b>xi</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Avant-propos</b> .....	<b>xv</b>
<b>1. Chapitre 1 : Introduction</b> .....	<b>1</b>
1.1. Les protéines découplantes (UCPs) .....	1
1.1.1. Chaîne respiratoire et synthèse d'ATP .....	1
1.1.2. Formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) .....	3
1.1.3. Découplage mitochondrial .....	4
1.1.4. UCP1 : la première UCP découverte .....	4
1.1.5. La famille des UCPs : UCP2 à UCP5, PUMP, avian UCP .....	6
1.2. La protéine découplante 2 (UCP2) .....	8
1.2.1. Régulation de l'expression d'UCP2 .....	8
1.2.2. Rôles physiologiques et pathologiques d'UCP2 .....	9
1.2.2.1. UCP2 et la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) .....	10
1.2.2.2. UCP2 et la sécrétion d'insuline .....	10
1.2.2.3. UCP2 dans le métabolisme du glucose et des lipides .....	12
1.2.2.4. UCP2 et la défense immunitaire .....	14
1.2.2.5. Rôle protecteur d'UCP2 .....	15
1.2.3. UCP2 et le cerveau .....	15
1.2.3.1. Distribution et expression .....	15
1.2.3.2. Rôle neuroprotecteur d'UCP2 .....	16
1.2.3.3. Rôle d'UCP2 dans la régulation du métabolisme et la sensibilité au glucose .....	16
1.3. L'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HPA) et la réponse au stress .....	17
1.3.1. Les différents acteurs de l'axe HPA .....	17
1.3.2. UCP2 dans le stress .....	19
1.4. Problématiques et objectifs de la recherche .....	20
<b>2. Chapitre 2 : Article</b> .....	<b>21</b>
2.1. Résumé .....	23
2.2. Abstract .....	24
2.3. Introduction .....	25
2.4. Methods .....	26
2.4.1. Animals .....	26
2.4.2. Acute treadmill protocol .....	26
2.4.3. Chronic treadmill protocol .....	26
2.4.4. Neuronal activation of UCP2 mRNA-expressing neurons .....	27
2.4.5. Brain Preparation .....	27
2.4.6. In situ hybridization .....	27

2.4.7.	Double-labelling procedures .....	28
2.4.8.	Antisense 35S-Labeled cRNA Probes.....	29
2.4.9.	Quantitative analysis of the hybridization signals.....	30
2.4.10.	Quantitative analysis of double-labelling.....	30
2.4.11.	Plasma determinations.....	30
2.4.12.	Statistical analyses.....	31
2.5.	Results.....	31
2.5.1.	Distribution of UCP2 in the HPA axis .....	31
2.5.2.	Activation of neurons expressing UCP2 mRNA following a stress.....	31
2.5.3.	Variation of UCP2 mRNA following a stress .....	32
2.5.4.	Effects of acute and chronic stress on the HPA axis activity of UCP2 KO mice.....	32
2.6.	Discussion.....	33
2.7.	Figures and tables .....	39
<b>3.</b>	<b>Chapitre 3.....</b>	<b>51</b>
3.1.	Discussion générale et conclusions.....	51
3.2.	Perspectives .....	53
	<b>Bibliographie.....</b>	<b>55</b>



## Liste des figures et tableaux

Figure 1. La chaîne de transport d'électrons et la phosphorylation oxydative.....	3
Figure 2. Activation d'UCP1 dans le tissu adipeux brun.....	5
Figure 3. Arbre phylogénétique des UCPs et des transporteurs mitochondriaux d'anions.....	7
Figure 4. Rôle d'UCP2 dans la sécrétion d'insuline .....	12
Figure 5. Rôle d'UCP2 dans l'activation/inhibition des neurones POMC et AgRP .....	14
Figure 6. Activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) .....	19



## Liste des abréviations et sigles

$\alpha$  : alpha

$\beta$  : beta

$\delta$  : delta

ACTH : adreno-corticotropic-hormone

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine 5' diphosphate

AgRP : agouti-related protein

ARC : noyau arqué

ATP : adénosine 5' triphosphate

cAMP-PKA : cyclique adénosine monophosphate-protéine kinase A

CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone

CRF : corticotropin-releasing factor

CRFR1 : corticotropin-releasing factor receptor 1

FADH<sub>2</sub> : flavine adénine dinucléotide

FOXO1 : forkhead transcription factor O1

H<sup>+</sup> : proton

HPA : hypothalamo-hypophyso-surrénalien (hypothalamic-pituitary adrenal axis)

H<sub>2</sub>O : eau

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène

K<sub>ATP</sub> : canaux potassium ATP dépendants

kD : kilo Dalton

KO : knock-out

LPS : lipopolysaccharide

MCH : melanin-concentrating hormone

MC2-R : récepteur mélanocortine de type 2

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide

NPY : neuropeptine Y

O<sub>2</sub> : oxygène

O<sub>2</sub><sup>-</sup> : anion superoxyde

ob/ob : souris déficiente en leptine

PGC-1 $\alpha$  : peroxysome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1-alpha

Pi : phosphate

POMC : pro-opiomélanocortine

PPAR- $\alpha$  : peroxysome proliferator-activated receptor-alpha

PPAR- $\gamma$  : peroxysome proliferator-activated receptor-gamma

PUMP : plant uncoupling mitochondrial protein

PVH : noyau paraventriculaire de l'hypothalamus

ROS : espèces réactives de l'oxygène  
SCN : suprachiasmatic nucleus  
SIRT1 : silent information regulator T1  
Sp1 : specific protein-1 binding site  
SRE : sterol regulatory elements  
SREBP-1c : sterol regulatory élément binding protein-1c  
TG : triglycérides  
TRE : thyroid hormone response elements  
UCP : protéines découplantes/uncoupling protein  
*Ucp2* KO : souris déficiente pour le gène *Ucp2*  
WT : wild-type

## Remerciements

Ce mémoire n'aurait pas vu le jour sans cette aide précieuse reçue de la part de mon directeur de recherche et de mes précieux collègues de travail. Je tiens donc à remercier chaleureusement le Dr Denis Richard, mon mentor qui m'a accueilli au sein de son laboratoire et qui a supervisé mes travaux au cours de ces années. Merci à mes collègues Josée Lalonde, Laurie Rouger, Julie Plamondon, Sébastien Poulin, Sébastien Clavel, Marie-Noël Cyr, Éric Paradis, Pierre Samson et Sébastien Clément qui m'ont enseigné beaucoup et supporté dans mes protocoles expérimentaux. Merci à mes collègues et amis, Magalie Berthiaume, Elena-Dana Baraboi, Yves Gélinas, Christian Doyon, Mathieu Laplante, pour leur support et tous ces moments partagés qui font de ces études plus qu'un diplôme, mais aussi des souvenirs précieux. Je tiens aussi à remercier Christian Roy, qui a toujours été présent et m'a supporté pendant ces années de maîtrise.

Pour terminer, je tiens à remercier mon conjoint Dominic Proulx qui m'a été d'un support inestimable. Sa patience et ses encouragements me permettent aujourd'hui de finir cet ouvrage. Merci à ma famille, spécialement à ma mère Pauline pour son support.



## **Avant-propos**

La présente maîtrise est déposée à la Faculté des Études Supérieures de l'Université Laval dans l'objectif d'obtenir le grade de maître ès en sciences. Le sujet de ce mémoire est « Implication de la protéine découplante 2 (UCP2) dans la réponse au stress. » Une introduction générale décrit le fonctionnement de la respiration cellulaire et résume le rôle des différentes UCPs connues jusqu'à ce jour, plus particulièrement d'UCP2. Les résultats et les conclusions de mes travaux de recherche sont présentés dans ce document sous la forme d'un article s'intitulant : « Distribution and implication of uncoupling protein 2 in the hypothalamic-pituitary adrenal axis ». Ces recherches, conduites au Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec (CRIUCPQ), ont été le fruit d'un travail d'équipe, dont j'ai été la principale investigatrice, sous la supervision du Dr Denis Richard. Cet article est le fruit d'une collaboration avec de précieux collègues. Tout d'abord je remercie Josée Lalonde qui m'a encadré dans la réalisation de mes expériences et a réalisé mes analyses biochimiques. Je remercie aussi Julie Plamondon qui a été mon mentor en laboratoire et Sébastien Poulin qui m'a tout appris dans la manipulation des animaux et qui m'a aidé dans la réalisation des mes protocoles animaux.





# 1. Chapitre 1 : Introduction

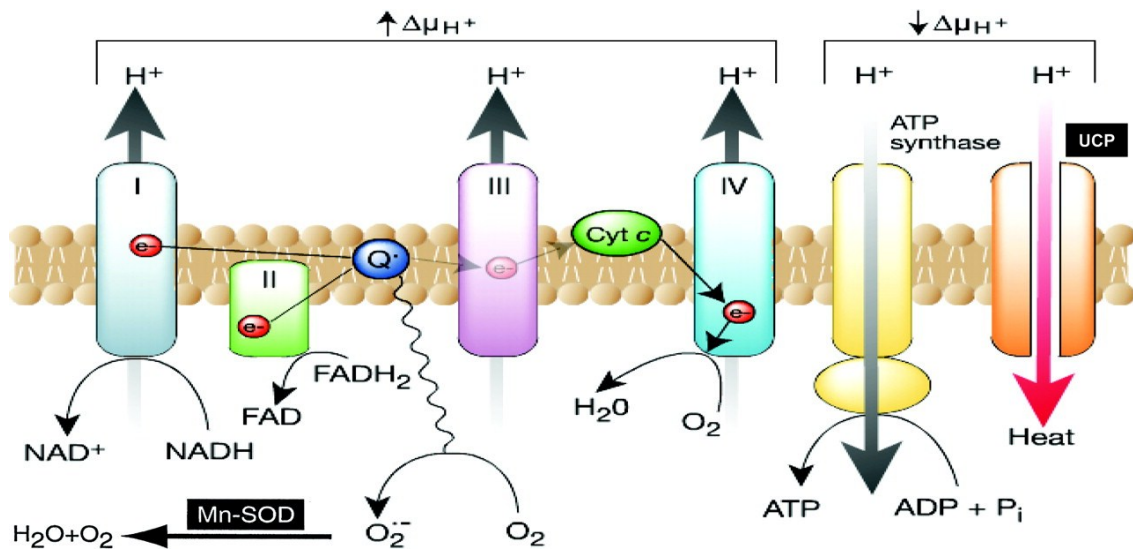
## 1.1. Les protéines découplantes (UCPs)

Les UCPs sont des protéines situées dans la membrane interne des mitochondries. Elles sont connues pour leur potentiel à découpler la synthèse de l'ATP de l'oxydation des substrats énergétiques en dissipant le potentiel membranaire créé par la chaîne de transport d'électrons. Si UCP1 est bien connue pour entraîner une production de chaleur dans le tissu adipeux brun, la fonction des autres UCPs demeure moins connue. Cette introduction générale résume l'implication des UCPs et particulièrement d'UCP2 dans la physiologie animale, son rôle central et son implication dans le stress. La compréhension du rôle des UCPs nécessite dans un premier temps la connaissance de la phosphorylation oxydative menant à la production de l'ATP.

### 1.1.1. Chaîne respiratoire et synthèse d'ATP

L'énergie nécessaire pour réaliser chacune des réactions énergivores de l'organisme prend sa source dans les nutriments que nous ingérons (protéines, glucides, lipides). D'abord absorbés sous forme de macromolécules, ces nutriments subissent une série de transformations biochimiques, permettant la formation de l'ATP, une molécule haute en énergie. La transformation biochimique des nutriments mène à la production de molécules de dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ), de molécules riches en énergie et de coenzymes d'oxydoréductions (nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et flavine adénine dinucléotide ( $\text{FADH}_2$ )) [1]. La production d'ATP s'effectue au niveau de la chaîne respiratoire, située dans la membrane interne de la mitochondrie (Figure 1). La chaîne respiratoire est composée de quatre complexes d'oxydoréduction (complexes I à IV). Les complexes I et II sont les premiers accepteurs d'électrons provenant du NADH et  $\text{FADH}_2$  respectivement [1]. Une série de réactions d'oxydoréduction permet le passage des électrons d'un complexe à l'autre, du complexe I jusqu'au complexe IV. Au complexe IV, les électrons sont fortement attirés par l'accepteur d'électrons possédant la plus grande

affinité : l'oxygène ( $O_2$ ). Il en résulte la réduction d'une molécule d' $O_2$  en deux molécules d'eau ( $H_2O$ ) ( $O_2 + 4 H^+ = 2 H_2O$ ) [1]. Le transfert des électrons d'un complexe à l'autre est une réaction exergonique donnant l'énergie nécessaire au pompage des protons ( $H^+$ ) de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire de la mitochondrie [2, 3]. Le gradient électrochimique créé par l'accumulation de  $H^+$  dans l'espace inter-membranaire incite à un retour des  $H^+$  dans la matrice mitochondriale via l'ATP synthase [2, 3]. Il en résultera la production d'une molécule d'ATP à partir d'une molécule d'adénosine 5' diphosphate (ADP) et d'une molécule de phosphate ( $P_i$ ) (figure 1). Subséquemment, l'hydrolyse d'une molécule d'ATP permettra de libérer l'énergie emmagasinée dans les liaisons phosphates. Cette énergie sert de carburant à une multitude de processus biologiques essentiels à la survie et la croissance cellulaire [1].



**Figure 1. La chaîne de transport d'électrons et la phosphorylation oxydative.**

Le pompage des protons par les complexes I à IV de la chaîne crée un potentiel membranaire de part et d'autre de la mitochondrie. Des électrons peuvent s'échapper de la chaîne de transport et réagir avec l'oxygène créant ainsi des espèces réactives de l'oxygène. Le retour de protons par l'ATP synthase permet la production de l'ATP. Le passage passif des protons par UCP1 permet la dissipation du potentiel membranaire et la production de chaleur. [4]

### 1.1.2. Formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS)

La présence d'oxygène est essentielle aux processus aérobiques de la cellule, mais a aussi comme conséquence la production de ROS. En effet, une réduction incomplète de la molécule d'oxygène, le dernier accepteur d'électron de la chaîne respiratoire, résulte en la formation de ROS dont l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) [5] (Figure 1). Une activité élevée de la chaîne respiratoire (potentiel membranaire élevé) couplée à un besoin faible en ATP (demande énergétique faible) est propice à une production élevée de ROS causée par l'échappement d'environ 1% des électrons de la chaîne respiratoire [6]. Cette perte d'électrons se ferait principalement au niveau des complexes I et III de la chaîne

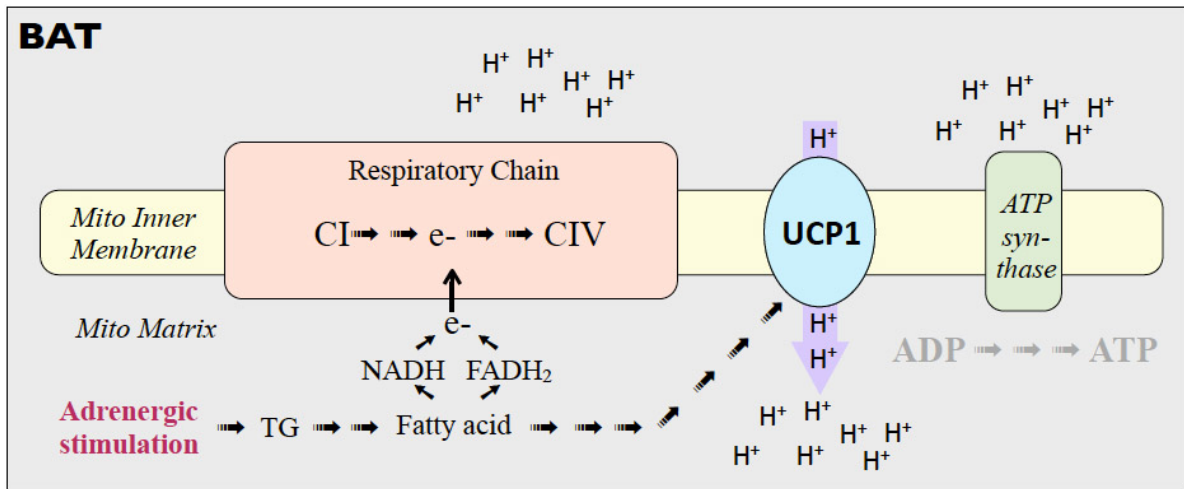
respiratoire [6]. La production des ROS cause des dommages à l'acide desoxyribonucléique (ADN), aux protéines, aux lipides et aux structures de la cellule lorsque produit en trop grande quantité [7]. La peroxydation des lipides est particulièrement dommageable pour la cellule puisqu'elle cause des changements dans la perméabilité et la fluidité des membranes cellulaires [7, 8]. D'autre part, au cours des dernières années, il a été démontré que les ROS avaient un rôle essentiel dans la signalisation intracellulaire, entre autres au niveau de la sécrétion d'insuline [9].

### **1.1.3. Découplage mitochondrial**

La grande majorité de la dissipation du potentiel membranaire se fait par le passage des  $H^+$  à travers l'ATP synthase. On parle alors de couplage de la synthèse de l'ATP [3, 10]. Le processus permettant la dissipation du potentiel membranaire indépendamment de la synthèse d'ATP est nommé découplage [11]. En réduisant le potentiel membranaire, le découplage permet, en accélérant le passage des électrons via la chaîne respiratoire, de réduire la production de ROS [12] et permet la production de chaleur dans le cas d'UCP1 dans le tissu adipeux brun [13].

### **1.1.4. UCP1 : la première UCP découverte**

Un grand nombre de mammifères, en particulier les petits rongeurs, peuvent survivre aisément aux températures hivernales grâce à leur capacité thermogène. Le secret de cette production massive de chaleur réside dans le tissu adipeux brun [14], un tissu hautement actif métaboliquement possédant des cellules riches en mitochondries. Sa capacité à produire de la chaleur est 60 fois plus importante que celle du foie [15]. Pendant plusieurs années, les chercheurs ont tenté de déterminer le facteur clé permettant la production de chaleur dans le tissu adipeux brun. C'est à la fin des années 70 que ce facteur fût découvert : la protéine découplante 1 (UCP1) [16], une protéine mitochondriale de 34-kDa permettant le découplage de la production d'ATP [17 1983].



**Figure 2. Activation d'UCP1 dans le tissu adipeux brun**

La stimulation adrénérique du tissu adipeux brun entraîne une entrée et une utilisation accrue des acides gras. Il s'en suivra une activation d'UCP1 et une augmentation de l'activité de la chaîne de transport d'électrons. Le retour des protons par UCP1 engendre la production de chaleur [18].

L'activation d'UCP1 et de la thermogénèse se produit suite à la sécrétion de norépinéphrine par le système nerveux sympathique [19]. La présence d'acide gras est essentielle à cette activation [19]. En se liant au récepteur bêta-adrénérique des cellules adipeuses brunes, la norépinéphrine active la voie cAMP-PKA résultant en une augmentation de l'entrée et de l'utilisation des acides gras dans la cellule. La lipolyse des triglycérides en acides gras entraîne une hausse de la bêta-oxydation, de la production d'acétyl-CoA et des coenzymes NADH et FADH. Le résultat sera une activation de la chaîne respiratoire et une augmentation de potentiel membranaire de part et d'autre de la membrane interne de la mitochondrie. La dissipation du potentiel membranaire par UCP1 va résulter en une production de chaleur [13, 20]. L'utilisation de souris transgéniques est venue confirmer le rôle thermogène d'UCP1. Les souris déficientes en *Ucp1* sont intolérantes au froid et ne peuvent, en ambiance froide, survivre plus de quelques jours [21]. L'activation d'UCP1 permet aussi l'augmentation de la dépense énergétique et la diminution du stockage de gras [22].

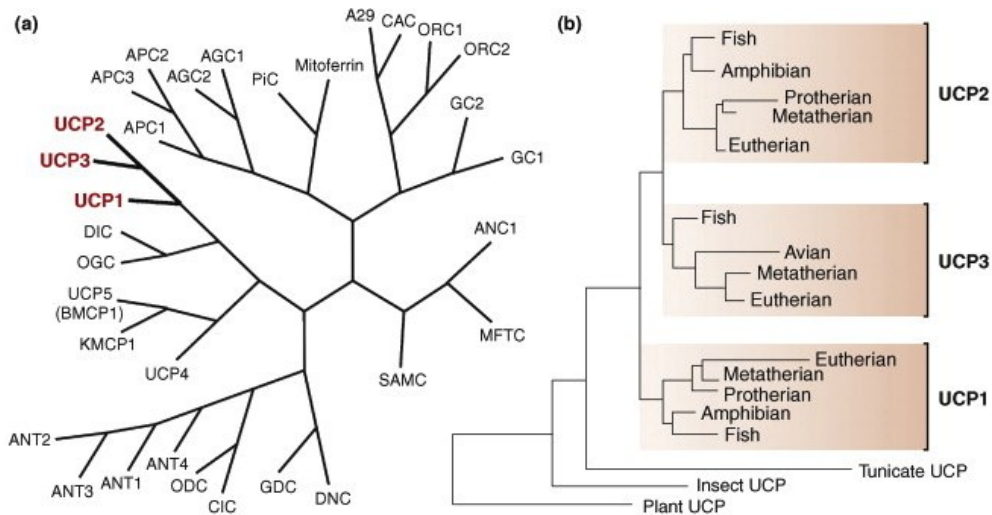
Il a longtemps été rapporté que chez l'humain, le tissu adipeux brun était présent uniquement chez les nouveau-nés [23]. Dans les dernières années, il a été démontré qu'il en était autrement. La présence de tissu adipeux brun chez l'humain adulte a été mise en évidence grâce à l'imagerie médicale. On le retrouve principalement dans les régions cervicale, supraclaviculaire, paravertébrale, médiastinale et périrénale [24-26]. L'implication de la présence de tissu adipeux brun chez l'humain, sa contribution dans le métabolisme, la production de chaleur et son incidence sur l'obésité est le sujet de plusieurs recherches à travers le monde [25, 27].

#### **1.1.5. La famille des UCPs : UCP2 à UCP5, PUMP, avian UCP**

C'est en 1997 que furent découverts deux homologues du gène *Ucp1*: *Ucp2* [28] et *Ucp3* [29], qui présentent une homologie de 71% entre elles et de 59% et 53%, respectivement, avec *Ucp1*. Contrairement à l'ARN messager d'*Ucp1* que l'on retrouve uniquement dans le tissu adipeux brun, l'ARN messager d'*Ucp2* est exprimé de façon ubiquitaire, alors que celui d'*Ucp3* se situe principalement dans le muscle squelettique et le tissu adipeux brun chez les rongeurs [28]. Les premières études sur la fonction d'UCP2 et UCP3 ont révélé que le rôle premier de ces protéines n'était pas la production de chaleur [30]. Tout comme UCP1, les protéines UCP2 et UCP3 présenteraient des fonctions découplantes. Quoique encore controversée, cette hypothèse a été démontrée par plusieurs groupes de chercheurs indépendants. Le terme « mild-uncoupling » ou découplage léger a été introduit et décrirait plus adéquatement les effets des homologues d'*Ucp1* [31]. En effet, d'après des estimations publiées par Jezek P. en 2004 [32], *Ucp1* aurait une expression 4,4 fois plus élevée dans le tissu adipeux brun comparativement à *Ucp2* dans les poumons (tissu qui démontre une expression d'*Ucp2* élevée en comparaison avec d'autres tissus) et 40 fois plus élevée comparativement au foie (tissu avec très peu d'*Ucp2* exprimé) [32]. De par leur faible niveau d'expression, le potentiel de découplage d'UCP2 et UCP3 serait donc physiologiquement grandement inférieur à celui d'UCP1.

Les protéines découplantes 4 et 5 sont les plus récentes à avoir été découvertes. Il est connu

que le gène *Ucp4*, homologue à 34% avec *Ucp1*, se retrouve exclusivement dans le cerveau [33] et aurait une fonction découplante. Le gène *Ucp5*, possède quant à lui 30% d'homologie avec *Ucp1*. Son expression se retrouve principalement dans le foie, les testicules et certaines régions du cerveau [34, 35]. UCP4 et 5 se retrouvent dans une sous-famille différente d'UCP1-3 (figure 3a)



**Figure 3. Arbre phylogénétique des UCPs et des transporteurs mitochondriaux d'anions.**

(a) L'analyse phylogénétique des UCPs suggère que UCP1, 2 et 3 se retrouvent dans une sous-famille qui ne comprend pas UCP4 et UCP5. (b) Schéma montrant les protéines découplantes chez différents organismes. L'archétype UCP1, présent chez les mammifères, a connu une évolution rapide et est lié de façon plus lointaine à ces ancêtres que ses paralogues UCP2 et UCP3. [36]

La présence des protéines découplantes chez les oiseaux, les poissons et les plantes, démontre que les UCPs forment une famille ancienne et conservée [37-39] (figure 3b). La protéine découplante mitochondriale chez la plante (PUMP: Plant Uncoupling Mitochondrial Protein), qui présente 44% d'homologie de séquence avec UCP1 et 47% avec UCP2, est fortement induite dans les feuilles des plantes exposées à 4°C et lors d'attaques par des pathogènes [37, 40, 41]. Son rôle est encore controversé, mais semble se rapprocher

de celui attribué aux UCPs des mammifères, soit la thermogenèse [37], la régulation de la production des ROS [42] et du stress oxydatif [43]. La présence des UCPs chez les plantes, les poissons et les protozoaires suggère que l'apparition des UCPs dans l'évolution n'avait pas un but thermogénique.

## 1.2. La protéine découplante 2 (UCP2)

Le gène *Ucp2* est localisé au niveau des chromosomes 7, 1 et 11 chez la souris, le rat et l'humain respectivement, des régions impliquées dans l'hyperinsulinémie et l'obésité [28]. Tout comme les autres protéines découplantes connues, la protéine UCP2 a une masse moléculaire d'environ 30 kD et possède deux domaines transmembranaires. Elle a la particularité d'être exprimée en faible abondance de façon ubiquitaire, principalement au niveau des poumons, du pancréas, des intestins, de la rate, du tissu adipeux blanc, du système immunitaire et du système nerveux centrale [35]. Sa présence a aussi été détectée dans le muscle, les reins, les testicules, le tissu adipeux brun et le foie (cellules de Kupffer). Dans le cerveau, la présence de l'ARNm d'*Ucp2* est très spécifique à certains noyaux [44]. Les régions de l'hypothalamus, du septal ventral, le tronc cérébral, les régions ventriculaires et le cervelet expriment tous des niveaux élevés d'*Ucp2*, principalement dans les neurones. Étant donné qu'il n'existe pas d'anticorps spécifique pour la détection de la protéine UCP2, il est difficile de déterminer avec exactitude sa présence dans certains tissus. Sa faible expression ainsi que sa demi-vie très courte rend sa détection d'autant plus ardue [45].

### 1.2.1. Régulation de l'expression d'UCP2

La double régulation d'UCP2 au niveau transcriptionnel et protéique ainsi que sa demi-vie d'environ une heure, indiquent qu'UCP2 est une protéine pouvant réagir rapidement à un stimulus telle la variation des substrats énergétiques ou la production de ROS [46]. La région promotrice d'*Ucp2* contient plusieurs sites de liaison aux facteurs de transcription dont un Sp1 (*specific protein-1 binding site*), un double stérol élément E-box (*hélix-loop-helix protein binding sites*), un TRE (*thyroid hormone response elements*) et un SRE (*sterol*



*regulatory elements*) pouvant expliquer la variation de l'expression d'*Ucp2* en réponse à l'élévation des niveaux d'acides gras (suite à un jeûne ou une diète riche en graisse) et des niveaux d'hormones thyroïdiennes [47 2001, 48]. Plusieurs facteurs de transcriptions régulent l'expression génique d'*Ucp2*. PPAR- $\alpha$  et  $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  et  $\gamma$* ), PGC-1 $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$* ) et SREBP-1c (*sterol regulatory element binding protein-1c*), tous des facteurs de transcription impliqués dans l'anabolisme et le métabolisme des acides gras, augmenteraient l'ARNm d'*Ucp2*. SIRT1 (*silent information regulator T1*) et FOXO1 (*forkhead transcription factor O1*), impliquées dans le catabolisme et la diminution de l'adiposité, diminueraient quant à eux l'expression d'*Ucp2* [49]. La recherche pointe de plus en plus vers un consensus démontrant que la régulation d'*Ucp2* serait liée à la présence de lipides et la production des ROS. Les situations menant à une augmentation de la production de ROS corréleraient généralement avec l'élévation des niveaux d'ARNm d'*Ucp2*. De fait, l'induction d'une ischémie, l'injection de LPS [50] et l'injection d'acide kainique [51], des situations où les niveaux de ROS sont élevés, induisent tous de fortes augmentations d'*Ucp2* au niveau du cerveau. Le jeûne augmente quant à lui l'expression du messageur d'*Ucp2* dans l'estomac [35]. Récemment, il a été démontré que l'activation-désactivation d'UCP2 serait régulée par sa déglutathionylation-glutathionylation selon les niveaux de production de ROS dans la mitochondrie [12].

### **1.2.2. Rôles physiologiques et pathologiques d'UCP2**

On a rapporté qu'UCP2 jouerait un rôle dans une multitude de fonctions physiologiques et pathologiques [6]. Elle est apparemment impliquée dans (i) la régulation des ROS [12], (ii) la modulation du métabolisme du glucose et des lipides [52], (iii) le contrôle de la sécrétion d'insuline [53, 54], (iv) la défense immunitaire [53, 54] et (v) le développement de plusieurs pathologies dont l'athérosclérose [55] et le cancer [56]. C'est grâce entre autres au modèle de souris *Ucp2* KO qu'il a été possible de mieux comprendre le rôle d'UCP2 dans la physiologie animale. L'expression ubiquitaire d'*Ucp2* rend par contre difficile la démonstration de son rôle précis.

### **1.2.2.1. UCP2 et la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS)**

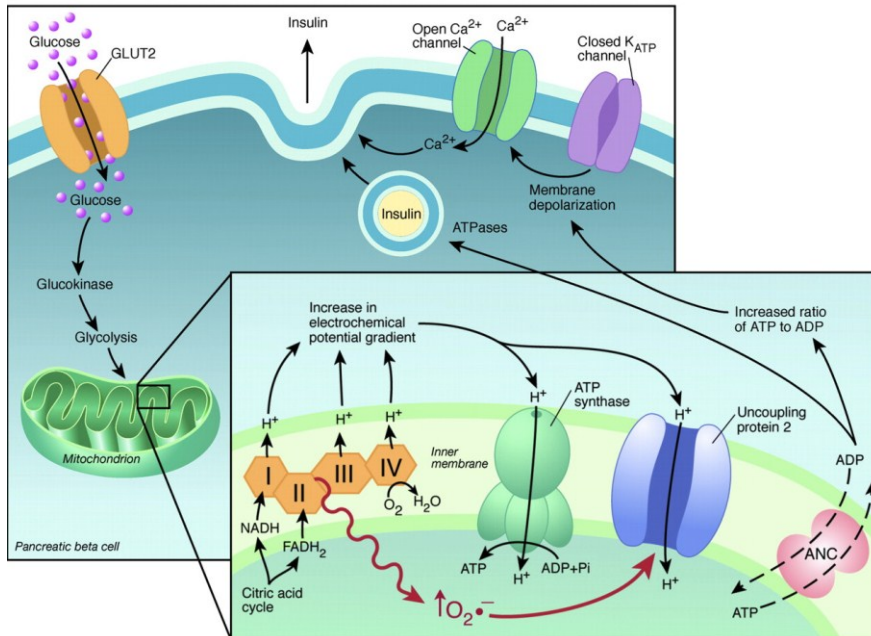
Les ROS sont connus principalement pour leur potentiel à endommager la cellule [7]. Afin de se protéger contre ces ROS, la cellule s'est dotée d'une série de molécules antioxydantes et d'enzymes permettant la transformation des ROS en molécules inoffensives [57]. Le découplage de la mitochondrie est un autre moyen efficace de diminuer la production de ROS puisqu'il permet de réduire le potentiel membranaire, ce qui facilite le transport des électrons dans la chaîne respiratoire. De par sa fonction potentiellement découplante, il a été rapporté par plusieurs groupes que l'activation ou l'absence d'UCP2 réduirait ou augmenterait respectivement la production de ROS [53, 58, 59]. À leur tour, la production accrue des ROS serait corrélée positivement à l'activation d'UCP2 [12] (Figure 4). Le contrôle de la production des ROS a des conséquences à plusieurs niveaux : immunité, signalisation cellulaire, sécrétion d'insuline, inflammation. La littérature suggère qu'UCP2 est impliquée dans la plupart de ces situations. D'autre part, les ROS sont de plus en plus connus pour leur implication dans la signalisation cellulaire. Des études ont d'ailleurs montré qu'en régulant la production de ROS, UCP2 avait un rôle clé dans la régulation de la signalisation cellulaire [60].

### **1.2.2.2. UCP2 et la sécrétion d'insuline**

Une des premières fonctions d'UCP2 à avoir été rapportée est son implication dans la régulation de la sécrétion d'insuline. Une étude parue en 2001 a démontré que la souris *Ucp2* KO avait un niveau basal et à jeun d'insuline plus élevé que les souris de type sauvage. Dans cette même étude, des souris génétiquement obèses déficientes en leptine (*ob/ob*) étaient croisées avec les souris *Ucp2* KO (*ob/ob/KO*). Comparativement aux souris *ob/ob*, les souris *ob/ob/KO* avaient des niveaux circulants de glucose plus faible, conséquence d'une hausse de la sécrétion d'insuline [61]. Pour expliquer ce résultat, il a été suggéré qu'UCP2 permettrait de diminuer la force protonotrice de part et d'autre de la membrane interne de la mitochondrie et réduirait par le fait même la production d'ATP dans la cellule. Le ratio ATP/ADP a une fonction essentielle dans la régulation de la

sécrétion de l'insuline par les cellules bêta du pancréas. En effet, un ratio ATP/ADP élevé permet la fermeture des canaux potassium ATP dépendants ( $K_{ATP}$ ) causant la dépolarisation membranaire qui, à son tour, active l'ouverture des canaux calcium voltage dépendants. La libération de calcium dans le cytosol engendre alors l'exocytose des vésicules contenant l'insuline avec la membrane cytoplasmique, créant la libération de l'insuline à l'extérieur de la cellule bêta du pancréas. Un ratio ATP/ADP plus élevé chez les *Ucp2* KO augmenterait donc la libération de l'insuline par ces cellules [61] (Figure 3). Plusieurs études sont venues appuyer ce mécanisme d'action d'UCP2 dans la cellule bêta du pancréas [62-64].

D'autre part, un article a récemment démontré que la diminution de la production des ROS liée à la présence d'UCP2 est l'élément clé de la régulation de la sécrétion d'insuline [60]. Les cellules bêta du pancréas démontrent certaines caractéristiques qui suggèrent que les niveaux de ROS, principalement le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), agiraient comme signal intracellulaire menant à la sécrétion d'insuline [9]. Le  $H_2O_2$  est un ROS jouant un rôle dans la signalisation intracellulaire, mais causant aussi des dommages cellulaires si présent en trop grande quantité [9]. En diminuant la production de ROS, UCP2 permettrait de diminuer les dommages liés à la production de ROS en plus de réguler négativement la production d'insuline.



**Figure 4. Rôle d’UCP2 dans la sécrétion d’insuline**

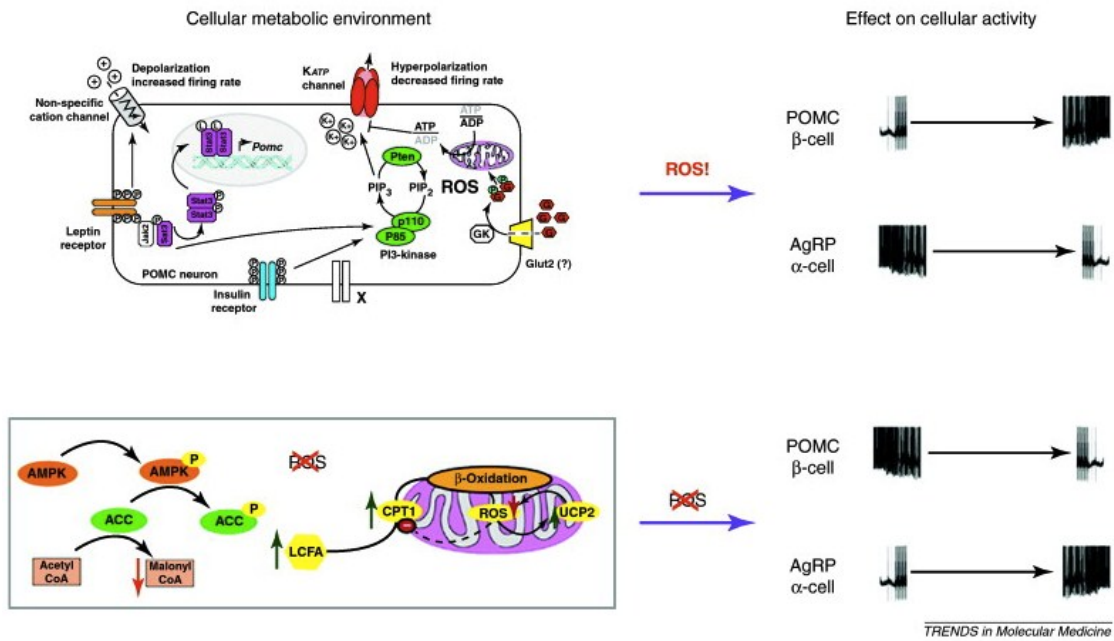
En présence de glucose, une forte production d’ATP engendrant la fermeture des canaux  $K_{ATP}$  et l’entrée du calcium dans la cellule. Il en résulte une augmentation de la sécrétion d’insuline. De par sa fonction découplante, UCP2 diminuerait la production d’ATP réduisant ainsi la libération de l’insuline. Les ROS, produits par l’oxydation du glucose, augmenteraient l’activité d’UCP2 afin de diminuer les dommages oxydatifs en plus de réguler la sécrétion d’insuline. [65]

### 1.2.2.3. UCP2 dans le métabolisme du glucose et des lipides

L’activation d’UCP2 dans certains tissus semble grandement liée à l’augmentation des niveaux d’acides gras libres dans la circulation. Le jeûne [66], la diète kétoène [67], l’exposition au froid [66] et la diète riche en graisse induisent tous des augmentations de l’ARNm d’*Ucp2* dans différents tissus [68]. Ces observations ont mené à l’hypothèse de l’implication d’UCP2 dans la régulation de l’oxydation des acides gras libres. UCP2

pourrait promouvoir l'utilisation des lipides lorsque ceux-ci sont présents en grande quantité. Une des hypothèses formulées stipule que les acides gras réduits traverseraient la membrane interne mitochondriale par un mouvement passif de flip-flop [69]. Une fois à l'intérieur de la matrice mitochondriale, les acides gras réagiraient facilement avec les ROS créant alors des lipides oxydés et très dommageables pour la cellule. UCP2 pourrait permettre le retour des lipides vers l'espace inter-membranaire entraînant avec lui un proton  $H^+$ . En plus de diminuer la production de lipides oxydés, ce transport pourrait permettre une meilleure utilisation des lipides [68, 70, 71]. Dans le même ordre d'idée, une étude récente sur des fibroblastes de souris démontre que l'absence d'UCP2 entraîne une utilisation préférentielle du glucose aux dépens de l'oxydation des acides gras libres comparativement aux cellules contrôles [72]. De plus, les souris KO pour le gène *Ucp2* oxydèrent moins les lipides au niveau du foie suite à un jeûne de 24 ou 72h [73]. Suite à ces observations, on a formulé l'hypothèse du rôle d'UCP2 en tant que senseur et régulateur du substrat énergétique utilisé par la cellule [74]. Pour ce faire, UCP2 diminuerait l'entrée dans la mitochondrie du pyruvate provenant du glucose et pourrait favoriser l'utilisation des lipides [74].

Dans le cerveau, UCP2 semble jouer un rôle apparenté, soit le « glucose sensing ». Cette sensibilité au glucose dépendrait de cette particularité qu'a UCP2 à être activée par les acides gras (engendrant une diminution de la production des ROS) et à être inhibée par la présence de glucose (engendrant une augmentation de la production des ROS). Les ROS, utilisés comme signal intracellulaire au niveau des neurones, diminueraient par la suite l'activité des neurones pro-opiomélanocortine (POMC) et augmenteraient celle des neurones AgRP (*agouti-related protein*), signifiant un état de satiété à l'organisme [75] (Figure 5).



**Figure 5. Rôle d'UCP2 dans l'activation/inhibition des neurones POMC et AgRP**

En présence d'une forte concentration de glucose (satiété), les neurones POMC de l'hypothalamus sont activés dû à la forte présence de ROS. Dans les neurones AgRP, l'effet est inverse. On a alors une diminution de l'appétit. Lorsque les niveaux de glucose baissent (jeûne), le métabolisme des acides gras est favorisé et UCP2 est augmentée. La production de ROS est donc diminuée ce qui engendre une diminution de l'activité des neurones POMC et une augmentation de l'activité des neurones AgRP. On a alors une augmentation de la sensation de faim [52].

#### 1.2.2.4. UCP2 et la défense immunitaire

Il est bien connu qu'UCP2 se retrouve en abondance dans les cellules immunitaires telles que les macrophages, les lymphocytes et les neutrophiles ainsi que dans la rate. Plusieurs modèles ont démontré l'implication d'UCP2 dans la production des ROS par les macrophages. Entre autres, les souris déficientes en *Ucp2* se sont avérées être résistantes au développement du parasite intracellulaire *Toxoplasma Gondii* [53] dû à une production accrue de ROS par la défense immunitaire, dont les macrophages. Le développement de lésions d'athérosclérose, plus nombreuses chez les souris *Ucp2* KO versus les souris WT serait aussi causé par une augmentation de la production de ROS par les macrophages

infiltrant des souris déficientes en *Ucp2* [55, 76]. L'absence d'*Ucp2* pourrait aussi exacerber le développement du diabète de type 1 engendrée par la streptozotocine, causé par une inflammation accrue au sein des îlots pancréatiques [77].

#### **1.2.2.5. Rôle protecteur d'UCP2**

L'absence d'*Ucp2* a été associée à différents états pathologiques tels l'athérosclérose [55, 76], le diabète [61, 63] et la neurodégénérescence [78] démontrant que la présence d'UCP2 joue un rôle significatif dans l'intégrité des systèmes. Dans tous les cas, la limitation de la production des ROS exercée par UCP2 produirait un effet protecteur sur les tissus.

À l'inverse, UCP2 semble aussi impliquée dans le cancer [34, 56, 79]. Une présence accrue d'UCP2 a été détectée dans les cellules cancéreuses [34]. De plus, la surexpression d'UCP2 dans des lignées de cellules cancéreuses de colon induit une chemorésistance de ces cellules [56]

### **1.2.3. UCP2 et le cerveau**

#### **1.2.3.1. Distribution et expression**

La distribution de l'ARNm d'*Ucp2* a été démontrée par hybridation *in situ* chez le rat et la souris à la fin des années '90 [44, 80]. On retrouve *Ucp2* en grande quantité dans les neurones de l'hypothalamus, la région septale ventrale, la médulla, la région ventriculaire et le cervelet. Plus particulièrement, un signal d'hybridation très intense est présent dans plusieurs noyaux de l'hypothalamus tels que le noyau suprachiasmatique (SCN), le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVH) et le noyau arqué (ARC). Le noyau dorso-moteur du nerf vague et le plexus choroïdien sont aussi des zones où l'on retrouve l'ARNm d'*Ucp2* en grande quantité. L'expression d'*Ucp2* dans le cerveau augmente dans des cas

pathologiques entraînant un grand stress oxydatif et/ou la mort cellulaire, tels l'induction d'une ischémie [81], le traitement à l'acide kainique [51] ou l'injection de LPS [50].

### **1.2.3.2. Rôle neuroprotecteur d'UCP2**

Suite à ces observations, certains ont proposé un rôle protecteur d'UCP2 dans le cerveau. Utilisant un modèle de souris surexprimant UCP2, un groupe de chercheurs a démontré que l'expression constitutive d'UCP2 dans les cellules de l'hippocampe diminuait la mort cellulaire suite à l'induction de l'épilepsie [82]. De manière similaire, la présence accrue d'UCP2 diminuerait les dommages au cerveau suite à un traumatisme crânien ou à une ischémie [83]. D'autre part, il a aussi été rapporté que la souris *Ucp2* KO résisterait aux dommages liés à l'ischémie [81]. Cette similarité entre les souris *Ucp2* KO et les souris *Ucp2* transgéniques pourrait résulter d'un mécanisme compensatoire chez les souris KO.

### **1.2.3.3. Rôle d'UCP2 dans la régulation du métabolisme et la sensibilité au glucose**

La forte présence d'*Ucp2* dans des régions du cerveau impliquées dans la prise alimentaire et la dépense énergétique suggère qu'UCP2 pourrait participer à la régulation du métabolisme énergétique. Dans les dernières années, plusieurs études sont venues appuyer cette hypothèse [75, 84-86]. Plus particulièrement, UCP2 jouerait un rôle dans la sensibilité au glucose et l'activation/inhibition de certaines populations de neurones impliqués dans la prise alimentaire et la régulation de l'homéostasie du glucose sanguin [75, 86].

Dans un premier temps, en utilisant une approche développée pour l'étude des cellules beta du pancréas, l'équipe de Bradford Lowell a démontré que l'absence d'UCP2 ou l'inactivation pharmacologique d'UCP2 préviendrait ou renverserait la perte de sensibilité des neurones POMC (neurones anorexigènes) au glucose suite à un régime riche en sucre et en graisse [84]. Le mécanisme sous-jacent la sensibilité de ces neurones au glucose s'apparente à celui retrouvé dans les cellules beta du pancréas, c'est à dire qu'il est dépendant des niveaux d'ATP et de l'ouverture des canaux  $K_{ATP}$ . Quelques années plus



tard, ce même groupe est venu appuyer leurs résultats initiaux en montrant l'implication d'UCP2 dans l'activation des neurones à mélanocortine (MCH) stimulés par le glucose via un mécanisme aussi dépendant des canaux  $K_{ATP}$  [85].

Aussi, il a été démontré que la présence d'UCP2 était nécessaire à l'activation par la ghréline des neurones orexigéniques NPY/AgRP présents dans le noyau arqué de l'hypothalamus [75, 86]. Contrairement aux neurones POMC sensibles au glucose, l'activation des neurones NPY/AGRP serait dépendante de l'oxydation des acides gras et de la production des ROS [52, 75]. UCP2 serait un joueur clé dans cette signalisation en facilitant l'oxydation des acides gras et la diminution des ROS. La présence des ROS dans la signalisation cellulaire a été démontrée dans l'hypothalamus et les cellules beta du pancréas au cours des dernières années [87].

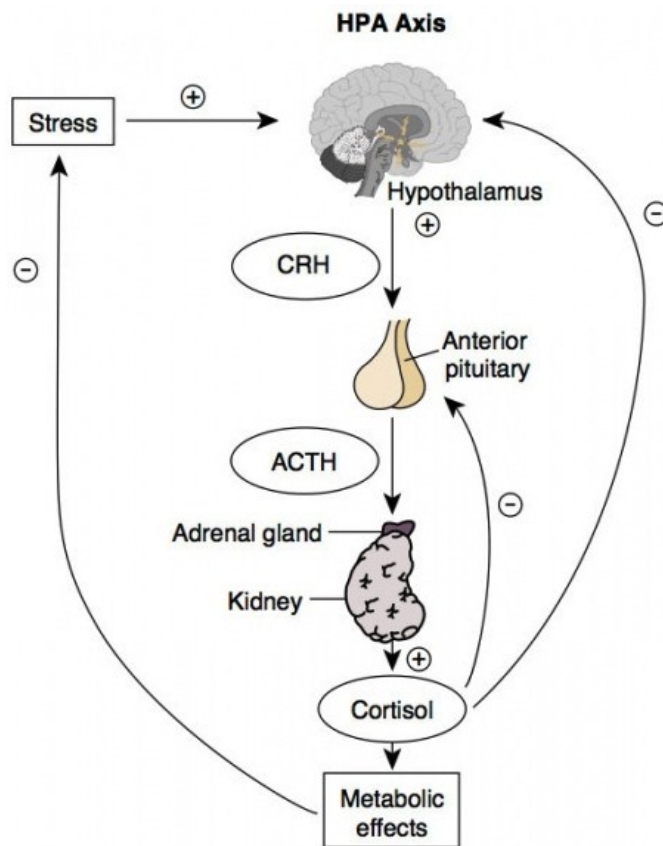
### **1.3. L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) et la réponse au stress**

Le stress se définit comme un « état réactionnel de l'organisme soumis à une agression brusque » (Larousse médicale). Il joue un rôle essentiel dans la lutte pour la survie en activant le rythme cardiaque, la respiration et l'utilisation des substrats énergétiques afin de permettre une réponse rapide à l'élément stressant. La réaction de stress prend naissance dans l'activation de l'axe HPA. Réaction bénéfique et essentielle dans certaines situations, le stress est reconnu pour être généralement délétère lorsque chronique [88].

#### **1.3.1. Les différents acteurs de l'axe HPA**

L'axe HPA est composé de 3 structures: le PVH, le lobe antérieur de l'hypophyse (ou adénohypophyse) et les glandes surrénales. Au niveau du PVH se retrouve un groupe de neurones sécrétant la corticolibérine (corticotropin-releasing factor ou CRF), un peptide de 41 acides aminés se liant avec une grande affinité au récepteur CRF de type 1 (CRFR1) [89]. Une fois libéré par les cellules du PVH, le CRF voyage via les capillaires du système

porte reliant directement l'hypothalamus à l'hypophyse. Il agit sur les cellules corticotropes de l'hypophyse antérieure, ou adénohypophyse, en se liant au CRFR1 abondamment exprimé à leur surface. L'adénohypophyse répond à cette stimulation par la sécrétion de l'hormone corticotrope ou *adreno-corticotropic-hormone* (ACTH), un dérivé de POMC. L'ACTH libérée dans la circulation sanguine agit sur le cortex des glandes surrénales (zone fasciculée) en se liant au récepteur mélanocortine de type 2 (MC2-R) pour induire la libération d'une hormone nommée corticostérone chez les rongeurs ou cortisol chez l'humain [90, 91] (Figure 6). La corticostérone est un glucocorticoïde puissant ayant des effets anti-inflammatoire et immunosuppresseur en plus d'augmenter le métabolisme des glucides et des protéines. Ses actions sont dirigées pour permettre une grande disponibilité des ressources énergétiques permettant une réponse adaptée au stress. La corticostérone agit aussi sur le PVH et l'hypophyse afin d'induire une rétro-inhibition de sa sécrétion [91] (Figure 6).



**Figure 6. Activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA)**

Lors d'un stress, du CRH sera libéré par les neurones du PVH de l'hypothalamus. En agissant sur la glande pituitaire, le CRH engendre la libération de l'ACTH dans la circulation sanguine. À son tour, l'ACTH agira sur les glandes surrénales et activera la libération de corticostérone [92].

### 1.3.2. UCP2 dans le stress

La relation entre UCP2 et le stress est très peu documentée. Selon un groupe de chercheur chinois, les souris KO pour le gène *Ucp2* présentent des signes de dépression plus sévères, des niveaux de corticostérone plus élevés et une perte de poids plus importante que leur congénère WT suite à un stress chronique [93]. Une autre étude a aussi démontré que les souris *Ucp2* KO étaient plus anxieuses que les souris WT, tant dans des conditions de repos que suite à un stress social [94]. Par contre, dans cette étude, les niveaux de corticostérone étaient plus faibles chez les souris KO.

#### 1.4. Problématiques et objectifs de la recherche

Dans la littérature actuelle, le rôle d'UCP2 s'exerce sur (i) la régulation des ROS [12], (ii) la régulation du métabolisme du glucose et des lipides [52], (iii) le contrôle de la sécrétion d'insuline [95], (iv) la défense immunitaire [53, 54] (v) le développement de plusieurs pathologies dont l'athérosclérose [55] et le cancer [56]. De par sa distribution spécifique à certaines régions, la présence d'*Ucp2* dans le cerveau est particulièrement intéressante. En plus de son rôle neuroprotecteur [82], UCP2 pourrait être impliquée dans le contrôle de la prise alimentaire et la régulation de la glycémie [75, 84, 86]. Dans ce contexte, il est possible qu'UCP2 agisse en influençant positivement ou négativement d'autres voies métaboliques gérées par le cerveau. Une voie à notre connaissance très peu explorée est le contrôle de l'axe HPA. La forte présence d'*Ucp2* dans le PVH [90] où l'on retrouve les cellules sécrétant le CRF, nous a amené à approfondir le rôle potentiel d'UCP2 dans la régulation de l'axe HPA ainsi que l'effet du stress dans l'activation neuronale de souris déficiente en *Ucp2*.

## **2. Chapitre 2 : Article**

# **Distribution and implication of uncoupling protein 2 in hypothalamic-pituitary-adrenal axis**

Marie-Claude Roy and Denis Richard

**Institutions:** Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, 2725, chemin Sainte-Foy, Québec (Québec), G1V 4G5, CANADA

**Keywords:** Uncoupling protein 2, stress, brain, hypothalamic-pituitary-adrenal axis, Fos, treadmill running

**Running head:** UCP2 in the stress

**Corresponding author:** Dr Denis Richard, Direction de la recherche, Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, 2725, chemin Sainte-Foy, Québec (Québec), G1V 4G5, CANADA.

Phone: (418) 656-8711 ext. 1716

E-mail: denis.richard@criucpq.ulaval.ca

## 2.1. Résumé

La protéine découplante 2 (UCP2) est une protéine mitochondriale connue pour son rôle dans la régulation de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'utilisation des substrats énergétiques. Elle est présente dans la majorité des tissus dont plusieurs zones du cerveau impliquées dans la régulation du stress. Le rôle d'UCP2 dans la réponse au stress a été très peu étudié et reste à être élucidé.

En ce sens, nous avons (i) regardé la distribution de l'ARN messager d'*Ucp2* dans l'axe hypothalamo-hypophysaire-corticosurrénalien (hypothalamic-pituitary-adrenal — HPA), (ii) évalué les effets du stress sur l'expression d'*Ucp2* et l'activation des neurones exprimant UCP2 et (iii) utilisé un modèle de souris déficiente en *Ucp2* (*Ucp2* KO) afin d'évaluer la réponse au stress en l'absence d'*Ucp2*. Le stress consistait en une heure de course forcée sur tapis roulant (stress aigu) ou 21 jours de stress de course à raison d'une heure par jour (stress chronique).

*Ucp2* est exprimée en abondance dans l'axe HPA, plus précisément dans le noyau paraventriculaire (PVH), l'adénohypophyse et les surrénales. Plusieurs régions du cerveau où l'on retrouve l'ARNm d'*Ucp2*, telles le PVH, le noyau arqué (ARC) et le noyau supra-chiasmatique (SCN), co-expriment le marqueur d'activité neuronale *c-fos* suite au stress. L'ARC et le SCN présentent aussi une augmentation de l'expression d'*Ucp2* suivant une heure de stress. Cette augmentation se retrouve aussi dans les surrénales. Aucune différence n'a été mesurée dans la réponse au stress entre les souris *Ucp2* KO et WT.

Notre étude montre qu'*Ucp2* est présent et modulé dans les différents segments de l'axe HPA. L'utilisation du stress de course n'a pas démontré de différence dans la sécrétion de corticostérone et l'activation des neurones à CRF chez les souris *Ucp2* KO comparativement aux WT.

## 2.2. Abstract

The uncoupling protein 2 (UCP2) is found in several tissues and has been reported to reduce reactive oxygen species (ROS) production and to play a role in the regulation of energy homeostasis. *Ucp2* is also expressed in many brain regions involved in the stress response, but its implication in those regions is not well established. The present study was conducted to investigate the role of UCP2 in the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) and the stress response. Our study presents i) the distribution of *Ucp2* mRNA in the HPA axis ii) the effect of stress on *Ucp2* expression and activated neurons that express *Ucp2* and, iii) the stress response in *Ucp2* deficient mice (*Ucp2* KO) to evaluate whether or not the absence of UCP2 affects the stress response in mice. One hour (acute stress) or 21 day (chronic stress) of treadmill running was used to stress the mice. We found that *Ucp2* was highly expressed in the paraventricular nucleus (PVH) and adenohypophysis as demonstrated by *in situ* hybridization. Several regions where *Ucp2* mRNA was found, such as the PVH, arcuate nucleus (ARC) and suprachiasmatic nucleus (SCN), co-expressed the neuronal activity marker *c-fos*. The ARC and the SCN also showed an increased in *Ucp2* expression following a bout of exercise. *Ucp2* surexpression was also found in adrenal gland. No difference was detected in *Ucp2* KO compared to wildtype (WT) mice in the corticosterone levels following the treadmill running stress. We have shown here that *Ucp2* is expressed in abundance in the HPA axis and that some brain regions expressing *Ucp2* are activated and present an increase in *Ucp2* expression after the stress.



### 2.3. Introduction

Uncoupling protein 2 (UCP2) is a member of the uncoupling proteins family with 55% amino acid identity with UCP1. Whereas UCP1 is present only in brown adipose tissue (BAT), UCP2 has a ubiquitous expression in rodents being expressed in several tissues [35]. *Ucp2* mRNA expression is particularly elevated in the brain, where it is found in specific nuclei [44]. The few investigations aimed at exploring the function of brain UCP2, have suggested a role for this protein in neuroprotection [51, 53, 83, 96], glucose sensing, [84] and the activation of neuropeptide Y (NPY)/ agouti-related peptide (AgRP) neuron [86].

Recently, it was suggested that UCP2 could play a role in the response to stress. In fact, an increase in the anxiety/depression-like behaviour was observed in the absence of UCP2 [93, 94]. That UCP2 be involved in stress is also supported anatomically as *Ucp2* mRNA is expressed in the corticotropin-releasing factor (CRF) neurons of the parvocellular division of the paraventricular hypothalamic nucleus (PVH), whose role in stress is acknowledged. PVH CRF neurons are highly activated in response to stressful events [97-100] and trigger the release of the adrenocorticotrophic hormone (ACTH), which, via the circulation, leads to the secretion of the adrenal corticosteroids. That UCP2 modulates the hypothalamic-pituitary axis remains to be elucidated.

The aim of the present study was to further investigate the potential role of UCP2 in the HPA axis response led to by a stressful condition. Wildtype and *Ucp2* knockout mice were subjected to forced treadmill running, a stressful event in laboratory rodents [97] and examined the expression of *Ucp2* mRNA in the brain and HPA axis structures stimulated by stress and the HPA axis function following exposure to running

## 2.4. Methods

### 2.4.1. Animals

C57BL/6 WT and *Ucp2*-deficient KO female mice on a 99% pure genetic background were used [53]. They were aged 8-10 weeks, weighted 18-21g. The mice were housed four per cage at  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  on a 12/12 h light/dark cycle. Mice had *ad libitum* access to chow food pellet and tap water. All animals were cared for and handled according to the Canadian Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

### 2.4.2. Acute treadmill protocol

Groups of WT and *Ucp2* KO female mice ( $n = 4-9$  per group) were killed either at rest (REST), immediately following treadmill running (RUN) or sixty minutes following treadmill running (POSTRUN). Two (2) days preceding the running session, all mice were accustomed to the to the motor-driven treadmill by being subjected to a running session of 10 minutes at the speed of 15 meters per minute. On the experimental day, mice were subjected to a running bout of 60 minutes. In contrast to rats, mice run well on a treadmill and they almost never undergo electrical shocks. An electrical stimulus from a shock grid however needs to be present to insure running.

### 2.4.3. Chronic treadmill protocol

Wildtype and *Ucp2* KO female mice ( $n=3-5$ ) were subjected to daily training session for 21 days. Mice were gradually (by increments of 15 minutes per day) accustomed to a 60 minute-training session. The speed of the treadmill was set at 15 meters per minute. At the end of the training period, mice were killed either immediately (RUN) or 60 minutes POSTRUN following the running session. A group of sedentary mice was also included as control (REST).

#### **2.4.4. Neuronal activation of UCP2 mRNA-expressing neurons**

Immunohistochemical detection of Fos, the protein encoded by the oncogene *c-fos*, was performed to determine the *Ucp2* mRNA expressing neurons activated by treadmill running. The double-labelling procedure is described below. Fos has been repeatedly and reliably used to assess neuronal activity in rats and mouse [97, 101-104].

#### **2.4.5. Brain Preparation**

Brains were prepared as previously described [105]. Briefly, mice were anesthetised with 0,4 ml of a ketamine/xylazine. Intracardiac blood was rapidly collected and mice were perfused intracardially 2 minutes with ice-cold isotonic saline followed by 10 minutes of a paraformaldehyde (4%)-Borax solution. The brain was removed at the end of the perfusion and kept in paraformaldehyde for an additional period of 48 hours. They were then transferred to a solution containing paraformaldehyde and sucrose (10%) before being cut 24 h later using a sliding microtome (Histoslide 2000, Reichert-Jung). 25- $\mu$ m-thick sections were collected and stored at  $-30^{\circ}\text{C}$  in a cold sterile cryoprotecting solution containing sodium phosphate buffer (50 mM), ethylene glycol (30%) and glycerol (20%).

#### **2.4.6. In situ hybridization**

In situ hybridization was used to localize and quantify UCP2 mRNA in the brain, pituitary and adrenal gland. The protocol used was largely adapted from the technique described by Simmons et al [106]. Briefly, brain slides were mounted on poly-L-lysine coated slides and allow to desiccate in 95% ethanol prior to *in situ* hybridization procedures. Slides were dried and then fixed for 20 minutes in paraformaldehyde (4%), digested for 30 min at  $37^{\circ}\text{C}$  with proteinase K (10 mg/ml in 100 mM Tris-HCl containing 50 mM EDTA, pH 8.0), acetylated with acetic anhydride (0.25% in 0.1 M triethanolamine, pH 8.0) and dehydrated through graded concentrations (50, 70, 95 and 100%) of ethanol. After vacuum drying for at least 2 h, 100  $\mu$ l of hybridization mixture, which contains an antisense 35S-

labeled cRNA probe ( $10^7$  c.p.m./ml), were spotted on each slide. Slides were sealed under a cover slip and incubated overnight at 60°C in a slide warmer. The next day, the cover slips were removed and the slides rinsed four times with 4X SSC (0.6M NaCl, 60mM sodium citrate buffer, pH 7). They were digested for 30 min at 37°C with RNAase-A (20 mg/ml in 10mM Tris – 500mM NaCl containing 1mM EDTA), washed in descending concentrations of SSC (2X, 10 min; 1X, 5 min; 0.5X, 5 min; 0.1X, 30 min at 60°C), and dehydrated through graded concentrations (50, 70, 95 and 100%) of ethanol. After a 2-h period of vacuum drying, the slides were exposed on an X-ray film (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) for 24 h. Once removed from the autoradiography cassettes, slides were defatted in toluene and dipped in NTB2 nuclear emulsion (Eastman Kodak). They were exposed for 7 days, before being developed in D19 developer (Eastman Kodak) for 3.5 min at 14°C and fixed in rapid fixer (Eastman Kodak) for 5 min. Finally, tissues were rinsed in running distilled water for 1–2 h, counterstained with thionin (0.25%), dehydrated through graded concentrations of ethanol, cleared in toluene and coverslipped with DPX.

#### **2.4.7. Double-labelling procedures**

Brain sections were first processed for immunochemical detection of Fos using a conventional avidin-biotin-immunoperoxidase method. Briefly, the brain slices were washed in sterile 0.05 M potassium phosphate-buffered saline (KPBS, pH 7.2) that was treated with diethyl pyrocarbonate (DEPC) water. They were then incubated for 24 h at 4 °C with a Fos antibody (rabbit polyclonal IgG, Oncogene Science, NY). The Fos antibody was used at a 1:50 000 dilution in KPBS (50 mM) with heparin (0.25%), Triton X-100 (0.4%) and bovine serum albumin (2%). Twenty-four hours following incubation at 4 °C with the first antibody, the brain slices were rinsed in sterile KPBS and incubated with a mixture of KPBS, Triton X-100, heparin, and biotinylated goat antirabbit IgG (1:1500 dilution; Vector Laboratories, CA) for 60 min. Sections were then rinsed with KPBS and incubated at room temperature for 60 min with an avidin-biotin peroxidase (ABC) complex (Vectastain ABC Elite Kit, Vector Laboratories, CA). After several rinses in sterile KPBS, the brain slices were allowed to react in a mixture containing sterile KPBS, the chromagen 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, 0.05%), and 1% hydrogen peroxide.

Thereafter, tissues were rinsed in sterile KPBS, mounted onto poly L-lysine-coated slides, desiccated overnight under vacuum. The immunolabelling was followed by the *in situ* hybridization as described above. All procedures were the same, except for the dehydration step, which was shortened to prevent the decolorization of Fos-immunoreactive (Fos-ir) cells, and the coloration with thionin, which was avoided.

#### **2.4.8. Antisense 35S-Labeled cRNA Probes**

The *Ucp2* cRNA probe was generated from the 945 bp EcoRI fragment of a mouse *Ucp2* cDNA subcloned into a pSELECT vector (Promega, Inc. Lyon, France), which was linearized with KpnI (Pharmacia Biotech Canada Inc., Baie d'Urfe, Canada) for antisense probe. The corticotrophin-releasing factor (*Crf*) cRNA probe was generated from the EcoRI fragment of a rat *Crf* cDNA (Dr K. Mayo, North-western University, Evanston, IL), subcloned into pGem-4 plasmid (Stratagene, La Jolla, CA). Radioactive riboprobes were synthesized by incubation of 250 ng linearized plasmid in 10 mM NaCl, 10 mM dithiothreitol, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM Tris (pH 7.9), 0.2 mM ATP/GTP/CTP, α-<sup>35</sup>S-UTP, 40 U RNase inhibitor (Promega, Madison, WI), and 20 U of RNA polymerase (SP6 or T7 for antisense and sense probes, respectively) for 60 min at 37°C. The DNA templates were treated with 100 μL of DNase solution (1 μL DNase, 5 mL of 5 mg/mL tRNA, 94 μL of 10 mM Tris/10 mM MgCl<sub>2</sub>). The preparation of the riboprobes was completed through an extraction with the RNeasy Mini Kit (Qiagen inc., Mississauga, ON, Canada) eluted in 150 μL of RNase free 10 mM Tris/1 mM EDTA and incorporated in a hybridization solution containing (per mL) 107 cpm of <sup>35</sup>S probe, 52% formamide, 330 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA, pH 8, 1X Denhart's solution, 10% dextran sulfate, 0.5 mg/mL tRNA, 10 mM 1,4-dithiothreitol and diethyl pyrocarbonate-treated water. This solution was mixed and heated at 65°C before being spotted on slides. The specificity of the probe was confirmed by the absence of positive signal in sections hybridized with sense probe.

#### **2.4.9. Quantitative analysis of the hybridization signals**

Hybridization signals revealed on NTB2 dipped nuclear emulsion slides were analyzed and quantified under a light microscope (Olympus, BX51) equipped with a video camera (Olympus, Evolution Qei monochrome) coupled to a PC computer using Image-Pro Plus (version 5.0). Measurements of the pixel density of the mRNA hybridization signal were performed on both hemispheres of 2-4 coronal brain sections for each animal under dark-field illumination at a magnification of 20X. The pixel density for each specific region was corrected by subtraction of the background reading taken from areas immediately surrounding the region analysed.

#### **2.4.10. Quantitative analysis of double-labelling**

To quantified double labelling cells, the number and the proportion (number of cells double-labelling / number of total Fos-ir cells x 100) of cells expressing Fos and UCP2 mRNA or Fos and CRF mRNA were determined. Measurements were performed under bright-field illumination using a microscope (Olympus, BX51) equipped with a video camera (Olympus, Evolution Qei monochrome) coupled to a PC computer using Image-Pro Plus (version 5.0). Cells were count on both hemispheres of 2-4 coronal brain sections for each animal.

#### **2.4.11. Plasma determinations**

Blood was harvested by cardiac puncture, centrifuged (1500 x g, 15 min at 4 °C), and the separated plasma was stored at -20 °C until later biochemical measurements. Plasma glucose concentrations were measured with a glucose analyzer (Beckman Instruments, Carlsbad, CA). Plasma insulin and corticosterone was determined by RIA using a reagent kit from Linco Research (St. Charles, MO).

#### **2.4.12. Statistical analyses**

Statistical analyses were done with GraphPad Prism software 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Results are presented as mean values  $\pm$  SEM. For the effect of acute treadmill on *Ucp2* mRNA expression, statistical differences between groups were determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni's multiple comparisons test. For the acute and chronic treadmill protocol using *Ucp2* KO mice, two-way ANOVA followed by an unpaired t-test was used.

### **2.5. Results**

#### **2.5.1. Distribution of UCP2 in the HPA axis**

As depicted in figure 1, *Ucp2* mRNA expression was seen in every component of the HPA axis, namely the PVH (figure 1A), the pituitary gland (figure 1B) and the adrenal gland (figure 1C). In the PVH, the hybridization signal was particularly abundant in the parvocellular part of PVH, which is known to contain corticotropin-releasing factor (CRF)-producing cells. In the pituitary, *Ucp2* mRNA was found in the anterior and intermediate lobes, but not in the posterior lobe. Finally, in the adrenal gland, *Ucp2* mRNA was expressed in adrenal medulla, where are found the catecholamine-secreting cells. *Ucp2* was also expressed in the cortex divided into three zones: the zona glomerulosa, which produces aldosterone and the deoxycorticosterone, the zona fasciculata and the zona reticularis, which are involved in corticosterone and androgen production in rodents.

#### **2.5.2. Activation of neurons expressing UCP2 mRNA following a stress**

Acute treadmill running led to an increase in Fos expression in hypothalamic and thalamic regions expressing *Ucp2*. The percentage of Fos-ir cells also expressing *Ucp2* mRNA has been estimated and is expressed in table 1. The highest percentages were seen in the arcuate nucleus (ARC) ( $71,6\% \pm 14,5$ ), the suprachiasmatic nucleus (SCN) ( $83,5\% \pm$

10,4) and the PVH ( $76,4\% \pm 11,9$ ). The colocalizations in those nuclei are illustrated in figure 2.

### **2.5.3. Variation of UCP2 mRNA following a stress**

After 60 minutes of treadmill running (POSTRUN mice), we observed significant increases (above rest) in *Ucp2* mRNA expressions in the SCN (figure 3A) and the ARC (figure 3C) as well as in the adrenal medulla (figure 4B) and adrenal cortex (figure 4C). There was no difference between groups in the PVH (figure 3B), pituitary (figure 4A) and other brain region presented in table 1 (data no shown).

### **2.5.4. Effects of acute and chronic stress on the HPA axis activity of UCP2 KO mice**

There was no difference in the HPA axis activity following treadmill running between WT and *Ucp2* KO mice. Post running corticosterone levels of WT and *Ucp2* KO mice were comparable, regardless of whether the animals were subjected to running for the first time or following a chronic adaptation (table 2 and 3). Additionally, the number of activated hypophysiotropic CRF cells following running was not different between WT and KO mice (figure 5B). The lack of *Ucp2* did not change metabolic parameters affected by stress (figure 6).



## 2.6. Discussion

The present study aimed at investigating the potential role of UCP2 on the HPA axis function in response to treadmill running, which represents a stressful condition in rodents [97, 107]. This response was primarily assessed by measuring, in *Ucp2* KO mice, the activated PVH CRF neurons and the circulating levels of corticosterone in response to a bout of treadmill running. Repeated treadmill running during 21 days was also used to evaluate the circulating levels of corticosterone and metabolic parameters in *Ucp2* KO mice. We examine the expression of *Ucp2* mRNA in the pituitary as well as in the adrenal gland and we counted the number of activated (expressing *Fos*) *Ucp2*-expressing neurons in regions showing *Fos* expression during the treadmill running. Acute and chronic treadmill running led to increases in corticosterone levels that were comparable in WT and *Ucp2* KO mice. The number of *Fos*-expressing PVH CRF cells in acute treated mice was also similar after one bout of exercise in WT and *Ucp2* KO mice. Chronic stress did not lead to difference in metabolic parameters in WT and *Ucp2* KO mice. WT mice exhibited treadmill-induced increases in *Ucp2* mRNA expression in the adrenal gland as well as in the ARC and SCN. We also observed high percentages (>50%) of activated *Ucp2*-expressing cells in the subthalamic nucleus (STN), PVH, ARC and SCN following running.

PVH CRF neurons express UCP2 and we found, in WT mice, that 76.4 % of the neurons expressing *Ucp2* mRNA in the PVH were stimulated following treadmill running. Similarly, UCP2 neurons in other brain regions were also stimulated by running. The percentage of the *Ucp2*-expressing cells in the ARC and SCN were 71.6 and 83.5 respectively. Given the neuroprotective role UCP2 [108], one can argue that UCP2 may help support the activity of the neurons stimulated by stressful conditions. This speculation is in line with the conclusion of other investigators [109, 110].

Treadmill running led to a significant increase of *Ucp2* mRNA expression in the SCN. This brain nucleus is involved in the regulation of several functions with circadian rhythms including the HPA axis activity [111]. In fact, mice with lesion of this nucleus

present a dysregulation of the HPA axis activity [112, 113]. The impact of an increase in *Ucp2* mRNA expression in this region following a treadmill running is not clear. However the demonstration of an increase in *Ucp2* mRNA in the SCN further links UCP2 to the multimodal control of the HPA axis activity. Treadmill running also led to an increase in *Ucp2* mRNA expression in the ARC, where UCP2 is expressed in neurons co-expressing neuropeptide (NPY) and agouti-related peptide (AgRP) [86] as well as in neurons expressing proopiomelanocortin (POMC) [84]. A role for UCP2 in the ARC activity has been suggested by Parton and colleagues [84], who demonstrated that the deletion of *Ucp2* prevented obesity-induced loss of glucose sensing in ARC POMC neurons. Also UCP2 seems capable of modulating NPY neuron activity in controlling the feeding response to fasting [86]. UCP2 is apparently involved in the way ghrelin acts at the level of the ARC NPY/AgRP neurons to affect feeding. The UCP2-dependent action of ghrelin on ARC NPY/AgRP neurons would be driven by a fatty acid oxidation pathway involving AMP kinase and the ROS that are scavenged by UCP2 [75, 114]. As suggested by others, the scavenging of ROS would be a way to protect the neurons involved in stress [83, 115, 116].

The lack of UCP2 did not change the corticosterone levels in response to treadmill running. The levels of corticosterone measured either immediately or 60 minutes following exercise were in fact comparable in wildtype and *Ucp2* KO mice regardless of whether the animals were subjected to a 60-minute bout of running for the first time or following 21 days of daily running. Previous investigations have produced contradictory results regarding stress-induced adrenal release of corticosterone. Gimsa U. *et al.* [94] have demonstrated that *Ucp2*-deficient mice were significantly more anxious at baseline and following an elevated plus maze (EPM) test. However, corticosterone was lower in *Ucp2* KO mice following a social disruption test plus EPM. The social disruption test alone affects corticosterone level similarly in *Ucp2* KO and WT mice. On the other hand, Sun X.L. *et al* [93] have reported a higher increase in corticosterone level in *Ucp2* KO mice compared to the WT following a chronic mild stress. Our results tend to indicate that *Ucp2* KO mice keep their capacity to secrete corticosterone. The nature of the stress chosen for an experiment (social or physical) seems to be an important factor to consider in the evaluation of stress response. Interestingly, *Ucp2* is also expressed in the zona fasciculata, where

corticosterone is produced, and in the zona reticularis, implicated in corticosterone and androgen production in rodents [117]. It is also expressed in the adrenal medulla, a region that secretes norepinephrine and epinephrine, crucial hormones mediating the “fight or flight” response following a stressful event [117] and in the zona glomeruloza, where the aldosterone and the deoxycorticosterone are produced [117]. Additionally, we demonstrated the expression of *Ucp2* mRNA in the anterior and intermediate part of the mice hypophysis with no expression of *Ucp2* mRNA expression in the posterior part of the gland, confirming results from others [118]. The anterior part of the pituitary, namely the adenohypophysis is known to produce and release growth hormone, sex hormones and ACTH. The expression of *Ucp2* mRNA in this part of the pituitary seems to be present in all cells, including POMC cells producing ACTH.

In summary, the results of the present study described for the first time the presence of *Ucp2* mRNA in each component of the HPA axis of mice. Additionally we demonstrated that *Ucp2* mRNA was highly expressed in HPA axis-linked brain regions and the expression was increased after an acute stress in the ARC and SCN as well as in the adrenal gland. However, we were not able to demonstrate any effect of the absence of *Ucp2* on HPA axis activity assessed by the of measurement plasma corticosterone levels following treadmill running. Altogether this study further documents the role of UCP2 in the response to stress.

1. Pecqueur, C., et al., *Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation*. J Biol Chem, 2001. **276**(12): p. 8705-12.
2. Richard, D., et al., *Distribution of the uncoupling protein 2 mRNA in the mouse brain*. J Comp Neurol, 1998. **397**(4): p. 549-60.
3. Conti, B., et al., *Uncoupling protein 2 protects dopaminergic neurons from acute 1,2,3,6-methyl-phenyl-tetrahydropyridine toxicity*. J Neurochem, 2005. **93**(2): p. 493-501.
4. Mattiasson, G., et al., *Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma*. Nat Med, 2003. **9**(8): p. 1062-8.
5. Arsenijevic, D., et al., *Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production*. Nat Genet, 2000. **26**(4): p. 435-9.
6. Clavel, S., et al., *Kainic acid upregulates uncoupling protein-2 mRNA expression in the mouse brain*. Neuroreport, 2003. **14**(16): p. 2015-7.
7. Parton, L.E., et al., *Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity*. Nature, 2007. **449**(7159): p. 228-32.
8. Coppola, A., et al., *A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2*. Cell Metab, 2007. **5**(1): p. 21-33.
9. Gimsa, U., et al., *Alterations in anxiety-like behavior following knockout of the uncoupling protein 2 (ucp2) gene in mice*. Life Sci. **89**(19-20): p. 677-84.
10. Sun, X.L., et al., *Uncoupling protein 2 knockout exacerbates depression-like behaviors in mice via enhancing inflammatory response*. Neuroscience. **192**: p. 507-14.
11. Timofeeva, E., Q. Huang, and D. Richard, *Effects of treadmill running on brain activation and the corticotropin-releasing hormone system*. Neuroendocrinology, 2003. **77**(6): p. 388-405.
12. Imaki, T., et al., *Early induction of c-fos precedes increased expression of corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid in the paraventricular nucleus after immobilization stress*. Endocrinology, 1992. **131**(1): p. 240-6.
13. Imaki, T., et al., *Differential regulation of corticotropin-releasing factor mRNA in rat brain regions by glucocorticoids and stress*. J Neurosci, 1991. **11**(3): p. 585-99.
14. Harbuz, M.S. and S.L. Lightman, *Responses of hypothalamic and pituitary mRNA to physical and psychological stress in the rat*. J Endocrinol, 1989. **122**(3): p. 705-11.
15. Baraboi, E.D., et al., *Brain activation following peripheral administration of the GLP-1 receptor agonist exendin-4*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. **301**(4): p. R1011-24.

16. Sagar, S.M., F.R. Sharp, and T. Curran, *Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level*. Science, 1988. **240**(4857): p. 1328-31.
17. Hoffman, G.E., M.S. Smith, and J.G. Verbalis, *c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems*. Front Neuroendocrinol, 1993. **14**(3): p. 173-213.
18. Fujihara, H., et al., *Robust up-regulation of nuclear red fluorescent-tagged fos marks neuronal activation in green fluorescent vasopressin neurons after osmotic stimulation in a double-transgenic rat*. Endocrinology, 2009. **150**(12): p. 5633-8.
19. Timofeeva, E. and D. Richard, *Functional activation of CRH neurons and expression of the genes encoding CRH and its receptors in food-deprived lean (Fa/?) and obese (fa/fa) Zucker rats*. Neuroendocrinology, 1997. **66**(5): p. 327-40.
20. Simmons DM, Arriza JL, and S. LW, *A Complete protocol for in situ hybridization of messenger RNA in brain and other tissues with radiolabeled single-stranded RNA probes*. J Histotech, 1989. **12**: p. 169-181.
21. Yanagita, S., et al., *Effects of spontaneous and forced running on activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons in rats*. Life Sci, 2007. **80**(4): p. 356-63.
22. Paradis, E., et al., *Uncoupling protein 2: a novel player in neuroprotection*. Trends Mol Med, 2003. **9**(12): p. 522-5.
23. Andrews, Z.B., S. Diano, and T.L. Horvath, *Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: in support of function and survival*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(11): p. 829-40.
24. Andrews, Z.B., et al., *Ghrelin promotes and protects nigrostriatal dopamine function via a UCP2-dependent mitochondrial mechanism*. J Neurosci, 2009. **29**(45): p. 14057-65.
25. Son, G.H., S. Chung, and K. Kim, *The adrenal peripheral clock: glucocorticoid and the circadian timing system*. Front Neuroendocrinol. **32**(4): p. 451-65.
26. Kawamura, H. and N. Ibuka, *The search for circadian rhythm pacemakers in the light of lesion experiments*. Chronobiologia, 1978. **5**(1): p. 69-88.
27. Weaver, D.R., *The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective*. J Biol Rhythms, 1998. **13**(2): p. 100-12.
28. Andrews, Z.B., et al., *UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals*. Nature, 2008. **454**(7206): p. 846-51.
29. Nakazato, M., et al., *A role for ghrelin in the central regulation of feeding*. Nature, 2001. **409**(6817): p. 194-8.
30. Sullivan, P.G., et al., *Mitochondrial uncoupling protein-2 protects the immature brain from excitotoxic neuronal death*. Ann Neurol, 2003. **53**(6): p. 711-7.
31. Deierborg, T., et al., *Overexpression of UCP2 protects thalamic neurons following global ischemia in the mouse*. J Cereb Blood Flow Metab, 2008. **28**(6): p. 1186-95.

32. Kemppainen, R.J. and E.N. Behrend, *Adrenal physiology*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 1997. **27**(2): p. 173-86.
33. Diano, S., et al., *Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in the nonhuman primate brain and pituitary*. Endocrinology, 2000. **141**(11): p. 4226-38.

## 2.7. Figures and tables

**Figure 1.** Distribution of *Ucp2* mRNA in the HPA axis. Darkfields photomicrographs of A) the parvicellular part of the paraventricular nucleus (PVHp), B) the pituitary gland, and C) the adrenal gland, hybridized with radiolabelled antisense cRNAs complementary to mice *Ucp2* mRNA. 3V: third ventricle; PP: posterior pituitary; IP: intermediary pituitary; AP: anterior pituitary; ZG: zona glomerulosa (cortex); ZF: zona fasciculata; ZR: zona reticularis; M: medulla.

**Figure 2.** Bright-field photomicrographs of fos-ir / *Ucp2* mRNA co-expression after 1h of treadmill running. Panels A and B represents the suprachiasmatic nucleus (SCN); C and D the parvicellular part of the paraventricular nucleus (PVHp); E and F the arcuate nucleus (ARC). Black arrows indicate the co-localization between fos-ir (brown staining) and *Ucp2* mRNA (silver grains).

**Figure 3.** Intensity signal *Ucp2* mRNA hybridization in mice at rest (**REST**), immediately after 1h of treadmill running (**RUN**) or 1h following the end of the treadmill running (**POST-RUN**). *Ucp2* mRNA was measured in A) the suprachiasmatic nucleus (SCN), B) the paraventricular hypothalamic nucleus (PVH) and C) the arcuate nucleus (ARC). Data are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 4-9). \* p<0.05, Significantly different from resting group.

**Figure 4.** Relative expression (% of REST) of the hybridization signal of *Ucp2* mRNA in mice at rest (**REST**), immediately after 1h of treadmill running (**RUN**) or 1h following the end of the treadmill running (**POST-RUN**). *Ucp2* mRNA was measured in A) pituitary, B) adrenal medulla, and C) adrenal cortex. Data are shown as mean  $\pm$  SEM (n = 4-9). \* p<0.05, Significantly different from resting group.

**Figure 5.** Food intake (A) and number of cells present in the PVN that co-expressed fos-ir and *Crf* mRNA (B) in *Ucp2* deficient mice (KO) compared to wild type (WT) mice at rest (**REST**), immediately after 1h of treadmill running (**RUN**) and 1h after the end of treadmill running (**POST-RUN**). Data are shown as mean  $\pm$  SEM. (n = 4-9). \*P<0.001: significantly different from REST group (WT and UCP2 KO pool).

**Figure 6.** Effect of chronic stress on body weight gain (A), food intake (B), food efficiency (C), fat mass (D) and lean mass (E) in WT (white bar) or *Ucp2* KO (black bar) mice. Mice were stress 1 hour per day by treadmill running for 21 days (**RUN**) or were at rest (**REST**). Data are shown as mean  $\pm$  SEM (n=3-5).



Figure 1.

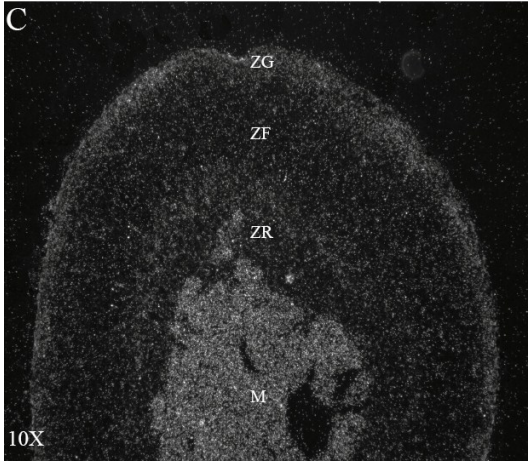
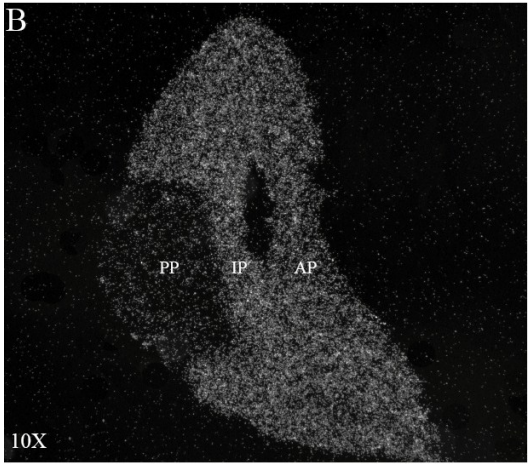
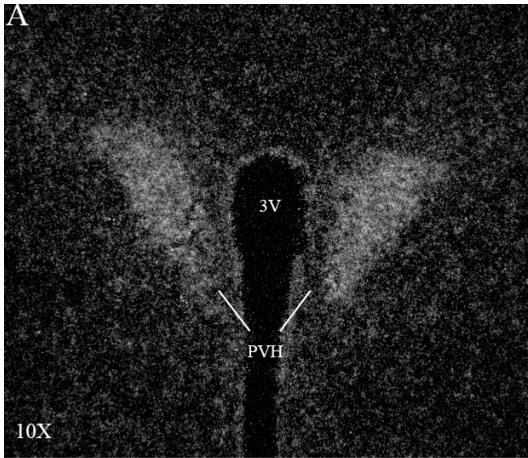
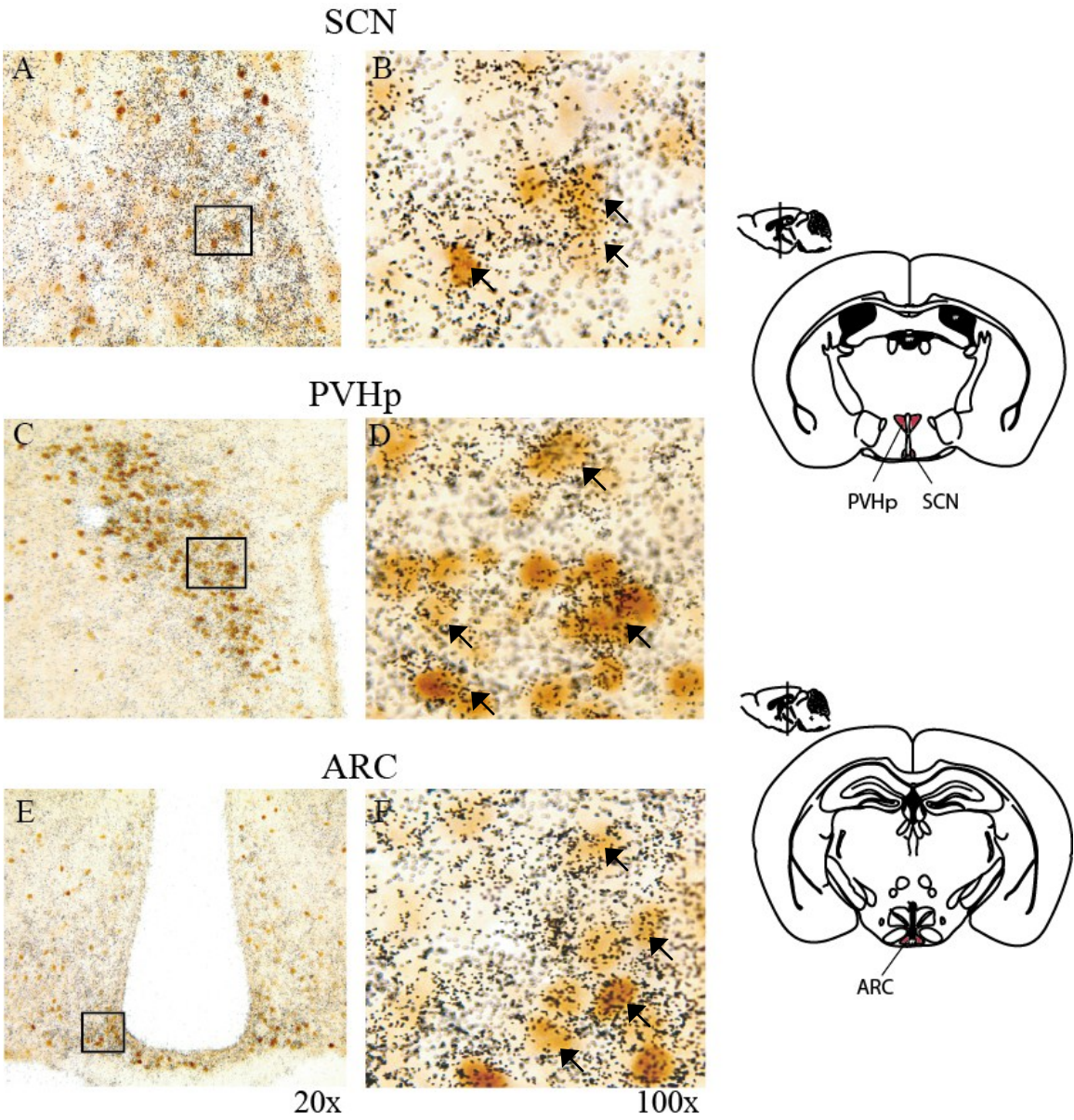


Figure 2.



**Figure 3.**

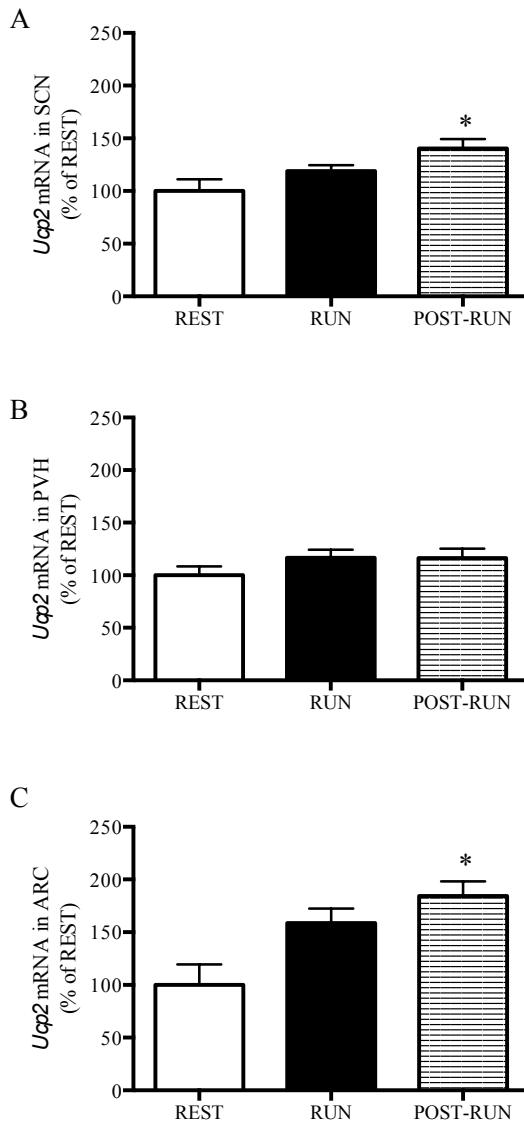
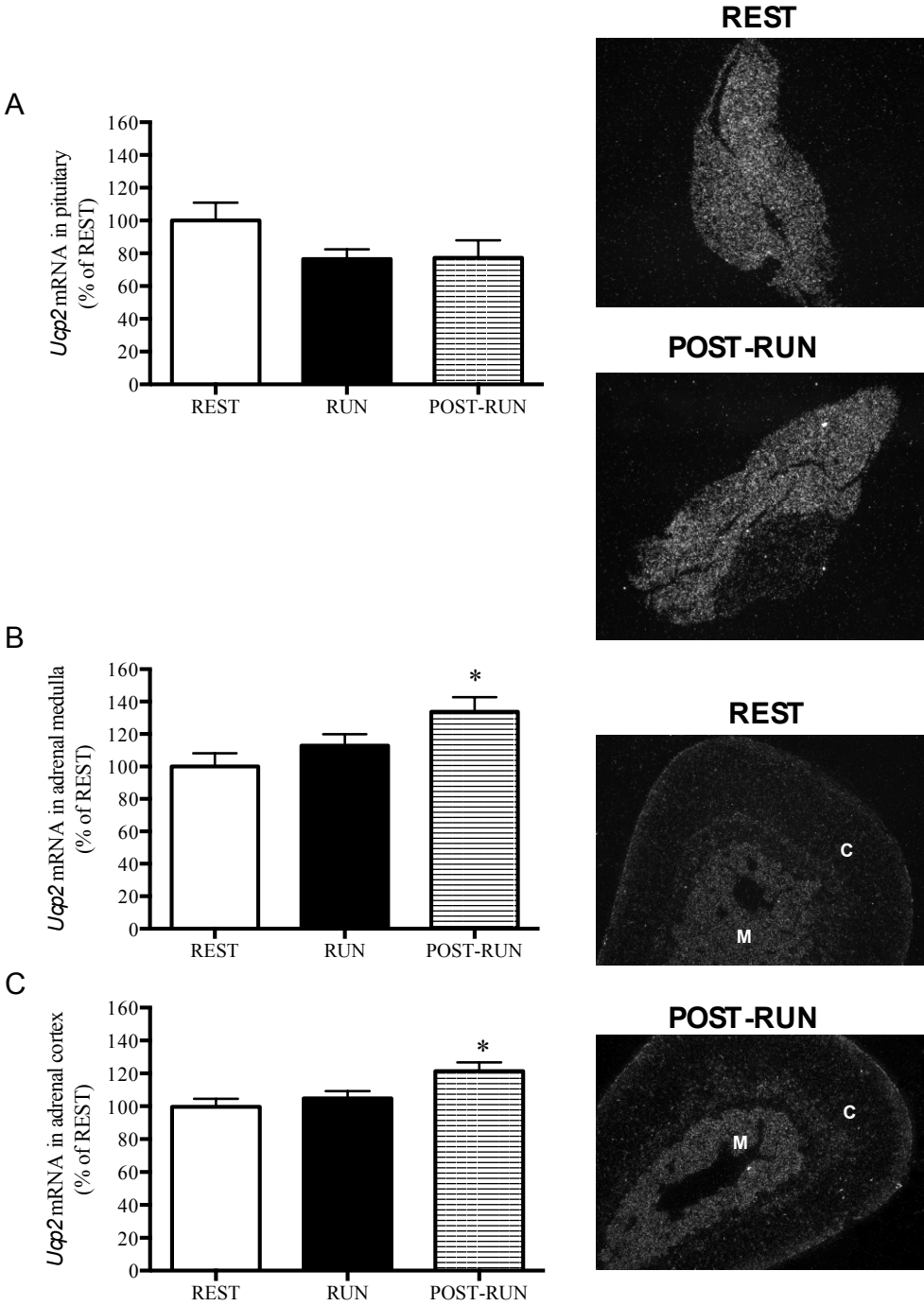


Figure 4.



**Figure 5.**

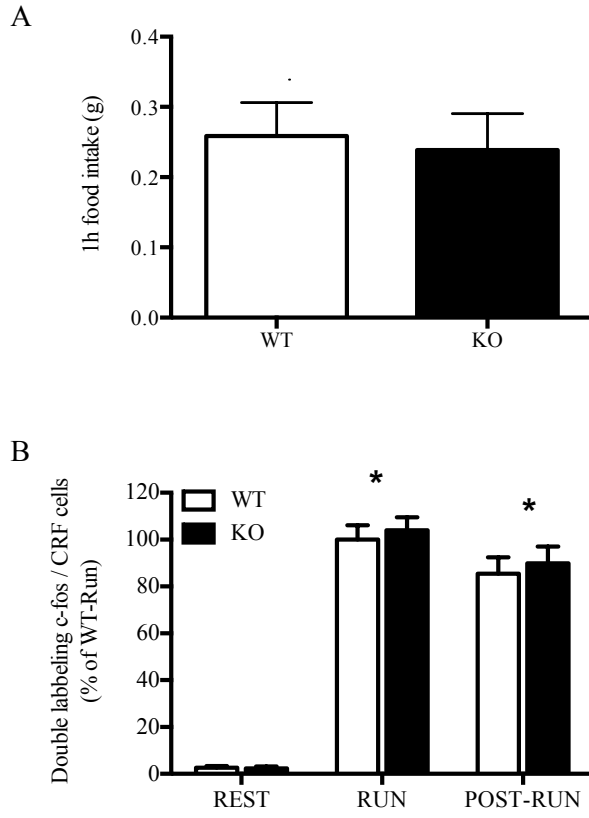
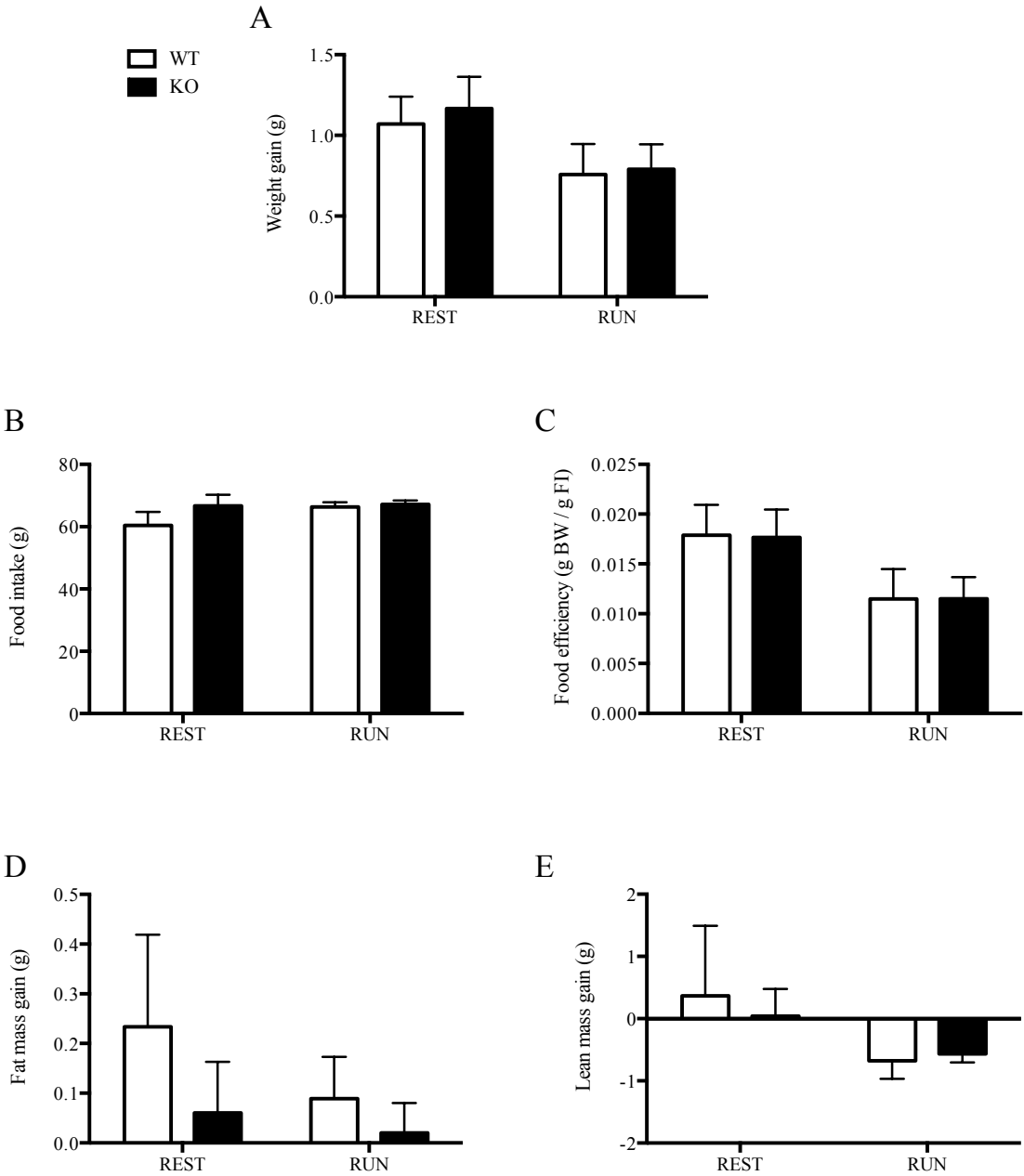


Figure 6.



**Table 1.** Number (n) and proportion (%) of cells expressing Fos and *Ucp2* mRNA after 1h of treadmill running

	n	%
<b><u>Thalamus</u></b>		
<b>Dorsal Thalamus:</b>		
Submedial thalamic nucleus <b>STN</b>	124,6 ± 3,7	57,2 ± 12,9
<b><u>Hypothalamus</u></b>		
<b>Periventricular zone of the hypothalamus:</b>		
Parvicellular part of paraventricular nucleus <b>PVNp</b>	152,2 ± 0,6	76,4 ± 11,9
Arcuate hypothalamic nucleus <b>Arc</b>	63,4 ± 11,7	71,6 ± 14,5
Dorsomedial hypothalamic nucleus <b>DM</b>	106,0 ± 21,6	15,2 ± 3,6
<b>Medial zone of the hypothalamus:</b>		
Ventromedial preoptic nucleus <b>VMPO</b>	70,5 ± 13,5	46,9 ± 37,3
Anteroventral periventricular nucleus <b>AVPe</b>	55,2 ± 28,7	48,3 ± 9,6
Suprachiasmatic nucleus <b>SCN</b>	107,9 ± 9,9	83,5 ± 10,4
Supramammillary nucleus <b>SuM</b>	200,3 ± 64,9	16,9 ± 3,6

Data represent mean ± SEM (n = 3)

**Table 2.** Values for plasma glucose, insulin and corticosterone in *Ucp2* deficient mice (KO) at rest (**REST**), immediately after 1h of treadmill running (**RUN**) and 1h after the end of treadmill running (**POST-RUN**).

		WT	<i>Ucp2</i> KO
Insulin (nmol/l)	REST	34.3 ± 6.9	29.5 ± 4.5
	RUN	17.4 ± 2.3*	14.9 ± 1.5*
	POST-RUN	60.4 ± 10.8	53.4 ± 10.9
Glucose (mmol/l)	REST	10.5 ± 0.8	10.6 ± 0.6
	RUN	12.9 ± 0.4*	11.9 ± 0.7
	POST-RUN	12.0 ± 0.5	11.7 ± 0.5
Corticosterone (µmol/l)	REST	140.0 ± 21.2	98.1 ± 30.2
	RUN	704.5 ± 47.9***	719.6 ± 61.0***
	POST-RUN	356.3 ± 79.2*	328.3 ± 48.7**

Data represent mean ± SEM (n = 8-9). Unpaired t-test was used to compare each group.

Significantly different from REST group: \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\*P<0,0001



**Table 3.** Values for plasma glucose, insulin and corticosterone in *Ucp2* deficient mice (KO) after 21 days of stress. Mice were sacrificed at rest (**REST**), immediately after 1h of treadmill running (**RUN**) and 1h after the end of treadmill running (**POST-RUN**).

		WT	<i>Ucp2</i> KO
Insulin (nmol/l)	REST	52.5 ± 8.9	41.9 ± 9.0
	RUN	26.4 ± 1.2*	19.1 ± 2.9*
	POST-RUN	32.9 ± 3.7	32.2 ± 3.4
Glucose (mmol/l)	REST	9.9 ± 0.9	9.6 ± 0.6
	RUN	11.4 ± 1.4	10.6 ± 0.8
	POST-RUN	9.6 ± 0.7	9.7 ± 0.4
Corticosterone (µmol/l)	REST	165.9 ± 44.9	228.3 ± 38.7
	RUN	1182.3 ± 156.2***	921.3 ± 130.1***
	POST-RUN	225.8 ± 32.9	150.4 ± 22.7

Data represent mean ± SEM (n = 3-5). Unpaired t-test was used to compare each group. Significantly different from REST group: \* P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\* P<0.001



## 3. Chapitre 3

### 3.1. Discussion générale et conclusions

La protéine découplante 2 a été largement étudiée dans les 15 dernières années. Élucider son rôle fondamental n'est pas une tâche facile. De fait, UCP2 est une protéine distribuée de façon ubiquitaire chez les rongeurs et possède une demi-vie très courte [45]. De plus, elle est impliquée dans la régulation fine des ROS [12, 53, 74], un système ardu à étudier. Finalement, sa détection dans les tissus n'est pas simple du au manque de spécificité des anticorps existants. L'utilisation de modèles KO et de surexpression sont venus élucider plusieurs questions sur le rôle de cette protéine [61, 76, 84, 119, 120]. En effet, la soumission de ces souris à divers traitements ou pathologies a permis de montrer, entre autres, l'importance d'UCP2 dans la régulation des ROS [12], la modulation du métabolisme du glucose et des lipides [52], le contrôle de la sécrétion de l'insuline [53, 54], la défense immunitaire [53, 54] et le développement de plusieurs pathologies dont l'athérosclérose [55] et le cancer [56]. Une voie encore très peu étudiée est l'implication d'UCP2 dans la réponse au stress. Deux groupes ont à ce jour étudié l'effet du stress chez les souris *Ucp2* KO [93, 94]. La présence d'*Ucp2* en abondance dans le PVH, et plus spécifiquement dans les cellules produisant le CRF, a été l'élément clé nous amenant à l'investigation du rôle d'UCP2 dans l'axe HHA et le stress. Dans l'étude présentée ici, nous avons regardé l'implication potentielle d'UCP2 dans la régulation de l'axe HPA.

Afin d'explorer l'implication d'UCP2 dans l'axe HPA, nous avons utilisé un protocole de course sur tapis roulant, lequel est bien connu pour ces effets stressants [97]. L'utilisation des souris *Ucp2* KO nous a permis de regarder l'effet du stress sur les niveaux de corticostérone circulant et l'activation des cellules à CRF du PVH en l'absence d'UCP2. La coexpression d'*Ucp2* et du marqueur d'activité neuronal Fos, ainsi que l'expression d'*Ucp2* dans les différentes zones de l'axe HPA ont été mesurées suivant le stress de course. La course aigue et chronique induit une forte élévation de la corticostérone circulante. Celle-ci était similaire chez les souris *Ucp2* KO et WT, tout comme l'activation neuronale des cellules à CRF du PVH. Bien que le stress chronique ait diminué quelque peu

le gain de poids et de masse maigre, cette différence était aussi similaire chez nos souris WT et KO. Chez les souris WT, le stress de course induit une surexpression d'*Ucp2* dans l'ARC, le SCN ainsi que dans les glandes surrénales. Nous avons aussi observé une forte présence de cellules activées exprimant *Ucp2* dans plusieurs régions de l'hypothalamus telles le PVH (76,4%), le SCN (83,5%) et l'ARC (71,6%).

Le SCN et les surrénales sont des régulateurs du cycle circadien de l'axe HPA [121]. La lésion de ce noyau cause un dérèglement du cycle circadien de l'axe HPA [112, 113]. L'implication d'UCP2 dans la régulation du cycle circadien n'a pas été explorée dans le cadre de nos études. Le stress de course a aussi augmenté l'expression de l'ARNm d'*Ucp2* dans le noyau arqué, où *Ucp2* est retrouvé dans les neurones orexigéniques NPY/AgRP [86] et anorexigéniques POMC [84]. Il a été rapporté qu'UCP2 pourrait moduler l'activité des neurones NPY en réponse à un jeûne [86]. L'absence d'UCP2 préviendrait la perte de sensibilité des neurones POMC au glucose induite par l'obésité [84].

L'absence de différence entre nos deux génotypes peut être expliquée par plusieurs hypothèses. Deux études utilisant le stress chez les souris *Ucp2* KO démontrent des résultats plutôt contradictoires [93, 94]. Gimsa U. et al. [93] ont démontré que les souris déficientes en *Ucp2* étaient plus anxieuses, mais avaient des niveaux de corticostérone circulant plus faibles suivant un stress social ajouté à un test d'anxiété. D'autre part, Sun X.L. [92] ont rapporté qu'un stress chronique non prédit amenait des niveaux plus élevés de corticostérone chez les souris *Ucp2* KO. Quant à nous, nous n'avons trouvé aucune différence dans les niveaux de corticostérone chez les souris *Ucp2* KO comparativement aux WT. Il semble donc que le choix du stress (aigu ou chronique, physique ou social) ait une grande importance dans l'évaluation de la réponse au stress.

Dans le cas de notre étude, on ne peut pas exclure la possibilité d'un mécanisme compensatoire. Le cerveau présente une expression de deux analogues à UCP2 :UCP4 et 5 [122], qui pourraient être surexprimées chez nos KO et permettre de compenser l'absence d'UCP2. Il est aussi possible que l'implication d'UCP2 dans l'axe HPA ne soit pas liée à la sécrétion du CRF, de l'ACTH ou de la corticostérone. Il est connu qu'UCP2 régule la

production de ROS [12]. L'augmentation de l'expression d'*Ucp2* pourrait être le résultat d'une activité cellulaire accrue et donc d'une augmentation de la production de ROS. UCP2 serait régulée afin de contrer cette augmentation. Finalement, l'utilisation de femelles pour un protocole de stress peut aussi avoir masqué nos effets. Ce phénomène a été vu dans le modèle de souris CB1R KO. Contrairement aux mâles, les femelles déficientes en CB1R ont une augmentation de la corticostérone similaire au souris WT 30 minutes suivant un stress de restriction [123]. Lors de nos études, l'utilisation de femelles était due à des contraintes de disponibilité d'animaux de la colonie.

Nous avons décrit ici la présence d'*Ucp2* dans les trois régions de l'axe HPA, soit le PVH, l'hypophyse et les surrénales. La présence d'*Ucp2* dans des régions du cerveau activées suite à un stress de course ainsi que l'augmentation de l'ARNm d'*Ucp2* dans l'ARC, les SCN, le cortex surrénalien et la médulla nous indique qu'UCP2 est potentiellement liée au système de stress. Le type de stress et le modèle de souris *Ucp2* KO utilisé dans cette étude ne sont pas parvenus à montrer un rôle d'UCP2 dans la régulation de l'axe HPA. Malgré cela, nous ne pouvons exclure la possibilité qu'UCP2 ait un rôle dans la régulation de l'axe HPA.

### 3.2. Perspectives

Cette étude nous a permis de démontrer la présence d'*Ucp2* dans l'axe HPA ainsi que la modulation de l'expression d'*Ucp2* suivant un stress aigu. Par contre, aucune différence n'a été vue chez les souris *Ucp2* KO versus les WT. Il serait intéressant de voir si les mâles *Ucp2* KO réagissent différemment des WT. Deux études publiées jusqu'à ce jour démontrent qu'UCP2 affecte la réponse au stress. Dans les deux cas, des mâles ont été utilisés [93, 94]. Les résultats de ces études étant contradictoires, il serait d'autant plus intéressant de reproduire notre stress de course chez des mâles. La surrénalectomie, l'injection de corticostérone ou l'utilisation de stress non prédits pourraient aussi être très intéressants à étudier chez nos souris *Ucp2* KO. La présence et l'augmentation de l'expression d'*Ucp2* dans le SCN et les surrénales peuvent indiquer un rôle d'UCP2 dans la

régulation circadienne de l'axe HPA. Cet aspect n'a pas été étudié dans le cadre de cet ouvrage mais présente un intérêt. Aucune étude n'a été publiée sur le rôle d'UCP2 dans le cycle circadien.

## Bibliographie

1. Lodish, H.F., *Molecular cell biology*. 4th ed. 2000, New York: W.H. Freeman. xxxix, 1084 p.
2. Mitchell, P., *Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism*. *Nature*, 1961. **191**: p. 144-8.
3. Brown, G.C., *Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells*. *Biochem J*, 1992. **284 ( Pt 1)**: p. 1-13.
4. Giacco, F. and M. Brownlee, *Oxidative stress and diabetic complications*. *Circ Res*. **107(9)**: p. 1058-70.
5. Liu, Y., G. Fiskum, and D. Schubert, *Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain*. *J Neurochem*, 2002. **80(5)**: p. 780-7.
6. Echtay, K.S., *Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role?* *Free Radic Biol Med*, 2007. **43(10)**: p. 1351-71.
7. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. *Physiol Rev*, 2002. **82(1)**: p. 47-95.
8. Schrauwen, P., et al., *Mitochondrial dysfunction and lipotoxicity*. *Biochim Biophys Acta*. **1801(3)**: p. 266-71.
9. Leloup, C., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion*. *Diabetes*, 2009. **58(3)**: p. 673-81.
10. Cross, R.L., *The mechanism and regulation of ATP synthesis by F1-ATPases*. *Annu Rev Biochem*, 1981. **50**: p. 681-714.
11. Hatefi, Y., et al., *Mitochondrial ATP-Pi exchange complex and the site of uncoupling of oxidative phosphorylation*. *Fed Proc*, 1975. **34(8)**: p. 1699-706.
12. Mailloux, R.J. and M.E. Harper, *Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production*. *Free Radic Biol Med*. **51(6)**: p. 1106-15.
13. Cannon, B. and J. Nedergaard, *Brown adipose tissue: function and physiological significance*. *Physiol Rev*, 2004. **84(1)**: p. 277-359.
14. Rabey, F.M., et al., *Influence of a novel inhibitor (UM8190) of prolylcarboxypeptidase (PRCP) on appetite and thrombosis*. *Curr Med Chem*. **19(24)**: p. 4194-206.
15. Foster, D.O. and M.L. Frydman, *Brown adipose tissue: the dominant site of nonshivering thermogenesis in the rat*. *Experientia Suppl*, 1978. **32**: p. 147-51.
16. Ricquier, D. and J.C. Kader, *Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976. **73(3)**: p. 577-83.
17. Ricquier, D., et al., *An immunological study of the uncoupling protein of brown adipose tissue mitochondria*. *Biochem J*, 1983. **210(3)**: p. 859-66.
18. Richard, D. and F. Picard, *Brown fat biology and thermogenesis*. *Front Biosci*. **16**: p. 1233-60.

19. Nedergaard, J., et al., *UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1504**(1): p. 82-106.
20. Sell, H., Y. Deshaies, and D. Richard, *The brown adipocyte: update on its metabolic role*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. **36**(11): p. 2098-104.
21. Enerback, S., et al., *Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese*. *Nature*, 1997. **387**(6628): p. 90-4.
22. Kozak, L.P. and M.E. Harper, *Mitochondrial uncoupling proteins in energy expenditure*. *Annu Rev Nutr*, 2000. **20**: p. 339-63.
23. Del Mar Gonzalez-Barroso, M., D. Ricquier, and A.M. Cassard-Doulicier, *The human uncoupling protein-1 gene (UCP1): present status and perspectives in obesity research*. *Obes Rev*, 2000. **1**(2): p. 61-72.
24. Enerback, S., *Brown adipose tissue in humans*. *Int J Obes (Lond)*. **34 Suppl 1**: p. S43-6.
25. Nedergaard, J., T. Bengtsson, and B. Cannon, *Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007. **293**(2): p. E444-52.
26. Cypess, A.M., et al., *Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(15): p. 1509-17.
27. Ouellet, V., et al., *Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans*. *J Clin Invest*. **122**(2): p. 545-52.
28. Fleury, C., et al., *Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia*. *Nat Genet*, 1997. **15**(3): p. 269-72.
29. Boss, O., et al., *Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression*. *FEBS Lett*, 1997. **408**(1): p. 39-42.
30. Rousset, S., et al., *The biology of mitochondrial uncoupling proteins*. *Diabetes*, 2004. **53 Suppl 1**: p. S130-5.
31. Skulachev, V.P., *Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics*. *Biochim Biophys Acta*, 1998. **1363**(2): p. 100-24.
32. Jezek, P., et al., *Mitochondrial uncoupling proteins--facts and fantasies*. *Physiol Res*, 2004. **53 Suppl 1**: p. S199-211.
33. Mao, W., et al., *UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells*, in *FEBS Lett* 1999. p. 326-30.
34. Sanchis, D., et al., *BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(51): p. 34611-5.
35. Pecqueur, C., et al., *Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(12): p. 8705-12.
36. Azzu, V. and M.D. Brand, *The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins*. *Trends Biochem Sci*. **35**(5): p. 298-307.
37. Laloi, M., et al., *A plant cold-induced uncoupling protein*. *Nature*, 1997. **389**(6647): p. 135-6.
38. Ricquier, D. and F. Bouillaud, *The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP*. *Biochem J*, 2000. **345 Pt 2**: p. 161-79.
39. Stuart, J.A., et al., *Uncoupling protein 2 from carp and zebrafish, ectothermic vertebrates*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1413**(1): p. 50-4.



40. van Wees, S.C., et al., *Characterization of the early response of Arabidopsis to Alternaria brassicicola infection using expression profiling*. Plant Physiol, 2003. **132**(2): p. 606-17.
41. Vercesi, A.E., et al., *Plant uncoupling mitochondrial proteins*. Annu Rev Plant Biol, 2006. **57**: p. 383-404.
42. Desikan, R., et al., *Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress*. Plant Physiol, 2001. **127**(1): p. 159-72.
43. Brandalise, M., et al., *Overexpression of plant uncoupling mitochondrial protein in transgenic tobacco increases tolerance to oxidative stress*. J Bioenerg Biomembr, 2003. **35**(3): p. 203-9.
44. Richard, D., et al., *Distribution of the uncoupling protein 2 mRNA in the mouse brain*. J Comp Neurol, 1998. **397**(4): p. 549-60.
45. Rousset, S., et al., *UCP2 is a mitochondrial transporter with an unusual very short half-life*. FEBS Lett, 2007. **581**(3): p. 479-82.
46. Giardina, T.M., et al., *Uncoupling protein-2 accumulates rapidly in the inner mitochondrial membrane during mitochondrial reactive oxygen stress in macrophages*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1777**(2): p. 118-29.
47. Yamada, M., et al., *Genomic organization and promoter function of the mouse uncoupling protein 2 (UCP2) gene*. FEBS Lett, 1998. **432**(1-2): p. 65-9.
48. Medvedev, A.V., et al., *Regulation of the uncoupling protein-2 gene in INS-1 beta-cells by oleic acid*. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 42639-44.
49. Affourtit, C. and M.D. Brand, *On the role of uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1777**(7-8): p. 973-9.
50. Busquets, S., et al., *Increased uncoupling protein-2 gene expression in brain of lipopolysaccharide-injected mice: role of tumour necrosis factor-alpha?* Biochim Biophys Acta, 2001. **1499**(3): p. 249-56.
51. Clavel, S., et al., *Kainic acid upregulates uncoupling protein-2 mRNA expression in the mouse brain*. Neuroreport, 2003. **14**(16): p. 2015-7.
52. Diano, S. and T.L. Horvath, *Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in glucose and lipid metabolism*. Trends Mol Med. **18**(1): p. 52-8.
53. Arsenijevic, D., et al., *Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production*. Nat Genet, 2000. **26**(4): p. 435-9.
54. Rousset, S., et al., *The uncoupling protein 2 modulates the cytokine balance in innate immunity*. Cytokine, 2006. **35**(3-4): p. 135-42.
55. Moukdar, F., et al., *Reduced antioxidant capacity and diet-induced atherosclerosis in uncoupling protein-2-deficient mice*. J Lipid Res, 2009. **50**(1): p. 59-70.
56. Derdak, Z., et al., *The mitochondrial uncoupling protein-2 promotes chemoresistance in cancer cells*. Cancer Res, 2008. **68**(8): p. 2813-9.
57. Negre-Salvayre, A., et al., *A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation*. Faseb J, 1997. **11**(10): p. 809-15.
58. Echtay, K.S., et al., *Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins*. Nature, 2002. **415**(6867): p. 96-9.
59. Pi, J., et al., *Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion*. Diabetes, 2007. **56**(7): p. 1783-91.

60. Robson-Doucette, C.A., et al., *Beta-cell uncoupling protein 2 regulates reactive oxygen species production, which influences both insulin and glucagon secretion*. Diabetes. **60**(11): p. 2710-9.
61. Zhang, C.Y., et al., *Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes*. Cell, 2001. **105**(6): p. 745-55.
62. Mailloux, R.J., et al., *Glutathionylation state of uncoupling protein-2 and the control of glucose-stimulated insulin secretion*. J Biol Chem. **287**(47): p. 39673-85.
63. De Souza, C.T., et al., *Inhibition of UCP2 expression reverses diet-induced diabetes mellitus by effects on both insulin secretion and action*. Faseb J, 2007. **21**(4): p. 1153-63.
64. Chan, C.B., et al., *Uncoupling protein 2 and islet function*. Diabetes, 2004. **53 Suppl 1**: p. S136-42.
65. Lowell, B.B. and G.I. Shulman, *Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes*. Science, 2005. **307**(5708): p. 384-7.
66. Boss, O., et al., *Tissue-dependent upregulation of rat uncoupling protein-2 expression in response to fasting or cold*. FEBS Lett, 1997. **412**(1): p. 111-4.
67. Davis, L.M., J.M. Rho, and P.G. Sullivan, *UCP-mediated free fatty acid uncoupling of isolated cortical mitochondria from fasted animals: correlations to dietary modulations*. Epilepsia, 2008. **49 Suppl 8**: p. 117-9.
68. Thompson, M.P. and D. Kim, *Links between fatty acids and expression of UCP2 and UCP3 mRNAs*. FEBS Lett, 2004. **568**(1-3): p. 4-9.
69. Garlid, K.D., M. Jaburek, and P. Jezek, *Mechanism of uncoupling protein action*. Biochem Soc Trans, 2001. **29**(Pt 6): p. 803-6.
70. Jaburek, M., et al., *Hydroperoxy fatty acid cycling mediated by mitochondrial uncoupling protein UCP2*. J Biol Chem, 2004. **279**(51): p. 53097-102.
71. Himms-Hagen, J. and M.E. Harper, *Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis*. Exp Biol Med (Maywood), 2001. **226**(2): p. 78-84.
72. Pecqueur, C., et al., *Uncoupling protein-2 controls proliferation by promoting fatty acid oxidation and limiting glycolysis-derived pyruvate utilization*. Faseb J, 2008. **22**(1): p. 9-18.
73. Sheets, A.R., et al., *Uncoupling protein-2 modulates the lipid metabolic response to fasting in mice*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008. **294**(4): p. G1017-24.
74. Bouillaud, F., *UCP2, not a physiologically relevant uncoupler but a glucose sparing switch impacting ROS production and glucose sensing*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1787**(5): p. 377-83.
75. Andrews, Z.B., et al., *UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals*. Nature, 2008. **454**(7206): p. 846-51.
76. Blanc, J., et al., *Protective role of uncoupling protein 2 in atherosclerosis*. Circulation, 2003. **107**(3): p. 388-90.
77. Emre, Y., et al., *Role of uncoupling protein UCP2 in cell-mediated immunity: how macrophage-mediated insulinitis is accelerated in a model of autoimmune diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(48): p. 19085-90.

78. Bechmann, I., et al., *Brain mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2): a protective stress signal in neuronal injury*. *Biochem Pharmacol*, 2002. **64**(3): p. 363-7.
79. Baffy, G., *Uncoupling protein-2 and cancer*. *Mitochondrion*. **10**(3): p. 243-52.
80. Richard, D., et al., *Brain distribution of UCP2 mRNA: in situ hybridization histochemistry studies*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1999. **23 Suppl 6**: p. S53-5.
81. de Bilbao, F., et al., *Resistance to cerebral ischemic injury in UCP2 knockout mice: evidence for a role of UCP2 as a regulator of mitochondrial glutathione levels*. *J Neurochem*, 2004. **89**(5): p. 1283-92.
82. Diano, S., et al., *Uncoupling protein 2 prevents neuronal death including that occurring during seizures: a mechanism for preconditioning*. *Endocrinology*, 2003. **144**(11): p. 5014-21.
83. Mattiasson, G., et al., *Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma*. *Nat Med*, 2003. **9**(8): p. 1062-8.
84. Parton, L.E., et al., *Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity*. *Nature*, 2007. **449**(7159): p. 228-32.
85. Kong, D., et al., *Glucose stimulation of hypothalamic MCH neurons involves K(ATP) channels, is modulated by UCP2, and regulates peripheral glucose homeostasis*. *Cell Metab*. **12**(5): p. 545-52.
86. Coppola, A., et al., *A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2*. *Cell Metab*, 2007. **5**(1): p. 21-33.
87. Leloup, C., et al., *Balancing mitochondrial redox signaling: a key point in metabolic regulation*. *Antioxid Redox Signal*. **14**(3): p. 519-30.
88. Raber, J., *Detrimental effects of chronic hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation. From obesity to memory deficits*. *Mol Neurobiol*, 1998. **18**(1): p. 1-22.
89. Vale, W., et al., *Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin*. *Science*, 1981. **213**(4514): p. 1394-7.
90. Tasker, J.G., *Rapid glucocorticoid actions in the hypothalamus as a mechanism of homeostatic integration*. *Obesity (Silver Spring)*, 2006. **14 Suppl 5**: p. 259S-265S.
91. Smith, S.M. and W.W. Vale, *The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress*. *Dialogues Clin Neurosci*, 2006. **8**(4): p. 383-95.
92. Hiller-Sturmhofel, S. and A. Bartke, *The endocrine system: an overview*. *Alcohol Health Res World*, 1998. **22**(3): p. 153-64.
93. Sun, X.L., et al., *Uncoupling protein 2 knockout exacerbates depression-like behaviors in mice via enhancing inflammatory response*. *Neuroscience*. **192**: p. 507-14.
94. Gimsa, U., et al., *Alterations in anxiety-like behavior following knockout of the uncoupling protein 2 (*ucp2*) gene in mice*. *Life Sci*. **89**(19-20): p. 677-84.
95. Fujimaki, S., et al., *Caspase-independent apoptosis induced by differentiation-inducing factor of *Dicytostelium discoideum* in *INS-1* cells*. *Eur J Pharmacol*, 2001. **421**(2): p. 93-100.
96. Conti, B., et al., *Uncoupling protein 2 protects dopaminergic neurons from acute 1,2,3,6-methyl-phenyl-tetrahydropyridine toxicity*. *J Neurochem*, 2005. **93**(2): p. 493-501.

97. Timofeeva, E., Q. Huang, and D. Richard, *Effects of treadmill running on brain activation and the corticotropin-releasing hormone system*. Neuroendocrinology, 2003. **77**(6): p. 388-405.
98. Imaki, T., et al., *Early induction of c-fos precedes increased expression of corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid in the paraventricular nucleus after immobilization stress*. Endocrinology, 1992. **131**(1): p. 240-6.
99. Imaki, T., et al., *Differential regulation of corticotropin-releasing factor mRNA in rat brain regions by glucocorticoids and stress*. J Neurosci, 1991. **11**(3): p. 585-99.
100. Harbuz, M.S. and S.L. Lightman, *Responses of hypothalamic and pituitary mRNA to physical and psychological stress in the rat*. J Endocrinol, 1989. **122**(3): p. 705-11.
101. Baraboi, E.D., et al., *Brain activation following peripheral administration of the GLP-1 receptor agonist exendin-4*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. **301**(4): p. R1011-24.
102. Sagar, S.M., F.R. Sharp, and T. Curran, *Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level*. Science, 1988. **240**(4857): p. 1328-31.
103. Hoffman, G.E., M.S. Smith, and J.G. Verbalis, *c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems*. Front Neuroendocrinol, 1993. **14**(3): p. 173-213.
104. Fujihara, H., et al., *Robust up-regulation of nuclear red fluorescent-tagged fos marks neuronal activation in green fluorescent vasopressin neurons after osmotic stimulation in a double-transgenic rat*. Endocrinology, 2009. **150**(12): p. 5633-8.
105. Timofeeva, E. and D. Richard, *Functional activation of CRH neurons and expression of the genes encoding CRH and its receptors in food-deprived lean (Fa/?) and obese (fa/fa) Zucker rats*. Neuroendocrinology, 1997. **66**(5): p. 327-40.
106. Simmons DM, Arriza JL, and S. LW, *A Complete protocol for in situ hybridization of messenger RNA in brain and other tissues with radiolabeled single-stranded RNA probes*. J Histotech, 1989. **12**: p. 169-181.
107. Yanagita, S., et al., *Effects of spontaneous and forced running on activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons in rats*. Life Sci, 2007. **80**(4): p. 356-63.
108. Paradis, E., et al., *Uncoupling protein 2: a novel player in neuroprotection*. Trends Mol Med, 2003. **9**(12): p. 522-5.
109. Andrews, Z.B., S. Diano, and T.L. Horvath, *Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: in support of function and survival*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(11): p. 829-40.
110. Andrews, Z.B., et al., *Ghrelin promotes and protects nigrostriatal dopamine function via a UCP2-dependent mitochondrial mechanism*. J Neurosci, 2009. **29**(45): p. 14057-65.
111. Son, G.H., S. Chung, and K. Kim, *The adrenal peripheral clock: glucocorticoid and the circadian timing system*. Front Neuroendocrinol. **32**(4): p. 451-65.
112. Kawamura, H. and N. Ibuka, *The search for circadian rhythm pacemakers in the light of lesion experiments*. Chronobiologia, 1978. **5**(1): p. 69-88.
113. Weaver, D.R., *The suprachiasmatic nucleus: a 25-year retrospective*. J Biol Rhythms, 1998. **13**(2): p. 100-12.
114. Nakazato, M., et al., *A role for ghrelin in the central regulation of feeding*. Nature, 2001. **409**(6817): p. 194-8.

115. Sullivan, P.G., et al., *Mitochondrial uncoupling protein-2 protects the immature brain from excitotoxic neuronal death*. Ann Neurol, 2003. **53**(6): p. 711-7.
116. Deierborg, T., et al., *Overexpression of UCP2 protects thalamic neurons following global ischemia in the mouse*. J Cereb Blood Flow Metab, 2008. **28**(6): p. 1186-95.
117. Kempainen, R.J. and E.N. Behrend, *Adrenal physiology*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 1997. **27**(2): p. 173-86.
118. Diano, S., et al., *Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in the nonhuman primate brain and pituitary*. Endocrinology, 2000. **141**(11): p. 4226-38.
119. Haines, B. and P.A. Li, *Overexpression of mitochondrial uncoupling protein 2 inhibits inflammatory cytokines and activates cell survival factors after cerebral ischemia*. PLoS One. **7**(2): p. e31739.
120. Andrews, Z.B., et al., *Uncoupling protein-2 is critical for nigral dopamine cell survival in a mouse model of Parkinson's disease*. J Neurosci, 2005. **25**(1): p. 184-91.
121. Kalsbeek, A., et al., *Circadian rhythms in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis*. Mol Cell Endocrinol. **349**(1): p. 20-9.
122. Kim-Han, J.S. and L.L. Dugan, *Mitochondrial uncoupling proteins in the central nervous system*. Antioxid Redox Signal, 2005. **7**(9-10): p. 1173-81.
123. Roberts, C.J., et al., *Endocannabinoid signaling in hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis recovery following stress: Effects of indirect agonists and comparison of male and female mice*. Pharmacol Biochem Behav. **117C**: p. 17-24.