



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Discipline ou spécialité :

Innovation Pharmacologique

Présentée et soutenue par :

Anne DROUGARD

le : mardi 29 avril 2014

Titre :

IMPLICATION DE L'APÉLINE HYPOTHALAMIQUE DANS LA TRANSITION ENTRE
UN STATUT SAIN ET UN STATUT OBESE/DIABÉTIQUE VIA LA MISE EN PLACE
D'UNE VOIE PEROXYDE D'HYDROGÈNE HYPOTHALAMIQUE-SYSTÈME NERVEUX
AUTONOME-FOIE

Ecole doctorale :

Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

Unité de recherche :

Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC) INSERM U1048 Equipe 3

Directeur(s) de Thèse :

Pr Claude KNAUF

Rapporteurs :

Pr Luc PELLERIN

Pr Christophe MAGNAN

Membre(s) du jury :

Pr Dominique LANGIN

Pr Corinne LELOUP

***Au Pentaèdre,
Maman et Papa
Marion et Nicolas***

RESUME

L'hypothalamus est une région cérébrale clef impliquée dans le contrôle de l'homéostasie glucidique. En effet, cette structure reçoit des informations d'ordre hormonal, neuronal ou métabolique qui vont modifier l'activité des neurones hypothalamiques générant une modification d'activité de tissus périphériques, via le recrutement du système nerveux autonome. Les modifications d'activité des tissus périphériques tels que le foie, le tissu adipeux, les muscles ou le pancréas vont permettre un ajustement de la glycémie et du métabolisme du glucose afin de stocker celui-ci dans les situations d'abondances ou de l'utiliser dans les situations de jeûne. Dans ce contexte, le diabète de type 2, une maladie métabolique en pleine expansion considérée comme la 4^e cause de mortalité dans le monde, est notamment caractérisée par un contrôle altéré de la glycémie lié à des dysfonctionnements hypothalamiques.

Durant ce doctorat, nous nous sommes intéressés à un peptide, l'apeline, qui possède la particularité d'être libéré par le tissu adipeux lui conférant un rôle d'adipokine, mais également par des neurones hypothalamiques le classant dans la catégorie des neurotransmetteurs. Dans le cadre d'un diabète de type 2, les taux d'apeline sont augmentés aussi bien dans le sang que dans l'hypothalamus.

Lors de précédents travaux, nous avons pu mettre en évidence que nous pouvions générer des caractéristiques d'un diabète de type 2 tels que l'hyperglycémie à jeun, chez des animaux sains en leur injectant en intra-cérébroventriculaire des forts taux d'apeline, similaires à ceux retrouvés chez des animaux obèses/diabétiques. Les voies de signalisations ainsi que les cibles tissulaires impliquées dans cette hyperglycémie restaient à être identifiés. Nous avons ainsi pu montrer que les EAOs et plus particulièrement le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) était un acteur moléculaire hypothalamique clef dans la transduction des effets de l'apeline. Ces forts taux d' H_2O_2 hypothalamiques génèrent une sur-activation du système nerveux orthosympathique, ciblant le foie et générant une augmentation de la production hépatique de glucose par glycogénolyse et néoglucogenèse. Cette voie de régulation H_2O_2 hypothalamique-système nerveux-autonome-foie générée par de forts taux d'apeline est retrouvée dans un modèle de souris chronique surexprimant l'apeline dans le noyau ventromédian par injection de lentivirus. Cette voie est toujours présente et même amplifiée chez des animaux obèses/diabétiques révélant une absence de résistance à l'apeline.

Ainsi ces travaux de thèse ont permis de mettre en lumière que les forts taux d'apeline hypothalamiques sont impliqués dans les prémices d'un diabète de type 2. Leur action est médiée via une voie de signalisation originale renforçant le rôle clef des EAOs comme acteur moléculaire hypothalamique dans la genèse de maladies métaboliques.

ABSTRACT

Hypothalamus is a key brain area involved in the control of glucose homeostasis. This structure receives hormonal, neuronal or metabolic informations which will modify the activity of hypothalamic neurons generating modification of peripheral tissues activity via the recruitment of the autonomic nervous system. Changes of peripheral tissues activities such as the liver, adipose tissue, muscle or pancreas will allow an adjustment of blood glucose levels and glucose metabolism in order to store it in situations of abundance, or use it in situations of fasting. In this context, type 2 diabetes, a metabolic disease in full expansion which is considered as the 4th cause of death in the world, is particularly characterized by an altered control of glucose linked to dysfunction of the hypothalamus.

During this PhD, we are interested in a peptide, apelin, which has the particularity to be released by adipose tissue giving it a role of adipokine, but also secreted by the hypothalamic neurons as a neurotransmitter. In the context of type 2 diabetes, apelin levels are increased in the blood but also in the hypothalamus.

In previous studies, we have demonstrated that intracerebroventricular injection in healthy mice of high levels of apelin, similar to that observed in the hypothalamus of obese and diabetic mice, generate type 2 diabetes characteristics such as fasted hyperglycemia. Signaling pathways and tissue targets involved in this hyperglycemia remained to be identified. We have shown that Reactive Oxygen Species and especially hydrogen peroxide (H_2O_2) was key player in hypothalamic molecular transduction effects of apelin. These high levels of hypothalamic H_2O_2 generate an over-activation of the sympathetic nervous system, targeting the liver and generating an increase of hepatic glucose production by glycogenolysis and gluconeogenesis. This hypothalamic “ H_2O_2 -autonomous nervous system-liver” signaling pathway generated by high levels of apelin is present in a chronic model of mice which overexpressed apelin in the ventromedial nucleus via injection of lentivirus. This signaling pathway is always present and amplified in obese and diabetic mice revealing no resistance to apelin.

Thus, this thesis work bring to light that high levels of hypothalamic apelin are involved in the onset of type 2 diabetes. Their actions are mediated via an original signaling pathway strengthening the key role of hypothalamic ROS as molecular player in the genesis of metabolic diseases.

LISTE DES ABREVIATIONS

ACTH : adrénocorticotrophine

AgRP : Agouti-Related Protein

AICAR : 5-Amino-4-Imidazole Carboxamide Riboside

α -MSH : alpha-Melanocyte Stimulating Hormone

AMPK : AMP-activated protein Kinase

ARC : noyau Arqué

BAT : brown adipose tissue

BDNF : brain-derived neurotrophic factor

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

CART : Cocaine and Amphétamine-Related Transcrit

CamKK β : Ca²⁺/Calmoduline-dependante protein kinase kinase β

CCK : cholecystokinine

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator

cGMP : Guanosine 3',5'- MonoPhosphate cyclic

CRM : Chaîne Respiratoire Mitochondriale

CRH : Corticotrophin Releasing Hormone

D2 : deiodinase de type 2

2-DG : 2-deoxy-D-glucose

DMN : noyau Dorso-Médian

DMX : noyau Dorsal Moteur du Vague

DRP1 : Dynamine-Related Protein 1

EAOs : Espèces Actives de l'Oxygènes

eNOS : endothéliale Nitric Oxyde Synthases

G6Pase : glucose-6-Phosphatase

GABA : acide γ -amino butyrique

GE : gluco-excité

GI : gluco-inhibé

GK : Glucokinase

GLP-1 : Glucagon Like Peptide-1

GP : Glycogène Phosphorylase

GPX : Glutation Peroxydase

GRP : Gastrin-Releasing Peptide

GS : Glycogène Synthase

HGE : hautement gluco-excité

HGI : hautement gluco-inhibé

ic : intra-carotidien

icv : intra-cérébroventriculaire

IKK β : I κ B Kinase β

IML : colonne Inter-Médio-Latérale

iNOS : inductible Nitric Oxyde Synthases

ip : intra-péritonéale

iv : intra-veineux

JNK : kinases Jun Kinase

K_{ATP} : canaux potassiques dits ATP-dépendants

LDH-A : lactate déshydrogénase A

LDH-B : lactate déshydrogénase B

LH : aire Hypothalamique Latérale

LKB1 : kinase suppresseur de tumeur

MCH : Melanin Concentrating Hormone

MCT-1 : transporteur monocarboxylate-1

MFN : mitofusines

mTOR : Mammalian Target of Rapamycin

mTORC1 : protéine raptor

NPY : Neuropeptide Y

NOS : Nitric Oxyde Synthases

nNOS : neuronale Nitric Oxyde Synthases

NO : oxyde nitrique

NOX : NADPH Oxydases

NTS : noyau du Tractus Solitaire

OPA1 : Optic-Atrophy 1

PEPCK : Phosphoénol-pyruvate-CarboxyKinase

POMC : Pro-OpiomelanoCortin

PP1 : Protéine Phosphatase 1

PVN : noyau Para-Ventriculaire

RE : Réticulum Endoplasmique

S6K : protéines S6 kinase

SF1 : facteur Stéroïdogénique 1

sGC : récepteur soluble Guanylyl Cyclase

SNA : Système Nerveux Autonome

SNP : Système Nerveux Parasymphatique

SNS : Système Nerveux Sympathique

SOD : Superoxyde Dismutase

TRH : Thyrotrophin Releasing Hormone

TSH : Thyroïde Stimulating Hormone

VIP : Vasoactive Intestinal Peptide

VMN : noyau Ventro-Median

VTA : Aire Tegmentale Ventrale

WAT : white adipose tissue

FIGURES

Figure 1 : Schéma de la localisation anatomique de l'Hypothalamus sur une coupe sagittale de cerveau humain

Figure 2 : Schéma des différents noyaux hypothalamiques

Figure 3 : Schéma d'une unité neurovasculaire

Figure 4 : Les organes circumventriculaires et l'éminence médiane

Figure 5 : Le Système Nerveux Autonome

Figure 6 : L'axe Hypothalamo-Hypophysaire

Figure 7 : Schéma des projections du noyau Arqué sur les différents noyaux hypothalamiques

Figure 8 : Interactions entre les différents noyaux hypothalamiques

Figure 9 : Régulations homéostatiques et non homéostatiques intégrant les régions extra-hypothalamiques à l'hypothalamus

Figure 10 : Fonctionnement de la cellule β pancréatique en réponse au glucose

Figure 11 : Schéma représentant le mode de fonctionnement des neurones GE

Figure 12 : Schéma représentant le mode de fonctionnement des neurones GI

Figure 13 : Genèse des EAOs et défenses antioxydantes

Figure 14 : Fonctionnement de la Chaîne Respiratoire Mitochondriale

Figure 15 : Dynamique Mitochondriale

Figure 16 : Modèles d'étude de l'équilibre fission/fusion

Figure 17 : Schéma intégré de la régulation de la glycémie

Figure 18 : Glycolyse

Figure 19 : Glycogénogenèse et Glycogénolyse

Figure 20 : Néoglucogenèse

Figure 21 : Schéma intégré de la voie de signalisation « H₂O₂-SNA-Foie» générée par les forts taux d'apeline icv

Figure 22 : Validation du modèle d'administration chronique d'apeline centrale : le modèle mini-pompe osmotique

Figure 23 : Dépense énergétique chez le modèle de souris recevant de forts taux d'apeline centrale via la pose de mini-pompes osmotiques

Figure 24 : Activité des tissus adipeux chez le modèle de souris recevant de forts taux d'apeline centrale via la pose de mini-pompes osmotiques

Figure 25 : Etude de l'inflammation cardiaque chez le modèle de souris recevant de forts taux d'apeline centrale via la pose de mini-pompes osmotiques

Figure 26 : Résultats préliminaires des animaux knock-out pour l'apeline dans l'hypothalamus

Sommaire

Généralités sur le contrôle central de l'Homéostasie Glucidique	3
1. Définition	3
2. Neuroanatomie	4
2.1 Hypothalamus et Eminence Médiane	4
a) Hypothalamus	4
b) Eminence Médiane et Barrière Hémato-Encéphalique (BHE).....	5
2.2 Système Nerveux Autonome (SNA)	8
2.3 Neuroendocrinologie	11
Partie 1 : Généralités sur le contrôle central de la prise alimentaire en condition normale et pathologique	13
1. Les neurones/noyaux de premier ordre (ARC)	13
a) Les neurones à NPY/AgRP	14
b) Les neurones POMC/CART	15
2. Les neurones/noyaux de deuxième ordre	16
a) Le noyau Para-Ventriculaire (PVN).....	17
b) Le noyau Ventro-Médian (VMN)	17
c) L'aire hypothalamique latérale (LH).....	18
d) Le noyau Dorso-Médian (DMN)	19
3. Les régions extra-hypothalamiques	20
Partie 2 : Régulation du métabolisme glucidique dans la physiologie et la physiopathologie	22
1. Généralités	22
2. Principaux acteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans la régulation métabolique ...	23
2.1 Les acteurs cellulaires	23
a) Les neurones glucosensibles	23
b) Les cellules gliales.....	29
2.2 Les acteurs moléculaires	29
a) AMPK	30
b) Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)	32
c) Le monoxyde d'azote (NO).....	32
d) Espèces Actives de l'Oxygène (EAOs) ou Reactive Oxygen Species (ROS)	34
2.3 Les organelles	39
a) La dynamique mitochondriale.....	39

b) Le Reticulum Endoplasmique (RE).....	42
3. Interrelation Hypothalamus-Tissus Périphériques et Tissus Périphériques-Hypothalamus dans le contrôle de la glycémie en conditions normales et pathologiques	43
a) Le pancréas.....	44
b) Le foie	48
c) Les muscles squelettiques	53
d) Les tissus adipeux	55
Partie 3 : Impact de l'Apeline Hypothalamique dans la transition d'un état normal à un état diabétique	63
1. Objectifs	63
2. Résultats.....	65
3. Discussion.....	Erreur ! Signet non défini.
a. Lien EAOs-Apeline	Erreur ! Signet non défini.
b. Lien EAOs-SNS	Erreur ! Signet non défini.
c. Contrôle du foie.....	Erreur ! Signet non défini.
d. Région hypothalamique impliquée	Erreur ! Signet non défini.
e. Amplification de la voie H ₂ O ₂ hypothalamiques-SNS-foie chez une modèle de souris obèses/diabétiques	Erreur ! Signet non défini.
4. Perspectives et conclusion	Erreur ! Signet non défini.
a) Action moléculaire hypothalamique	Erreur ! Signet non défini.
b) Action hypothalamique de l'apeline sur des tissus périphériques .	Erreur ! Signet non défini.
c) Origine de l'apeline délétère, périphérie versus hypothalamique .	Erreur ! Signet non défini.
Annexes	Erreur ! Signet non défini.
Références.....	Erreur ! Signet non défini.

Généralités sur le contrôle central de l'Homéostasie Glucidique

1. Définition

Le terme d'homéostasie, dont Claude Bernard (1813-1878) a mis en lumière toute l'importance, « recouvre toutes les actions qui ont pour but de maintenir les équilibres propres de l'organisme, assurant ainsi son indépendance vis-à-vis des contraintes environnementales ». Ainsi, cet état d'équilibre dynamique complexe se traduit par la quasi-constance d'un certain nombre de paramètres, indépendamment du milieu extérieur.

Parmi ces paramètres finement régulés, l'homéostasie glucidique est un point crucial. En effet, le glucose possède une place privilégiée de par la stricte dépendance du cerveau à un approvisionnement constant en carbohydrates pour alimenter ses besoins métaboliques [1]. Ainsi, en dépit d'apports alimentaires discontinus et de dépenses constantes, l'organisme des mammifères est capable, de maintenir une glycémie stable, minimisant ses variations quotidiennes par des systèmes de contrôle très précis. Cette régulation fine nécessite une communication entre les différentes parties de l'organisme et un rôle clef du système nerveux central dans l'intégration des informations périphériques et la mise en place de réponses adaptées [2].

Le rôle du cerveau dans le contrôle de l'homéostasie énergétique a tout d'abord été suggéré par Claude Bernard lors de sa fameuse expérience de la « piqure diabétique » [3], où il constate une élévation très importante de la glycémie suite à une stimulation du plancher du quatrième ventricule. Mais il faudra attendre 1953 pour que Gordon Kennedy précise la zone cérébrale impliquée, l'hypothalamus, en démontrant que des facteurs circulants libérés proportionnellement à la masse adipeuse, pourraient moduler la prise alimentaire et la dépense énergétique, afin de réguler le poids corporel via un contrôle hypothalamique [4]. Ce rôle de l'hypothalamus a été largement étudié ces 50 dernières années et il est maintenant établi qu'il possède un rôle prépondérant dans le maintien de l'homéostasie glucidique en tant que région intégrative du cerveau.

2. Neuroanatomie

2.1 Hypothalamus et Eminence Médiane

a) Hypothalamus

Parmi les cinq vésicules issues du développement embryonnaire, l'hypothalamus appartient à la partie la plus ventrale du diencephale et est ainsi situé au centre du cerveau. C'est une structure phylogénétiquement ancienne qui s'est peu modifiée au cours de l'évolution. Anatomiquement, il se trouve juste en bas et en avant du thalamus dont il est séparé par le sillon hypothalamique (**Figure 1**). Il est délimité en avant par le chiasma optique et en arrière par le mésencéphale. Il forme les parois latérales et le plancher du troisième ventricule. Il se termine ventralement par l'éminence médiane, une structure tout à fait originale où la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE) est physiologiquement modifiée permettant le passage de molécules issues de la circulation sanguine, conférant à l'hypothalamus un rôle clef dans la détection des informations périphériques [5]. Pour finir, l'hypothalamus contrôle directement l'hypophyse (considérée comme le « chef d'orchestre » des glandes de l'organisme) via un faisceau de fibres nerveuses et de capillaires nommé la tige pituitaire. Cette relation privilégiée entre ces deux structures est à la base de la neuroendocrinologie de l'organisme (abordé point **2.3**). Ainsi, de part sa localisation stratégique, l'hypothalamus intègre les différentes informations périphériques puis élabore les réponses adaptées via 3 systèmes sous sa dépendance : le système nerveux autonome (voir point **2.2**), le système endocrine (voir point **2.3**) et le système limbique.

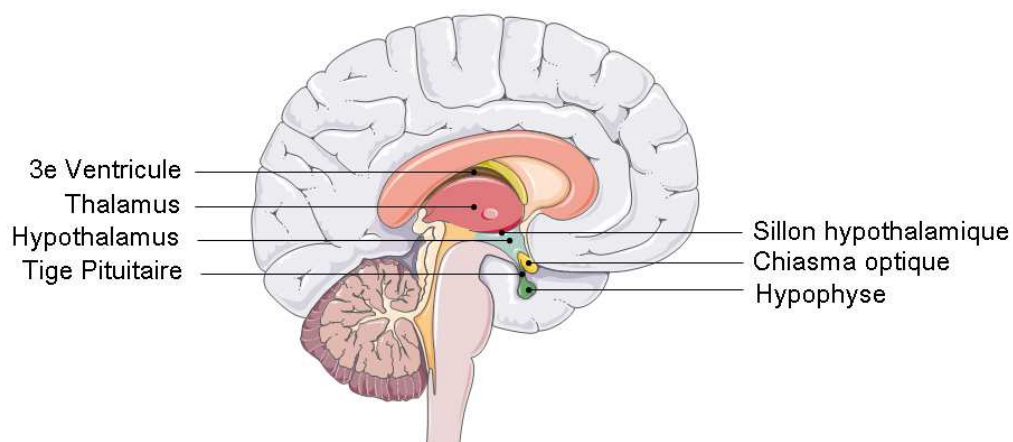


Figure 1 : Schéma de la localisation anatomique de l'hypothalamus sur une coupe sagittale de cerveau humain.

L'hypothalamus est divisé en noyaux (rassemblement de corps cellulaires) bien individualisés mais interconnectés (**Figure 2**). Les principaux noyaux impliqués dans le contrôle du métabolisme sont le noyau Arqué (ARC), le noyau Para-Ventriculaire (PVN), le noyau Ventro-Médian (VMN), le noyau Dorso-Médian (DMN) et l'aire Hypothalamique Latérale (LH).

C'est seulement à partir des années 1940 que les progrès de la chirurgie notamment en terme de techniques stéréotaxiques ont permis d'identifier précisément le rôle des différents noyaux hypothalamiques en pratiquant via des électrodes, des stimulations ou destructions localisées [6].

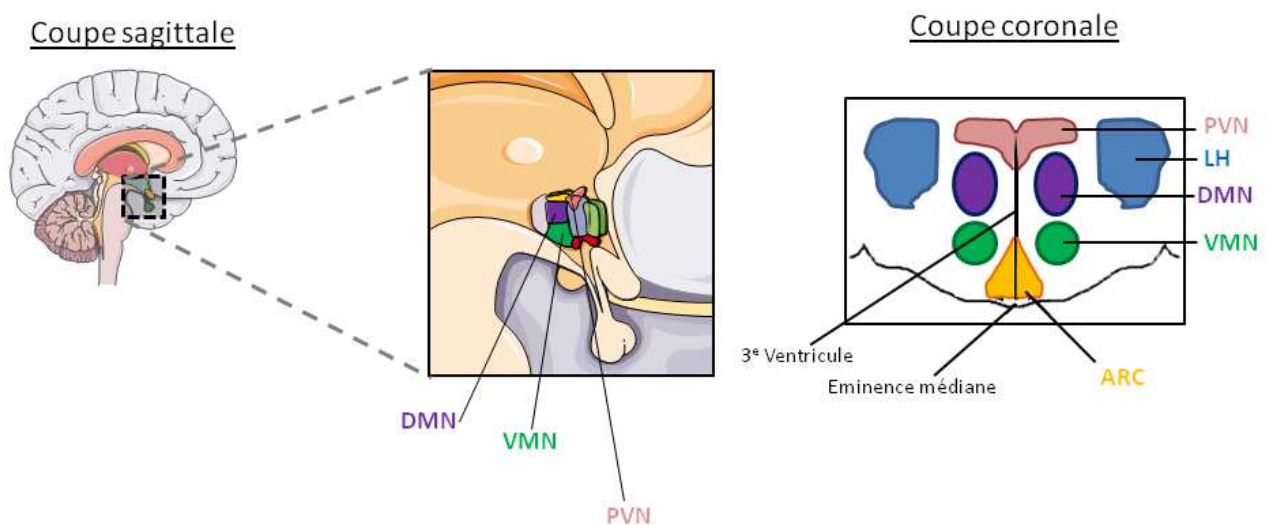


Figure 2 : Schéma des différents noyaux hypothalamiques

Coupe sagittale et coronale de l'hypothalamus, dévoilant le noyau Arqué (ARC), le noyau Para-Ventriculaire (PVN), le noyau Ventro-Médian (VMN), le noyau Dorso-Médian (DMN) et l'aire Hypothalamique Latérale (LH)

b) Eminence Médiane et Barrière Hémato-Encéphalique (BHE)

Nous avons vu précédemment que l'éminence médiane était une composante importante dans le fonctionnement de l'hypothalamus. Elle fait partie intégrante de la BHE, une structure richement vascularisée qui sépare le système nerveux central de la circulation sanguine périphérique afin de protéger le cerveau de toxines ou pathogènes et ainsi maintenir un environnement optimum pour le fonctionnement neuronal [7]. Cette barrière hautement dynamique est formée par des cellules endothéliales spécialisées connectées par des jonctions serrées sans fenestration ne permettant ainsi qu'un taux très faible de transcytose. Seules les molécules hydrophiles de petites tailles, les composées liposolubles

ou gazeux (O_2 , l'éthanol) passeront cette barrière par diffusion para-ou transcellulaires. Les autres devront passer par un système de transporteurs activés par liaison des ligands à des transporteurs spécifiques [8]. S'ajoute à ces cellules endothéliales, des péricytes, des pieds astrocytaires, des neurones et de la matrice extracellulaire formant une structure nommée « unité neurovasculaire » (**Figure 3**).

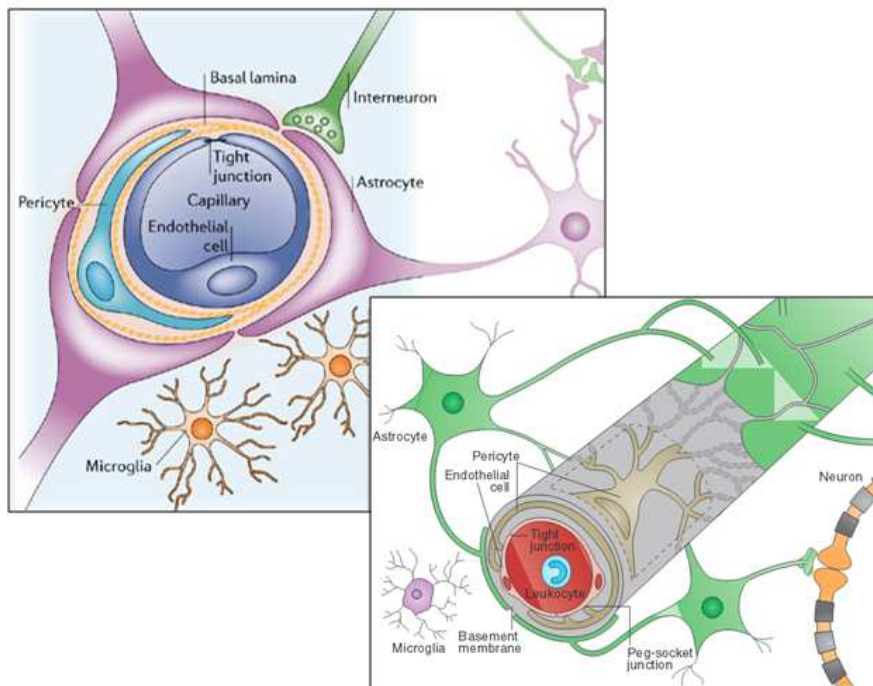


Figure 3 : Schéma d'une unité neurovasculaire [7, 8].

La cellule endothéliale forme le vaisseau sanguin en limitant les échanges via des jonctions serrées, elles-mêmes solidifiées par les pieds astrocytaires. Ces prolongements astrocytaires vont capter les nutriments et molécules informatives qu'ils vont transmettre aux neurones auxquels ils sont rattachés. Entre les astrocytes et les cellules endothéliales se trouvent de la matrice extracellulaire et des cellules particulières, péricytes, chargés de sécréter les éléments contribuant à l'intégrité des jonctions serrées et au renouvellement des cellules endothéliales.

La BHE est imperméable et empêche par exemple le passage dans les tissus nerveux, de produits de contraste injectés en intra-veineux (iv), excepté au niveau de sept petites zones. Ceux sont les organes circumventriculaires du cerveau dont les quatre principaux se situent proches du 3^e et du 4^e ventricule, 1) l'éminence médiane et la neurohypophyse, 2) l'area postrema, 3) l'organe vasculaire de la lame terminale, 4) l'organe sous-fornical. Elles possèdent toutes des capillaires fenêtrés et se comportent comme des structures neurohémales c'est-à-dire des régions où les polypeptides sécrétés par les neurones pénètrent dans la circulation générale et où les molécules issues de la périphérie atteignent les neurones [5]. Ainsi, les structures centrales proches d'un organe circumventriculaire (tel

que l'hypothalamus) captent en permanence l'état métabolique de l'organisme, via des molécules informatives sécrétées par des organes périphériques (insuline, leptine...) ou issues de l'alimentation (glucose,...). Ces structures sont hautement conservées durant l'évolution et possèdent des caractéristiques communes comme des espaces périvasculaires et des cellules épendymaires spécialisées dans le transport et la sécrétion (**Figure 4 A.**).

Parmi eux, l'éminence médiane est particulièrement impliquée dans cette interaction cerveau périphérie puisqu'elle est le lieu de passage via le système porte hypothalamo-hypophysaire où vont être libérés les peptides et monoamines sécrétés par les neurones hypothalamiques [5]. Elle est également en contact avec un type cellulaire spécifique, les tanocytes, situés dans le plancher du 3^e ventricule qui vont projeter vers les différents noyaux hypothalamiques assurant le contact entre la périphérie et l'ensemble de l'hypothalamus (**Figure 4 B.**). Il y a deux grand types de tanocytes, les α qui vont se projeter du liquide céphalo-rachidien vers les noyaux hypothalamiques proches du 3^e ventricule et les β qui vont établir un lien entre la périphérie et la lumière du 3^e ventricule [9]. Les interrelations entre ces différentes cellules permettent ainsi le passage de l'information entre la périphérie et les aires cérébrales impliquées. Dans de nombreuses maladies neurodégénératives, la perméabilité de cette BHE est altérée entraînant des infiltrations de cellules immunitaires et la destruction des jonctions serrées. Ces phénomènes sont très fortement liés à une production excessive d'Espèces Actives de l'Oxygène (EAOs) (voir partie **2.2d**) [10]. Dans le cas de maladies métaboliques telles que le diabète de type 2, l'intégrité des jonctions serrées se retrouve également altérée, augmentant la perméabilité et affectant l'activité des transporteurs [11, 12].

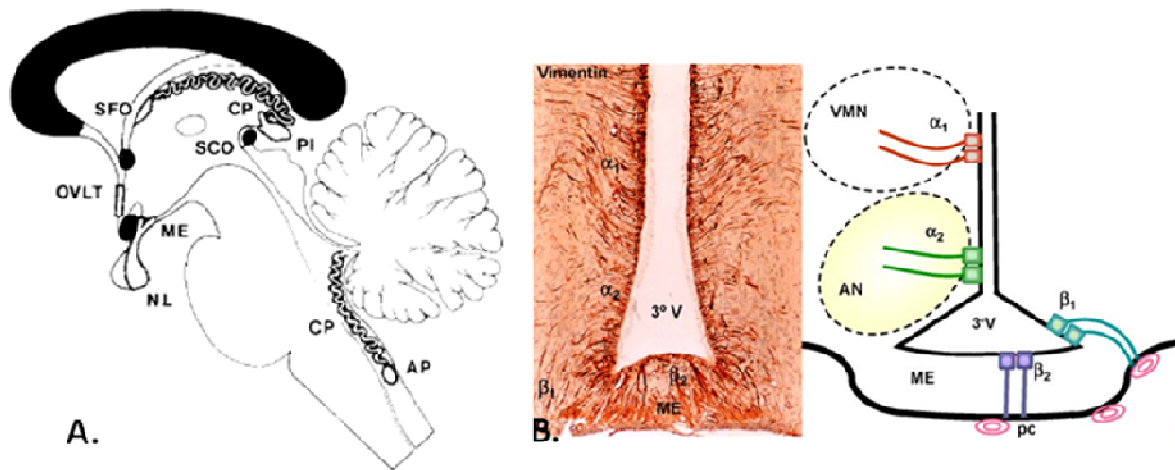


Figure 4 : Les organes circumventriculaires et l'éminence médiane

- A. Coupe sagittale médiane de cerveau humain avec les Plexus Choroides (CP) et les sept organes circumventriculaires, Aera Postrema (AP), Eminence Mediane (ME), Neurohypophyse (NL), Organe Vasculaire de la Lamme Terminale (OVL), organe sous-fornical (SFO), Glande Pinéale (PI), Organe Sub-Commissural (SCO)[13]
- B. Projections des tancytes à travers l'éminence médiane (tancytes β_1 et β_2) et vers les noyaux hypothalamiques (tancytes α_1 et α_2) [5]

Via l'éminence médiane, l'hypothalamus va pouvoir intégrer des informations concernant le métabolisme glucidique issues de la périphérie, et déclencher des réponses adaptées sur les tissus cibles via deux systèmes, le système nerveux autonome et le système neuroendocrinien.

2.2 Système Nerveux Autonome (SNA)

Le SNA contrôle les fonctions végétatives de l'organisme, permettant une action directe et rapide du cerveau sur la périphérie puisque ce système innerve la totalité des organes périphériques. En effet, ce système nerveux possède deux composantes le plus souvent antagonistes, le système nerveux parasympathique (SNP), dit « système du repos », qui va plutôt engendrer des actions anaboliques via une libération principalement d'acétylcholine; et le système orthosympathique ou sympathique (SNS), dit « système de l'urgence », qui va conduire vers le catabolisme à travers une sécrétion de noradrénaline. Ainsi, le SNP va stimuler la libération d'insuline par le pancréas et mettre en place tous les mécanismes de stockage du glucose dans le foie et le tissu adipeux. A l'inverse, le SNS va

induire la sécrétion de glucagon par le pancréas et stimuler la production hépatique de glucose, consommé par le muscle et le tissu adipeux brun (**Figure 5**).

Ces deux systèmes vont également différer par la situation de leur ganglion qui va être proche de la moelle épinière dans le cas de du SNS ou plutôt proche de l'organe cible pour le SNP. Au sein de l'hypothalamus, c'est le noyau hypothalamique LH qui va innerver directement les neurones moteurs pré-ganglionnaires du SNP tout en se projetant sur des structures extra-hypothalamiques telles que le noyau Dorsal Moteur du Vague (DMX), le noyau du Tractus Solitaire (NTS) et les noyaux ambigus [14]. Toujours au sein de l'hypothalamus, les fibres pré-ganglionnaires sympathiques se situent majoritairement dans le VMN et se projettent sur une structure de la moelle épinière, la colonne Inter-Médio-Latérale (IML). Deux autres noyaux hypothalamiques vont être impliqués dans une moindre mesure, le DMN qui va recevoir des projections du LH et du VMN tandis que le PVN va se projeter à la fois sur des ganglions parasympathiques et sympathiques, agissant à la fois sur les deux systèmes.

Depuis quelques années, une complication particulièrement grave du diabète de type 2 a été mise en évidence, il s'agit de la neuropathie diabétique du système nerveux autonome [15]. Les neuropathies sont globalement liées au diabète de type 2 mais lorsqu'elles touchent le système nerveux autonome, elles sont particulièrement graves car elles entraînent des conséquences sur tous les organes et elles empêchent également les contre-régulations métaboliques permettant de rétablir l'homéostasie glucidique. Ainsi, il a été mis en évidence que la basale d'activité du SNS est augmentée durant un diabète de type 2 tout en étant totalement insensible aux stimuli classiques comme l'insuline [16, 17]. Dès 4 semaines de régimes gras, des animaux développent ainsi des caractéristiques d'un diabète de type 2 telles que la résistance à la leptine ainsi qu'une augmentation de ce tonus basal sympathique, générant un stress global pour l'organisme qui peut être court-circuité par administration de β -bloquants [18].

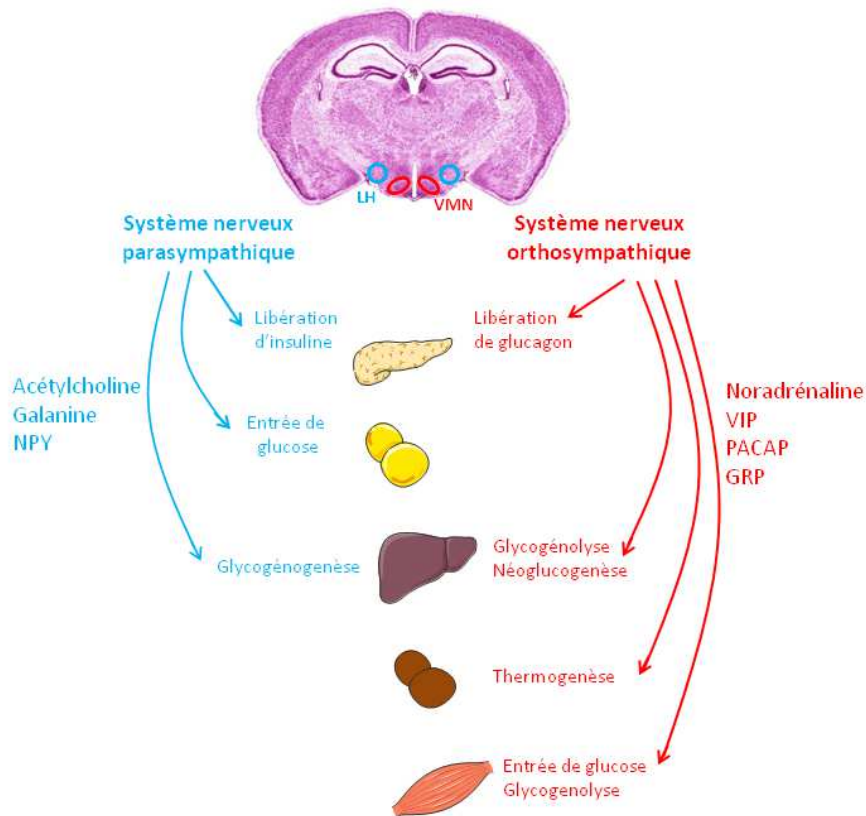


Figure 5 : Le Système Nerveux Autonome (SNA)

Le SNA est divisé en deux systèmes : le système nerveux parasympathique (SNP), dont les stimulations sont issues du LH et qui va stimuler la libération d'insuline par le pancréas ainsi que l'anabolisme via le stockage du glucose (dans le foie et le tissu adipeux); et le système nerveux sympathique (SNS), dont les stimulations sont issues du VMN et qui va stimuler la libération de glucagon pancréatique ainsi que des actions cataboliques telles que la production hépatique de glucose et son utilisation par le tissu adipeux brun et le muscle. Le SNP va libérer des neurotransmetteurs tels que l'acétylcholine, la galanine et le NPY. Le SNS va libérer des neurotransmetteurs tels que la noradrénaline, le Vasoactive Intestinal Peptide (VIP), le Pituitary Adenylate-Cyclase Activating Peptide (PACAP) et le Gastrin-Releasing Peptide (GRP).

2.3 Neuroendocrinologie

Une des particularités de l'hypothalamus est sa proximité avec la glande hypophysaire qui permet la mise en place d'un axe hypothalamo-hypophysaire dirigé vers la périphérie. L'hypophyse est une glande divisée en deux parties. Une première structure, la neurohypophyse composée d'axones et de cellules gliales, qui va être un lieu de passage des hormones hypothalamiques. Une seconde structure, l'adénohypophyse qui est composée d'épithélium glandulaire sécrétoire (**Figure 6**). La neurohypophyse, située en postérieur, est reliée à l'hypothalamus par le tractus hypothalamo-hypophysaire à travers lequel passent les prolongements axonaux des neurones à ocytocine et à vasopressine. Ces deux neurohormones sont libérées dans la circulation sanguine suite à une stimulation hypothalamique. A l'opposé, l'adénohypophyse communique avec l'hypothalamus par un réseau vasculaire nommé système porte hypothalamo-hypophysaire. Des neurones hypothalamiques libèrent leurs neurotransmetteurs dans ce réseau vasculaire stimulant les cellules de l'adénohypophyse. Une fois stimulées, ces cellules libèrent leurs hormones dans ce même système porte hypothalamo-hypophysaire ce qui va permettre aux hormones hypophysaires de rejoindre la circulation périphérique. En effet le noyau hypothalamique PVN contient des neurones à Thyrotrophin Releasing Hormone (TRH) et Corticotrophin Releasing Hormone (CRH) sous le contrôle des projections de l'ARC [19, 20]. Ces neurones vont générer respectivement une libération d'adrénocorticotrophine (ACTH) et de Thyroïde Stimulating Hormone (TSH) par les cellules de l'adénohypophyse. L'ACTH va cibler les surrénales générant une production de glucocorticoïdes et catécholamines tandis que la TSH engendrera la libération de T3 et T4 par la thyroïde. Cette production de glucocorticoïdes et catécholamines libérés dans la circulation sanguine va intervenir dans le métabolisme glucidique en générant une production hépatique de glucose par néoglucogénèse [21]. Les hormones thyroïdiennes également jouent un rôle clef dans le catabolisme en stimulant la néoglucogénèse et la glycogénolyse ainsi que la thermogénèse musculaire du tissu adipeux brun [22].

Une altération dans l'équilibre de ce système est associée à des pathologies. Ainsi un excès d'hormones thyroïdiennes ou de glucocorticoïdes va être en lien avec l'apparition d'un diabète de type 2. La libération importante de ces deux hormones va générer une hyperactivation du SNS puis de la néoglucogénèse de façon chronique, caractéristiques d'une résistance à l'insuline [23].

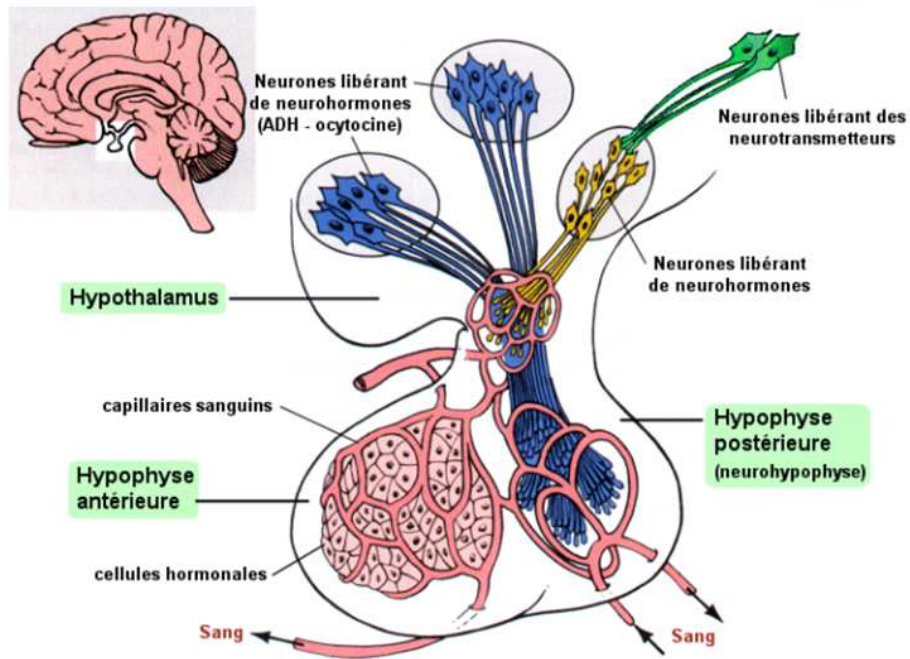


Figure 6 : L'axe Hypothalamo-Hypophysaire

Certains neurones hypothalamiques se projettent dans l'hypophyse postérieure (ou Neurohypophyse) où ils vont libérer de la vasopressine et/ou de l'ocytocine dans la circulation sanguine ; tandis que des neurones à CRH et TRH (issus du PVN), vont libérer du CRH et du TRH dans le système porte-hypothalamo-hypophysaire, stimulant l'épithélium glandulaire de l'hypophyse antérieure (ou Adénohypophyse) libérant en retour de la TSH et de l'ACTH dans ce même système porte hypothalamo-hypophysaire et convergeant vers la circulation sanguine périphérique.

Partie 1 : Généralités sur le contrôle central de la prise alimentaire en condition normale et pathologique

La régulation de la prise alimentaire et par conséquent du poids corporel, est un paramètre finement régulé étant donné que ce dernier peut rester stable pendant plusieurs années. L'hypothalamus est un acteur clef dans ce processus de régulation de la prise alimentaire car il va intégrer les informations périphériques, reflétant le statut nutritionnel telles que des nutriments (glucose dans le cas de l'homéostasie glucidique), des afférences nerveuses (issues par exemple du tractus digestif) ou des hormones libérées par des organes clefs (l'insuline, la leptine...). Ainsi, l'activité des neurones hypothalamiques va se retrouver modifiée, impliquant tout un réseau complexe de structures cérébrales, principalement hypothalamiques et mésencéphaliques, se traduisant par l'élaboration d'une réponse adaptée, dirigée vers la périphérie via le SNA et l'axe hypothalamo-hypophysaire. Une perturbation de cette boucle de régulation, aboutit à une altération de ce contrôle de la prise alimentaire et peut générer une obésité et/ou une de ses pathologies associées le diabète de type 2 (voir **Partie 2**).

1. Les neurones/noyaux de premier ordre (ARC)

L'intégration de messages issus de la périphérie demande la mise en place d'un réseau permettant de relayer l'information. Ainsi, la notion de neurones de premier ordre concerne les neurones étant les premiers en contact avec les signaux périphériques. Dans l'hypothalamus, les neurones de premier ordre ne se trouvent que dans un seul noyau, l'ARC. En effet, l'ARC est la structure hypothalamique la plus proche de l'éminence médiane, ce qui en fait un site clef d'intégration des informations issues de la circulation sanguine. Une lésion de ce noyau génère une hyperphagie et une obésité [24]. L'ARC contient deux populations majeures de neurones impliqués dans l'homéostasie énergétique, les neurones orexigènes (stimulant la prise alimentaire) qui expriment Neuropeptide Y (NPY) et Agouti-Related Protein (AgRP), et les neurones anorexigènes (inhibant la prise alimentaire) qui expriment Cocaine and Amphetamine-Related Transcrit (CART) et Pro-Opiomelanocortin (POMC) (**Figure 7**).

a) Les neurones à NPY/AgRP

La majorité des neurones exprimant NPY, un des neurotransmetteurs les plus abondant dans le cerveau [25], se trouvent dans la partie médiane de l'ARC [26] et co-expriment AgRP [27]. Ces neurones constituent le seul type de neurones activés par le jeûne pour favoriser la prise alimentaire. En accord avec leur rôle d'effecteurs anaboliques, ils vont au contraire être inhibés par l'insuline [28] et la leptine [29]. Une ablation de ces neurones chez des jeunes souris génère un phénotype hypophagique [30] tandis que l'injection intracérébroventriculaire (icv) de NPY ou d'AgRP va stimuler la prise alimentaire [31, 32]. Cette injection icv de NPY va également, indépendamment de son effet sur la prise alimentaire, orienter positivement la balance énergétique par une diminution de la thermogénèse induite par le tissu adipeux brun (BAT), par une augmentation du stockage des lipides dans le tissu adipeux blanc [33], par une suppression de l'activité du système nerveux sympathique [34] et par une inhibition de l'axe thyroïdien [35].

Ce neurotransmetteur NPY agit via 5 récepteurs (Y1-Y5) avec un effet prédominant via le Y1 et le Y5. La densité du récepteur Y5 dans l'hypothalamus est diminuée en réponse au jeûne et est augmentée en réponse à un régime obésogène, en particulier dans les régions où se projettent les neurones NPY/AgRP comme le PVN, le LH et le DMN [36]. De façon similaire, le nombre de récepteur Y1 dans l'ARC est diminué durant le jeûne [37]. Mais les animaux déficients pour ce récepteur présentent un phénotype obèse mais non hyperphagique [38] soulignant un rôle de ce récepteur dans la dépense énergétique plutôt que dans la prise alimentaire. Au sein de l'ARC, l'activation de ce récepteur, qui est retrouvé à la surface des neurones POMC/CART, permet l'inhibition de ces derniers [39]. De plus, une sous-population de neurones NPY/AgRP possèdent la particularité de synthétiser l'acide γ -amino butyrique (GABA) permettant d'une part un tonus inhibiteur direct sur les neurones POMC/CART et expliquant d'autre part l'hétérogénéité d'effets de ces neurones [40]. Enfin, les récepteurs Y2 et Y4 semblerait plutôt agir de façon autocrine en ayant un effet inhibiteur sur les neurones NPY/AgRP [41].

b) Les neurones POMC/CART

La molécule de POMC est à la base du système mélanocortine favorisant le catabolisme et la dépense énergétique. POMC est en effet clivée en nombreuses molécules biologiquement actives dont l'alpha-Melanocyte Stimulating Hormone (α -MSH), libérée par les neurones POMC et co-exprimée avec CART, en particulier dans la partie latérale de l'ARC [42, 43]. Tout en exerçant une diminution de la prise alimentaire, l' α -MSH, en miroir des actions des neurones NPY/AgRP, va stimuler l'axe thyroïdien [44], ainsi que l'activité du système nerveux sympathique en particulier en augmentant la thermogénèse du BAT [45]. L'expression de POMC est fortement corrélée au statut énergétique de l'organisme puisque ces taux sont réduits en période de jeûne et augmentés en réponse à la leptine ou en période post-prandiale dans l'ARC [46]. L' α -MSH va se lier à deux récepteurs en particulier, MC3R et MC4R, que l'on retrouve en abondance dans l'ARC mais aussi dans des noyaux hypothalamiques clefs tels que le VMN, DMN et le PVN [47]. Le modèle de souris knock-out pour MC4R génère un phénotype d'hyperphagie et d'obésité [48] tandis que l'injection icv d'agoniste inhibe la prise alimentaire [49]. AgRP est l'antagoniste naturel des récepteurs MC3R et MC4R [50]. Ainsi, lorsque les neurones NPY/AgRP libèrent leurs neurotransmetteurs, le message orexigène est envoyé via l'activation du récepteur Y5 par le neurotransmetteur NPY tandis que le neurotransmetteur AgRP va inhiber les relais anorexigène en antagonisant MC3/4R.

Concernant le contrôle du métabolisme glucidique, l'ARC contient également des neurones particuliers dits glucosensibles que nous définirons dans la seconde partie [51].

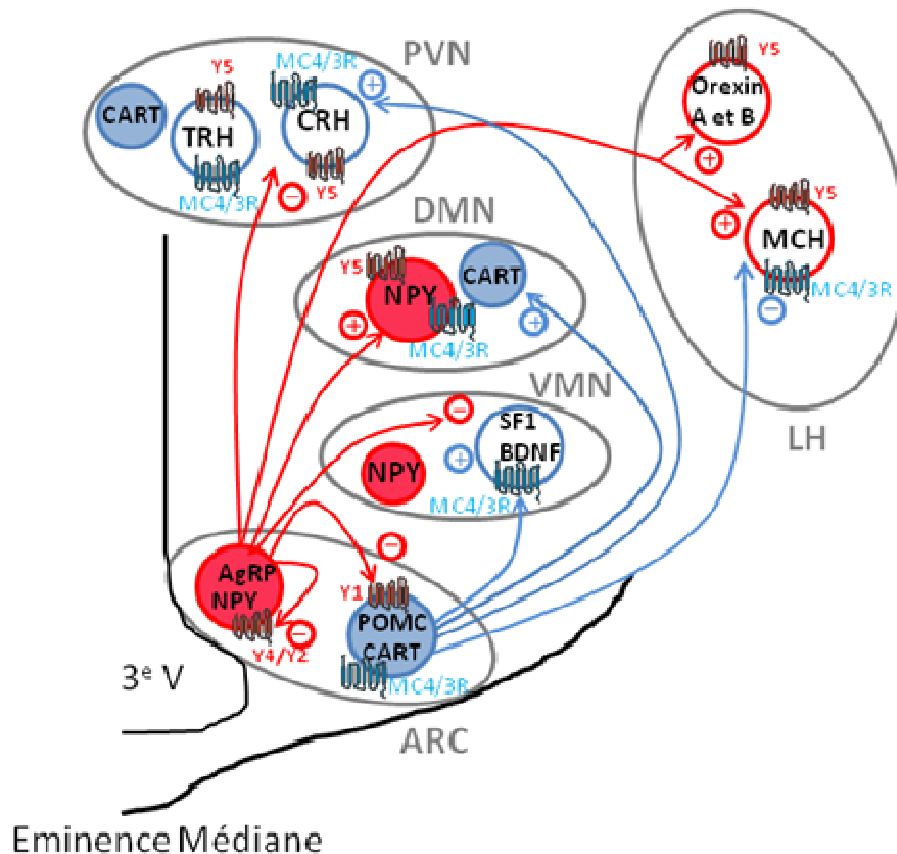


Figure 7 : Schéma des projections du noyau Arqué sur les différents noyaux hypothalamiques

Le noyau arqué (ARC) contient deux types de neurones, les neurones orexigènes (NPY/AgRP) localisés dans la partie médiale et les neurones anorexigènes (POMC/CART) localisés dans la partie latérale. Ces neurones se projettent sur les différents noyaux hypothalamiques ; le noyau Ventro-Médian (VMN), le noyau Dorso-Médian (DMN), le noyau Para-Ventriculaire (PVN) et l'aire Hypothalamique Latérale (LH). Ainsi les neurones NPY/AgRP vont inhiber : les neurones à TRH et CRH du PVN, les neurones à SF1-BDNF du VMN, les neurones POMC/CART de l'ARC mais également s'auto-inhiber via les récepteurs Y5, Y1, Y4, Y2, MC4R et MC3R. A l'inverse, ils vont activer les neurones à NPY dans le DMN ainsi que les neurones à MCH et à Orexin A et B via le récepteur Y5. Les neurones POMC/CART vont stimuler les neurones à TRH et CRH du PVN, les neurones à SF1-BDNF du VMN, les neurones CART du DMN tout en inhibant les neurones MCH et Orexin du LH via les récepteurs MC3/4R.

2. Les neurones/noyaux de deuxième ordre

Nous avons vu dans la partie précédente que les neurones de premier ordre sont localisés dans l'ARC, un lieu stratégique dans la captation des informations issues de la périphérie. Cette structure se projette vers d'autres noyaux hypothalamiques tels que le PVN, le LH, le VMN et DMN. Ces aires hypothalamiques contiennent des « neurones de deuxième ordre » qui vont intégrer les signaux afin d'élaborer un comportement complexe visant un contrôle de la prise alimentaire. (Figures 7 et 8).

a) Le noyau Para-Ventriculaire (PVN)

Le PVN est localisé juste au-dessus du troisième ventricule. Il semble plutôt impliqué dans des phénomènes satiétogènes étant donné que des expériences de lésions bilatérales de ce noyau génèrent un phénotype d'obésité et d'hyperphagie [52]. De plus, le PVN est un site de forte expression de MC4R où une administration en intra-structural d'agonistes de ce récepteur génère une diminution de la prise alimentaire tandis que l'injection d'antagonistes l'augmente [53]. Au sein du PVN, sont également retrouvés des neurones exprimant CART [54] ainsi que l' α 2-AMPK dont l'activité est diminuée en réponse à des stimuli anorexigènes comme la leptine, l'insuline et des agonistes de MC4R [55]. Cette structure reçoit des projections du NTS, ainsi que de l'ARC (NPY/AgRP et POMC). Ces dernières vont respectivement inhiber ou activer des neurones TRH et CRH. Les neurones à CRH vont stimuler la dépense énergétique en activant le système nerveux sympathique et à travers l'axe hypothalamo-hypophysaire ciblant les surrénales, tandis que l'activation des neurones à TRH aura une conséquence similaire en agissant sur l'axe thyroïdien [19, 20]. En retour, le PVN va se projeter sur les autres noyaux hypothalamiques ainsi que sur des noyaux pré-ganglionnaires autonomes comme le NTS et le DMX contrôlant ainsi le SNA.

b) Le noyau Ventro-Médian (VMN)

Le VMN est considéré comme le centre de la satiété. Des expériences de lésions bilatérales de ce noyau ont mis en évidence un phénotype d'obésité et d'hyperphagie [56]. Ce noyau est situé juste au-dessus de l'ARC et reçoit ainsi des projections neuronales issues de cette structure (NPY/AgRP et POMC) sans toutefois contenir des neurones AgRP [57]. A l'inverse, cette structure comporte des neurones à NPY dont l'expression est altérée chez des souris obèses diabétiques [58]. Plus récemment, il a été mis en évidence que le brain-derived neurotrophic factor (BDNF) est fortement exprimé dans le VMH et directement régulé par le statut nutritionnel et le récepteur MC4R [59]. En effet, son expression ainsi que celle de son récepteur diminue dans le VMN d'animaux déficient pour le récepteur MC4R, tandis que l'ajout de BDNF exogène en icv réduit l'hyperphagie et l'obésité de ces animaux. Le facteur Stéroïdogénique 1 (SF1) est également un acteur clef du VMN car les neurones SF1 expriment le récepteur MC4R, libère du BDNF et les souris knock-out spécifiquement pour ces neurones présentent un phénotype obèse dû à une diminution des dépenses

énergétiques [60, 61]. Enfin, le VMN se projette sur le DMN mais également sur des structures extra-hypothalamiques telles que le NTS.

c) L'aire hypothalamique latérale (LH)

Le LH est le centre de la faim. Une lésion de cette zone génère une diminution de la prise alimentaire, du poids et une augmentation de la dépense énergétique [62]. Les neurones NPY/AgRP et POMC de l'ARC se projettent directement sur les neurones orexigènes du LH, comme les neurones à Melanin Concentrating Hormone (MCH) et les neurones à orexines A et B (appelées aussi hypocrétines 1 et 2) [63]. Les animaux surexprimant le récepteur à la MCH sont obèses et hyperphagiques. A l'inverse, l'absence de ce récepteur génère un phénotype maigre et une augmentation de la dépense énergétique [64]. Concernant les orexines, le rôle spécifique de l'orexine B n'est pas vraiment identifié, par contre l'injection icv aigue d'orexine A génère une hyperphagie [65]. Un paradoxe intéressant est que le modèle de souris knock-out pour les orexines présente une diminution de la prise alimentaire tout en étant obèse [66]. Ce phénotype atypique s'explique par deux actions distinctes des orexines. Une première action via des projections vers toutes les régions cérébrales clefs hypothalamiques et mésencéphaliques (NTS et DMX) les impliquant dans la dépense énergétique [67] mais également spécifiquement vers le VMN en exerçant un tonus inhibiteur via une libération de GABA qui éteint le signal anorexigène du VMN [68]. Mais les orexines tiennent aussi un rôle important dans le contrôle du métabolisme glucidique. En effet une injection icv d'orexine A génère une activation du SNS, induisant une augmentation la production hépatique de glucose [69], une augmentation de la température corporelle [70] et une augmentation de la captation du glucose par les muscles [71].

Etant le noyau hypothalamique le plus connecté, le LH va se projeter dans tout l'hypothalamus mais également sur le thalamus, l'hippocampe, le tronc cérébral et la moelle épinière.

d) Le noyau Dorso-Médian (DMN)

Le DMN reçoit essentiellement des projections issues de l'hypothalamus (ARC, PVN, VMN et LHA). Cette structure possède des neurones à NPY sous la dépendance de projection du système melanocortine, ainsi que des neurones CART [72, 73]. Le DMN est la région hypothalamique qui possède le plus de récepteur à la cholecystokinine (CCK), une hormone peptidique gastro-intestinale anorexigène. Ce récepteur est co-localisé avec les neurones NPY [74], et son absence spécifiquement au niveau de ces neurones génère une obésité et une augmentation de l'expression de NPY. Ces résultats confirment le phénotype d'hypophagie et de baisse du poids corporel retrouvé lors d'une lésion bilatérale du DMN [75]. Cette structure va par la suite se projeter sur des noyaux hypothalamiques comme le PVN et le VMN.

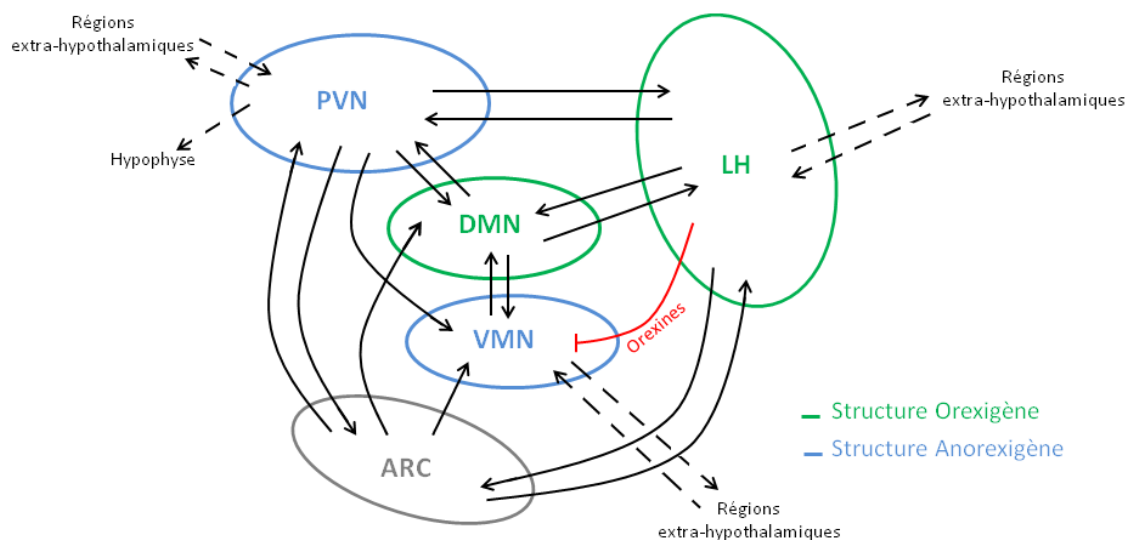


Figure 8 : Interactions entre les différents noyaux hypothalamiques

Le noyau arqué (ARC), noyau hypothalamique de premier ordre, va se projeter sur les noyaux hypothalamiques de deuxième ordre, qu'ils sont plutôt impliqués dans le phénomène de prise alimentaire comme le noyau Dorso-Médian (DMN) et l'aire hypothalamique latérale (LH), ou dans le phénomène de satiété comme le noyau Ventro-Médian (VMH) et le noyau paraventriculaire (PVN). Ces quatre noyaux hypothalamiques interagissent également entre eux afin de contrôler la prise alimentaire et la dépense énergétique.

Ces quatre noyaux hypothalamiques contiennent également des neurones glucosensibles similaires à ceux retrouvés dans l'ARC, ce qui les place au centre du contrôle du métabolisme énergétique, et plus particulièrement glucidique [76].

3. Les régions extra-hypothalamiques

L'hypothalamus est classiquement considéré comme LA région cérébrale de l'intégration et du contrôle de la prise alimentaire puis de l'homéostasie énergétique. Mais, des structures extra-hypothalamiques vont également contribuer au maintien de cette balance, soit en interagissant avec les circuits hypothalamiques, soit en contribuant directement au contrôle de ces paramètres (**Figure 9**)

Le NTS est une région extra-hypothalamique très similaire à l'hypothalamus. Elle possède de nombreuses connections avec celui-ci (LH, PVN, VMN) [77]. Comme l'ARC, cette structure cérébrale se situe près d'un organe circumventriculaire, l'Area Postrema [78] et elle contient les mêmes populations neuronales que l'ARC, comme NPY dont l'expression varie avec le statut nutritionnel [79] ou POMC et son récepteur MC4R [80, 81] ainsi que des neurones glucosensibles [82]. Il est important de souligner qu'il n'existe que deux populations de neurones à POMC dont l'une se situe dans l'ARC et l'autre dans le NTS [83], renforçant l'importance de ces deux structures dans la prise alimentaire et la dépense énergétique. Le NTS semble plutôt impliqué dans des phénomènes satiétogènes, mis en évidence par les interactions très fortes avec le PVN, la présence de neurones à POMC ainsi que la présence de récepteurs à CCK, insuline et leptine à la surface de ses neurones [84, 85]. Le NTS reçoit les afférences vagales du tractus gastro-intestinale [86] pour se projeter par la suite sur l'hypothalamus, ce qui lui confère un rôle clef de relais. Mais le NTS possède également un accès direct aux neurones pré-ganglionnaires vagues lui permettant une modulation de l'assimilation de la nourriture via une action sur le foie, le pancréas et le canal alimentaire [87]. En parallèle, le NTS possède des projections sur les neurones pré-ganglionnaires du SNA ce qui lui permet un contrôle des processus métaboliques et de la dépense énergétique [88].

Bien que moins influentes que l'hypothalamus et le NTS, d'autres structures contribuent au contrôle du métabolisme énergétiques de façon plus restrictive via une implication dans le phénomène de prise alimentaire. Par exemple, l'Aire Tegmentale Ventrale (VTA) va libérer de la dopamine dans le cortex préfrontal et le noyau Accumbens en réponse à des stimuli extérieurs (vue, gout, odeur), instaurant une composante hédonique au repas [89, 90].

Enfin des travaux de lésion de l'amygdale postéro-dorsale ont permis de mettre en évidence une hyperphagie et une obésité [91]. Cette région possède des connections avec le NTS, le cortex préfrontal ainsi que l'Hypothalamus et plus particulièrement le LH, connections d'autant plus fortes que l'amygdale exprime fortement le récepteur à MCH [92].

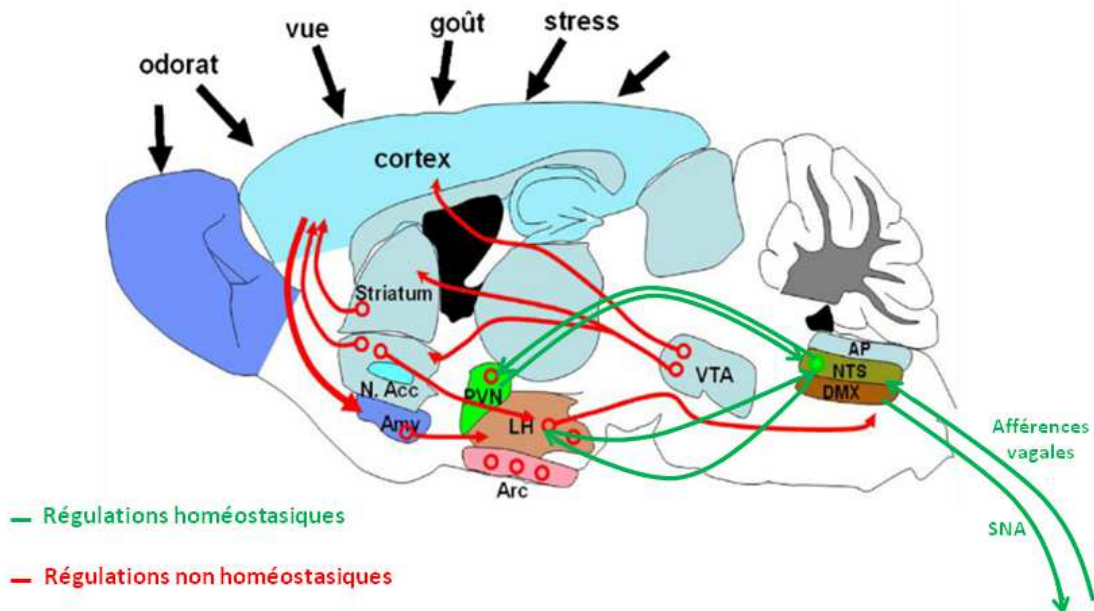


Figure 9 : Régulations homéostasiques (A) et non homéostasiques (B) intégrant les régions extra-hypothalamiques à l'Hypothalamus (inspiré de [90])

- (A) Le noyau du tractus solitaire (NTS) reçoit directement les informations issues de la périphérie via l'Area Postrema (AP) mais également via les afférences vagales issues, par exemple, du tractus gastro-intestinal. En retour le NTS va se projeter sur l'hypothalamus et plus particulièrement sur le noyau Para-Ventriculaire (PVN) et le l'aire Hypothalamique Latérale (LH), structures avec lesquelles il possède des liens privilégiés, mais il va également agir en périphérie via le SNA.
- (B) Suite à des stimuli extérieurs (goût, odeur, vue, stress), l'Aire Tegmentale Ventrale (VTA) va libérer de la dopamine dans le cortex préfrontal et le noyau accumbens (N Acc.). Des projections redescendent du cortex et font relais dans l'amygdale (Amy) qui possède de fortes connections avec le LH qui agira en périphérie via l'activation du SNA dans le complexe dorso-vagale (NTS+DMX).

Partie 2 : Régulation du métabolisme glucidique dans la physiologie et la physiopathologie

1. Généralités

Le maintien d'une glycémie constante est essentiel au bon fonctionnement de l'organisme. En effet, des phénomènes d'hypoglycémie vont provoquer des pertes de conscience pouvant aboutir au décès dû à une absence de substrat pour le cerveau. A l'inverse, des phénomènes d'hyperglycémies prolongées altèrent la conformation des protéines créant des produits de glycation ou activant des protéines kinases pro-inflammatoires responsables de graves pathologies comme les rétinopathies et néphropathies [93].

La détection du glucose et la régulation de la glycémie en orientant le métabolisme vers le stockage ou l'utilisation est donc une question de survie. De nombreux acteurs cellulaires et moléculaires sont ainsi impliqués dans cette régulation du métabolisme glucidique qu'ils soient hypothalamiques et/ou périphériques. Une altération dans leur fonctionnement ou leur détection du glucose va générer un défaut du maintien de la glycémie.

Une pathologie largement répandue et caractérisée par une dérégulation de l'homéostasie glucidique conduisant à une hyperglycémie chronique est le diabète de type 2. Cette maladie touchant 347 millions de personnes dans le monde se décrit principalement par un défaut d'action de l'insuline au niveau tissulaire (foie, muscles, tissus adipeux ...). Le pancréas va alors sécréter des taux très importants d'insuline afin de pallier à cette hyperglycémie chronique générant ainsi une hyperinsulinémie [94]. A des stades avancés, cette pathologie se caractérise par une résistance à l'insuline et une inflammation de « bas bruit » dans tout l'organisme en lien avec la glucotoxicité de l'état hyperglycémique [95].

2. Principaux acteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans la régulation métabolique

2.1 Les acteurs cellulaires

En 1953, Jean Mayer observe que des hypo- ou hyperglycémies sévères conduisent rapidement à des changements dans la prise alimentaire. Il propose ainsi la théorie glucostatique qui postule que des récepteurs au glucose du système nerveux central pourraient déceler les variations de glycémie et les traduire en message électrique ou neuronale [96]. L'injection icv de 2-deoxy-D-glucose (2-DG), un analogue non-métabolisable du glucose, génère une augmentation de la prise alimentaire, suggérant que le cerveau, et plus particulièrement les régions proches des ventricules comme l'hypothalamus, sont sensibles à cette soudaine déplétion (factice) en glucose [97].

a) Les neurones glucosensibles

Une décennie après la théorie de Mayer, une population de neurones spécialisés est identifiée en tant que gluco-senseurs [98]. Ces neurones possèdent la particularité de réagir à des modifications de concentrations de glucose en modifiant leur potentiel de membrane et leur fréquence de potentiel d'action [51]. On les retrouve dans l'hypothalamus [99] mais également dans des régions extra-hypothalamiques impliquées dans le métabolisme énergétique comme le NTS [100] et l'Amygdale [101]. Ils peuvent ainsi être classés en deux catégories, qui vont différer aussi bien par leur mode d'action que par leur localité, les neurones dit excités par le glucose (gluco-excités) et les neurones dit inhibés par le glucose (gluco-inhibés). Ces deux types de neurones ont un fonctionnement « en miroir » dans une gamme de concentration de 0 à 5mM de glucose. Lors d'un repas, il se produit un saut de concentration de glucose cérébrale de 0.1 à 5mM, les neurones gluco-excités vont s'activer tandis que les gluco-inhibés vont rester inactifs. A l'inverse, lors d'un jeûne, la baisse de cette concentration de glucose de 5 à 0.1 mM va inhiber les neurones gluco-excités et activer les gluco-inhibés [102].

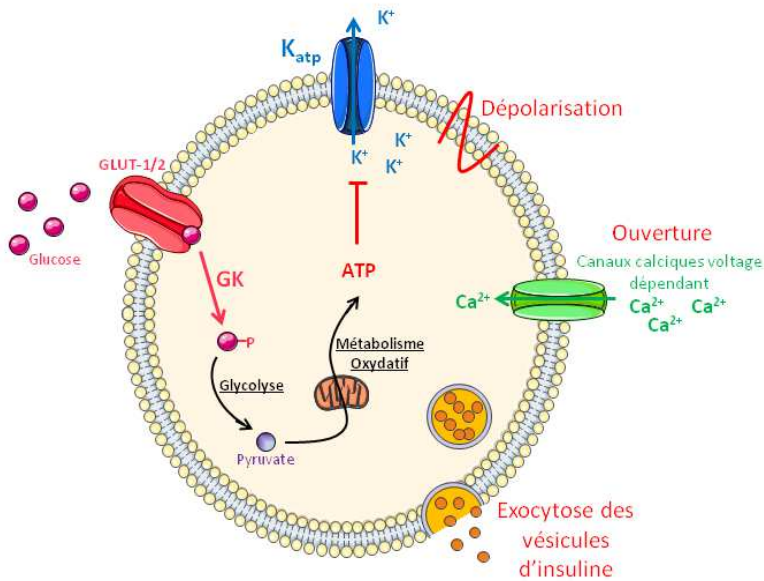
Il est admis que la concentration en glucose du liquide céphalo-rachidien correspond entre 10 et 30% à celle du sang [103] en fonction de la zone cérébrale concernée. Suite à

l'introduction dans le cerveau de rats, d'électrodes s'oxydant en présence de glucose, il a été mis en évidence par Silver et Erecinska, que des changements de glycémie périphérique étaient immédiatement suivis par des changements de concentration de glucose dans le cerveau [104]. Dans la physiologie, cette concentration de glucose central correspond à une concentration oscillant entre 1 et 2,5mM pour une glycémie sanguine de 5 à 8mM. Ainsi les neurones glucosensibles ne vont pas être soumis à la même concentration de glucose en fonction de leur localisation cérébrale (par exemple proche d'un ventricule ou plus en profondeur dans le cerveau). Les neurones proches d'un organe circumventriculaire vont être soumis à une concentration plus forte de glucose, ce qui est le cas pour des neurones particuliers de l'ARC qui ne réagissent qu'à des fortes concentrations de glucose (supérieures à 5mM) [105]. Le fonctionnement de ces neurones nommés « hautement gluco-excitables » (HGE) ou « hautement gluco-inhibés » (HGI) est mal connu et ne seront pas décrits dans ce manuscrit.

Les neurones gluco-excités (GE)

Les GE sont donc des neurones particuliers qui vont être stimulés par des élévations de la concentration en glucose. On en retrouve dans la partie latérale de l'ARC. Ainsi sur des coupes de cerveau de souris, 80% des neurones à POMC sont excités par le glucose [106]. A l'inverse, l'équipe de Wang [51] ne détecte pas le neurotransmetteur POMC dans des neurones gluco-excités de rat. Ces deux expériences utilisaient la même technique, l'enregistrement sur cellule entière, mais pas le même modèle animal, suggérant une différence due à l'espèce, ou soulignant que seule une sous-population de neurones POMC sont des GE. Cette population de GE dans l'ARC représente 20 à 25% des neurones totaux. Ces neurones ont été étudiés également dans le VMH où ils représentent 14% des neurones de cette structure mais n'ont pas de phénotype particulier [107] tandis que dans le LH, les neurones exprimant MCH sont excités en réponse au glucose [108].

On retrouve des similitudes entre le fonctionnement des GE et de la cellule β pancréatique située dans les îlots de Langerhans (**Figure 10**). En effet, ces cellules vont s'exciter en présence d'une augmentation de glucose, modifier leur potentiel de membrane et leur activité électrique ce qui va leur permettre de libérer pour l'un des neurotransmetteurs et pour l'autre de l'insuline.



Au repos, la cellule β possède un potentiel de membrane de -70mV dû à un courant sortant d'ions potassiques via des canaux potassiques dits ATP-dépendants (K_{ATP}). Sa particularité est également de maintenir un niveau très bas de calcium intra-cellulaire via des canaux calciques voltage dépendant. Lorsque le glucose pénètre dans la cellule β selon son gradient via un transporteur spécifique GLUT-1 (ou GLUT-2 chez le rongeur), il est phosphorylé en glucose-6-phosphate par une enzyme clef considérée comme un senseur de glucose, la glucokinase. Le glucose-6-phosphate est ensuite utilisé dans la voie de la glycolyse puis de la respiration oxydative, générant une production accrue d'ATP, conduisant à l'inactivation des canaux K_{ATP} . Cette fermeture des canaux va dépolariiser la membrane, ouvrir les canaux calciques voltages dépendant et cette entrée massive de calcium provoque l'exocytose des vésicules d'insuline.

Figure 10 : Fonctionnement de la cellule β pancréatique en réponse au glucose

Le glucose pénètre dans la cellule β via GLUT-1 ou GLUT-2 où il sera transformé en glucose-6-phosphate par la glucokinase (GK) puis utilisé dans la voie de la glycolyse afin de générer de l'ATP. Cette augmentation d'ATP intracellulaire inactive les canaux potassiques ATP-dépendants (K_{ATP}) créant une dépolarisation membranaire qui va ouvrir des canaux calciques voltages dépendants. Cette entrée massive de calcium provoque l'exocytose des vésicules d'insuline.

De nombreux indices confirment la similarité d'action avec la cellule β , on retrouve dans les GE : GLUT-2 [109], la glucokinase [76] et les canaux K_{ATP} [110] (Figure 11).

La glucokinase semble être le premier régulateur de ce glucosensing, aussi bien chez les GE que les GI. Elle apparait dès le 18^e jour embryonnaire dans tout l'hypothalamus, indiquant un rôle clef de cette enzyme aussi bien dans le métabolisme que dans la maturation des neurones [111]. L'ARNm de la glucokinase est retrouvé dans 70% des GE et en utilisant une approche de siRNA, il a pu être mis en évidence que la perte de la glucokinase était associée à une diminution du nombre de neurones glucosenseurs, aussi bien GI que GE [112].

Concernant le transporteur GLUT-2, son rôle dans la détection de glucose cérébral est clairement établi étant donné que l'injection icv d'oligonucléotides anti-sens dirigés contre GLUT-2 réduit la prise alimentaire, le poids corporel et inhibe la réponse insulinémique à un bolus intra-carotidien (ic) de glucose [113, 114]. Par contre, il est présent à la membrane

d'un grand nombre de neurones, qu'ils soient glucosenseurs ou pas [109]. Ainsi, il existe d'autres transporteurs impliqués dans ce glucose-sensing, notamment le transporteur insulino-dépendant GLUT-4 possédé par 75% des GE [109] ou SGLT-1 retrouvé sur 25% des GE [115].

Les canaux K_{ATP} semblent primordiaux dans le fonctionnement des neurones glucosenseurs étant donné qu'ils permettent la dépolarisation du neurone. Plus récemment, il a été mis en évidence un rôle neuroprotecteur contre le glutamate libéré en condition d'hypoglycémie ou d'hypoxie, via l'hyperpolarisation induite par l'activation des canaux [116]. Ces canaux K_{ATP} peuvent être modulés par l'ATP, mais également les acides gras [117], les composés sulphonurés [110] ainsi que des hormones comme l'insuline [118] et la leptine [119]. Des animaux invalidés pour Kir6.2, une sous-unité des canaux K_{ATP} , conduit à une augmentation de la fréquence de décharge spontanée des neurones GE du VMH suggérant une altération complète du fonctionnement de ces neurones [110]. A l'inverse les neurones de l'ARC ne semblent pas affectés par cette absence de Kir6.2 et continuent à être excités en présence de glucose [105].

Dans le cadre de la physiopathologie, il semblerait que l'intégrité de ces entités moléculaires soit très vite altérée durant la mise en place de pathologie du métabolisme glucidique. En effet, chez des animaux rendus obèses et diabétiques par un régime riche en graisse, on observe un défaut de sensibilité des canaux K_{ATP} à la liaison de l'ATP dans le VMN, corrélé à une augmentation de l'ARMm de la glucokinase [102]. De manière intéressante, la présence de canaux K_{ATP} n'a pas été décelée dans le VMN de rats Zucker génétiquement obèses [120].

Enfin, d'autres paramètres ne sont pas à négliger dans l'étude des GE comme par exemple la relation très forte existant entre astrocytes et neurones. L'astrocyte est une cellule du système nerveux central particulière qui va avoir une action centrée sur la protection du neurone. Une de ses particularités est d'entourer les vaisseaux sanguins via ses pieds astrocytaires ce qui lui assure un contact avec le glucose sanguin. Ainsi, cette cellule possède un rôle nourricier. Elle stocke le glucose sous forme de glycogène ou le libère vers le neurone après l'avoir transformé en lactate via la lactate déshydrogénase A (LDH-A)[121, 122]. Ce lactate passera dans le neurone à travers le transporteur monocarboxylate-1 (MCT-1) où il sera retransformé en pyruvate par la lactate déshydrogénase B (LDH-B). Des GE du VMH expriment MCT-1 ainsi que LDH-B [109, 123] tandis que les astrocytes expriment le

récepteur GLUT-2 [124]. Ces mêmes neurones s'activent en présence de lactate [125] et l'injection icv de lactate chez des rats génère, tout comme le glucose, une inhibition de la production hépatique de glucose [122] (**Figure 11**).

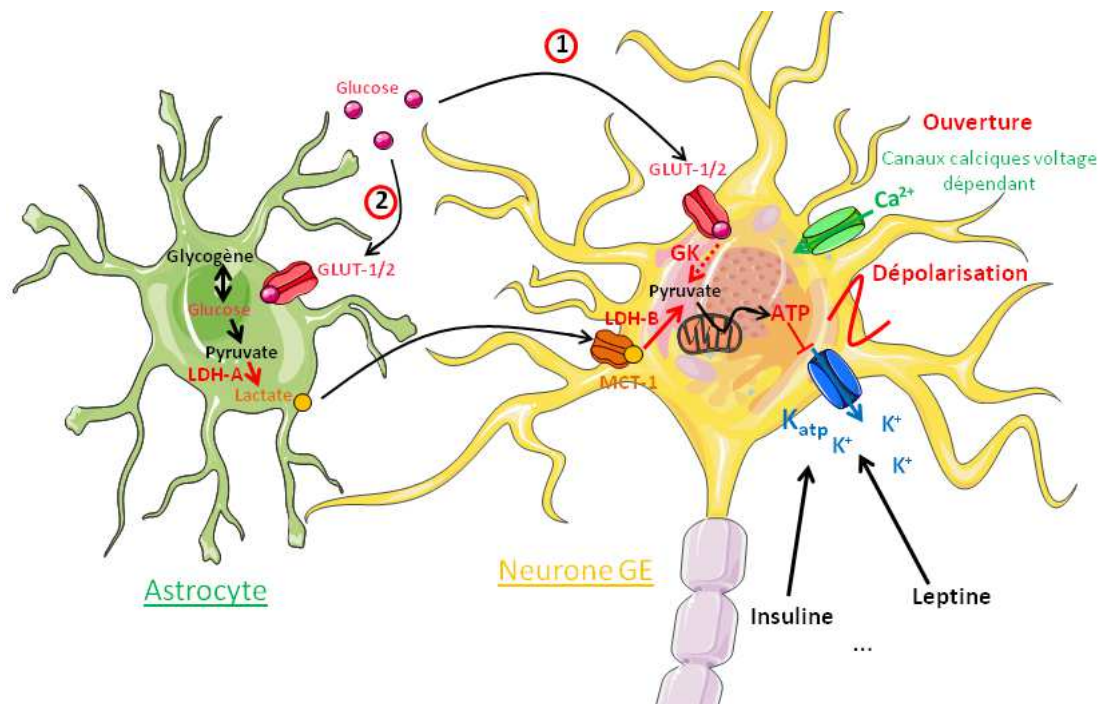


Figure 11 : Schéma représentant le mode de fonctionnement des neurones GE

Lors d'une arrivée de glucose périphérique celui-ci peut activer les neurones GE via deux voies, une directe (1) et une indirecte (2). 1) Le glucose peut rentrer directement dans le neurone via le transporteur GLUT-1/2 et intervenir dans la voie de la glycolyse via la glucokinase (GK) afin d'aboutir à la formation d'ATP bloquant les canaux potassiques ATP-dépendants (K_{ATP}). La membrane plasmique est alors dépolarisée générant l'ouverture des canaux calcium potassiques. 2) Le glucose peut également rentrer dans l'astrocyte via le transporteur GLUT-1/2 où il sera stocké sous forme de glycogène ou transformé en lactate via la lactate déshydrogénase A (LDH-A). Ce lactate sort de l'astrocyte et rentre dans le neurone via le transporteur monocarboxylate-1 (MCT-1) rejoignant la voie de la phosphorylation oxydative faisant suite à la glycolyse.

Les neurones gluco-inhibés (GI)

A l'inverse des GE, les GI vont être excités par une diminution de la concentration en glucose dans le milieu extracellulaire. On les retrouve dans la partie médiane de l'ARC où ils co-expriment NPY [126] ainsi que dans le VMH où ils représentent 3% des neurones de cette structure [107]. Dans le LH, ils semblent majoritaire [127] et 95% des neurones orexines sont hyperpolarisés et inhibés suite à des élévations de glucose [108]. Bien qu'exprimant la glucokinase pour 40% d'entre eux ainsi que les transporteurs GLUT2 [109], le fonctionnement de ces neurones GI reste assez obscur. Les travaux de Song *et al.* mettent en

évidence l'activation de canaux chlore particuliers : les Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) [107].

Ainsi, il a été montré dans les GI du VMH, qu'un senseur particulier nommé l'AMP-activated protein Kinase (AMPK, voir point 2.2.a) détecte la baisse du ratio ATP/AMP (et donc du glucose) et active la production d'un neurotransmetteur particulier, l'oxyde nitrique (NO, voir point 2.2.c), par la neuronale NO Synthase (nNOS) [128, 129]. Cette réponse des neurones GI au glucose est perdue en présence d'inhibiteurs de l'AMPK et ce senseur métabolique va inhiber les canaux CFTR [130].

Une grande partie des effets du NO sont médiés via l'activation du récepteur soluble Guanylyl Cyclase (sGC) et la libération de Guanosine 3',5'- MonoPhosphate cyclique (cGMP) [131]. Il a ainsi été mis en évidence que l'activation de l'AMPK en réponse à une baisse de glucose, stimulait la libération de NO par la nNOS, ce qui activait le récepteur sGC. La libération de cGMP par le récepteur sGC permet de maintenir l'activation de l'AMPK qui inhibe alors le canal CFTR [132]. Cette fermeture empêche le courant entrant de chlore, dépolarisant alors la membrane et permettant l'activation du neurone (Figure 12).

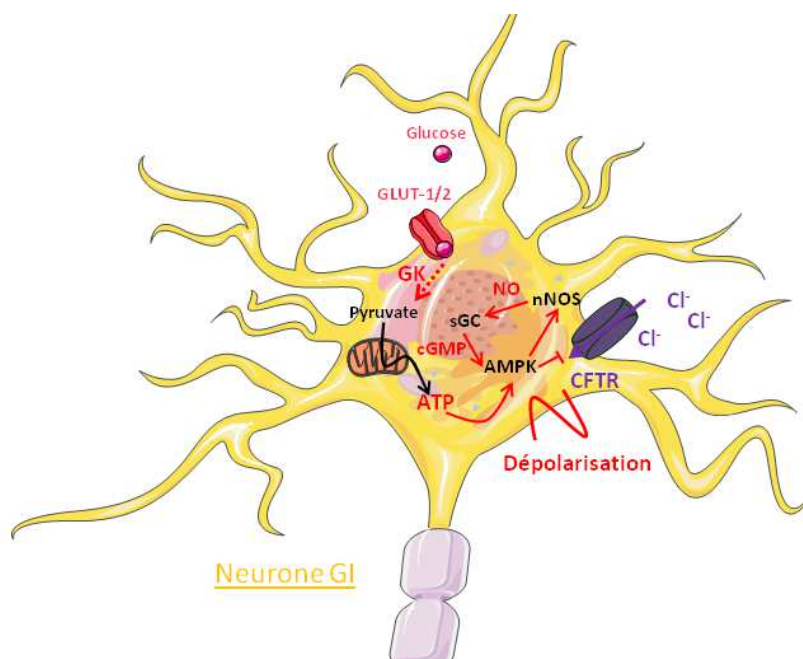


Figure 12 : Schéma représentant le mode de fonctionnement des neurones GI

Lors d'une baisse de glucose périphérique, les taux de glucose entrant dans le neurone via le transporteur GLUT-1/2 sont diminués, il ya donc moins de glucose rentrant dans la voie de la glycolyse via la glucokinase (GK) et donc au final moins d'ATP cellulaire. La baisse du ratio ATP/ADP active l'AMPK qui va inhiber des canaux chlore particuliers : les Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) responsables d'une dépolérisation membranaire. En parallèle, l'AMPK va également activer la Nitric Oxyde Synthase neuronale (nNOS) qui va libérer du monoxyde d'azote (NO). Ce NO active le récepteur soluble Guanylyl Cyclase (sGC) induisant une libération de Guanosine 3',5'- MonoPhosphate cyclique (cGMP). Ce cGMP permet de maintenir l'activation de l'AMPK.

b) Les cellules gliales

L'évidence d'un rôle des cellules gliales dans la détection du glucose a été mise en évidence dans l'ARC et les régions proches de l'Area Postrema [133]. Une injection intrapéritonéale (ip) de 2-DG mimant une hypoglycémie périphérique conduit classiquement à une augmentation du marquage c-Fos (un marqueur d'activité neuronale) dans les neurones de ces deux régions centrales. Mais ce marquage est réduit respectivement de 50% et 70% lorsque les animaux sont prétraités avec un inhibiteur spécifiquement glial du métabolisme des carbohydrates (la methionine sulfoximine). Parmi les cellules gliales, c'est principalement les astrocytes et les tanocytes qui ont été le plus étudiés. Ainsi, la réexpression de GLUT-2 spécifiquement dans les astrocytes de souris knock-out pour ce transporteur suffit à restaurer la production de glucagon en réponse à l'hypoglycémie générée par le jeûne ou le 2-DG [134]. Au sein des astrocytes hypothalamiques, la Connexine 43, un canal participant à la formation des jonctions GAP, a également été impliquée dans la sensibilité au glucose. En effet, une inhibition de cette protéine par ARN interférents, spécifiquement au niveau hypothalamique, diminue la production d'insuline en réponse à un bolus ic de glucose [135]. Au sein des tanocytes, la connexine 43 est également impliquée dans la détection du glucose via une libération de calcium intracellulaire [136]. Ces cellules répondent aux fluctuations de glucose [137] et leur destruction par une injection d'alloxane dans le troisième ventricule ne génère pas d'hyperglycémie ni d'augmentation de la prise alimentaire en réponse à une injection systémique de 2-DG. Ces cellules expriment également la deiodinase de type 2 (D2) au niveau de leur pieds tanocytaires en contact avec des neurones NPY de l'ARC. Ainsi, le modèle souris knock-out pour la D2 n'augmente pas l'expression hypothalamique de NPY en réponse au jeûne générant une diminution de la prise alimentaire durant la première heure de réalimentation [138].

2.2 Les acteurs moléculaires

Bien que les cellules neurales semblent particulièrement impliquées dans le métabolisme glucidique de par leur spécificité et leur localisation, la détection du glucose ne semble pas dépendre exclusivement de leur recrutement. En effet, certains médiateurs moléculaires, dont le mode d'action a été mis en évidence dans des organes périphériques, ont une action

centrale clef dans cette détection du glucose et dans la mise en place de voie de signalisations spécifiques dirigées vers l'anabolisme ou le catabolisme.

a) AMPK

L'AMPK est une serine-thréonine protéine kinase hautement conservée durant l'évolution. Elle est considérée comme le senseur énergétique cellulaire de l'organisme. On la retrouve dans tout l'organisme et en particulier dans les organes sensibles au glucose comme le foie, le cœur, le tissu adipeux, les muscles et le cerveau...[139]. Cette enzyme existe sous la forme de complexe hétérodimérique composé d'une sous unité catalytique AMPK α et de deux sous unités régulatrices AMPK β et AMPK γ dont chacune possède plusieurs isoformes permettant de former 12 combinaisons hétérotrimériques différentes tissus spécifiques. L'AMPK va avoir un rôle de préservation de l'intégrité cellulaire en réponse à une déplétion en ATP [140]. Ainsi, l'AMPK va être phosphorylée par une kinase suppresseur de tumeur (LKB1) [141] ou par la Ca²⁺/Calmoduline-dependante protein kinase kinase β (CamKK β) [142] qui sont elles-mêmes activées par l'AMP. A l'inverse, cet AMP empêche la déphosphorylation de l'AMPK en inhibant l'activité des protéines phosphatases-2C. Cette phosphorylation de l'AMPK va permettre en place des processus cataboliques afin de restaurer les taux d'ATP de la cellule.

Au niveau périphérique, l'AMPK favorise le transport insulino-indépendant du glucose dans le muscle squelettique et le cœur afin de réaliser directement son oxydation [143]. En parallèle, au niveau du foie, l'AMPK va inhiber la production hépatique de glucose en agissant directement sur les enzymes de la néoglucogénèse comme la glucose-6-Phosphatase (G6Pase) et la Phosphoénol-pyruvate-CarboxyKinase (PEPCK) [144]. Ainsi, l'utilisation de formes d'AMPK constitutivement actives dans le foie ont permis de normaliser la glycémie d'animaux génétiquement obèses (ob/ob) [145]. En périphérie, l'AMPK est donc une cible privilégiée dans le traitement du diabète de type 2. En effet, une des molécules les plus utilisée dans le traitement de cette pathologie est la Metformine dont le mode d'action passe par la phosphorylation de l'AMPK [146].

Dans l'hypothalamus, l'AMPK est activée en fonction du statut nutritionnel. Ainsi, son activité va être augmentée par le jeûne, l'absence de glucose et l'administration d'AgRP

tandis que la satiété et l'administration d'agonistes aux récepteurs mélanocortines va l'inhiber [55]. L'AMPK réagissant lors d'un déficit de la balance énergétique, il a également été montré que l'injection de leptine en intra-péritonéale ou intra-hypothalamique chez des souris à jeun va diminuer la phosphorylation de l'isoforme AMPK α 2 dans le PVN et l'ARC tandis que l'injection icv d'insuline va réduire son activité de 25 à 40% dans toutes les régions hypothalamiques. Il a également été montré que la déplétion en ATP causée par le 2-DG génère une augmentation de la prise alimentaire suggérant une action de cette enzyme via les neuropeptides POMC/CART et NPY/AgRP. En effet, l'AMPK est colocalisée avec NPY dans les neurones de l'ARC [147] et son activation par la molécule 5-Amino-4-Imidazole Carboxamide Riboside (AICAR) injectée en icv entraîne une augmentation de la prise alimentaire [148]. L'expression de formes constitutivement actives de l'AMPK dans l'hypothalamus génère une hyperphagie et un gain de poids, tandis que l'expression de dominants négatifs engendre l'effet inverse et notamment une diminution de la libération de NPY [55]. L'AMPK hypothalamique semble tout de même essentielle à la détection du glucose car le modèle de souris délétée pour l'AMPK dans les neurones à POMC est un modèle d'obésité [149]. La particularité de ce modèle réside dans le fait que les neurones à POMC répondent toujours à l'insuline et à la leptine mais ne sont plus sensibles au glucose.

L'AMPK hypothalamique possède une implication dans la prise alimentaire, mais agit également en périphérie via le SNA [150]. Ce phénomène est mis en évidence par une présence anormale de fort taux de catécholamines dans les urines de souris knock-out pour l'AMPK α 2, suggérant une modulation anormale du système nerveux sympathique. Cette action de l'AMPK hypothalamique diffère en fonction de sa localisation. En effet, l'injection de l'activateur de l'AMPK, l'AICAR, en icv génère une augmentation de la sensibilité périphérique à l'insuline et de la synthèse de glycogène musculaire chez des souris à jeun [151], tandis que son injection en intra-structurale dans le VMN génère une augmentation de la production hépatique de glucose en situation d'hypoglycémie [152].

Dans le cadre d'un diabète de type 2 généré par une alimentation riche en lipides, il a été mis en évidence une diminution de l'activité basale de l'AMPK hypothalamique ainsi qu'une insensibilité à la leptine [153]. Dans ce cadre physiopathologique, la voie de signalisation de l'AMPK semble être complètement altérée, l'empêchant de jouer son rôle de senseur et contribuant ainsi à la détérioration du métabolisme.

b) Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)

Tout comme l'AMPK, mTOR est une serine-thréonine kinase très conservée, dont l'activité contrôle des points critiques de la croissance cellulaire [154]. Cette kinase existe sous deux formes multi-protéiques, une contenant la protéine nommée raptor (mTORC1) et l'autre contenant la protéine rictor [155]. Le premier complexe contenant mTORC1 est le mieux caractérisé et le médiateur majoritaire des actions de mTOR. A l'inverse de l'AMPK, mTOR est activée en condition d'excès énergétiques, en particulier par un ratio ATP/AMP élevé [156] ou par des forts taux d'insuline [157]. En effet, dans le cadre d'une déficience en nutriments, mTORC1 inhibe l'activité de mTOR tandis qu'en condition de surplus énergétique, il changera de conformation permettant le recrutement et la phosphorylation de protéines telles que les protéines S6 kinase (S6K) [158].

On retrouve mTOR au sein de l'hypothalamus, et plus particulièrement dans les neurones NPY/AgRP et POMC de l'ARC [159]. Contrairement à l'AMPK, son activité diminue avec le jeûne et augmente avec la prise alimentaire. De plus, mTOR semble être impliquée dans les effets anorexigènes de la leptine. En effet, l'injection de leptine en icv est associée à une augmentation de la phosphorylation de S6K et cet effet anorexigène est aboli par l'injection concomitante d'inhibiteurs de mTOR [159]. De plus, l'injection d'une forme constitutivement active de la S6K dans l'hypothalamus améliore la tolérance au froid et protège les animaux des effets délétères d'un régime gras tandis que l'injection d'une forme « dominant négatif » de S6K augmente le poids, la prise alimentaire et diminue la sensibilité à la leptine [160].

De la même façon que l'AMPK, la signalisation de mTOR est complètement altérée chez des animaux rendus obèses/diabétiques par un régime gras [161]. Chez ces animaux, on note qu'une injection icv de leptine ne parvient pas à moduler l'expression de mTORC1 et S6K, démontrant une altération de la signalisation mTOR cohérente avec l'apparition de résistance à la leptine dans cette pathologie.

c) Le monoxyde d'azote (NO)

Le NO est un gaz radicalaire, c'est-à-dire qu'il possède un électron libre lui conférant un fort pouvoir réactif. Identifié comme médiateur biologique en 1987[162], il intervient dans les voies de signalisation de nombreuses fonctions biologiques dont les plus connues sont la

vasorelaxation des vaisseaux sanguins [163] ou l'inhibition de l'agrégation plaquettaire [164].

Le NO est synthétisé par des Nitric Oxyde Synthases (NOS) classées au nombre de 3. On retrouve d'une part la NOS endothéliale (eNOS) et la NOS neuronale (nNOS) qui font partie de la famille des NOS constitutives de l'organisme, et d'autre part la NOS inducible (iNOS) qui sera synthétisée en réponse à des stimuli pro-inflammatoires [165]. On retrouve ces différents isoformes des NOS dans tout l'organisme et leurs principales différences résident dans la synthèse du NO [166]. Ainsi ces enzymes catalysent la dégradation de la L-arginine en L-citrulline + NO. La nNOS et la eNOS libèrent du NO de manière calcium dépendante et transitoire tandis que la iNOS catalyse la réaction indépendamment du calcium et de façon prolongée.

Le NO produit a une durée de vie très courte (de 0.5 à 5 secondes), mais possédant la particularité d'être apolaire, il peut facilement diffuser à travers les membranes biologiques et agir jusqu'à 300 μm de son site de synthèse [167]. Ainsi ce médiateur possède deux actions principales ; l'activation directe d'enzymes comme la Guanylate Cyclase [168], ou sa combinaison avec des dérivés oxygénés lorsqu'il est produit en grandes quantités, notamment par la iNOS, lui conférant un rôle cytotoxique [165].

Le NO est particulièrement étudié dans le cerveau, où les voies de signalisation NOergiques vont contrôler la libération de neuropeptides [169], mais également la plasticité cérébrale [170] et la prise alimentaire qui se retrouve diminuée en présence d'inhibiteurs des NOS [171]. Concernant les voies NOergiques hypothalamiques, outre son effet via les neurones GI [172], le NO va également être impliqué dans la signalisation centrale de l'insuline [173]. En effet, une injection d'insuline en icv génère une augmentation du rythme cardiaque et du débit sanguin via la phosphorylation de eNOS. A l'inverse, cette action de l'insuline est perdue dans un modèle d'animaux obèses/diabétiques avec une diminution de 50% de l'expression de la eNOS (totale et phosphorylée), tandis qu'elle est restaurée chez des animaux knock-out pour la eNOS mais recevant un donneur de NO en icv. La nNOS également semble impliquée dans la physiopathologie diabétique car son expression est diminuée dans le VMN d'animaux génétiquement obèses [174]. Cette libération de NO hypothalamique est donc essentielle à la détection du glucose, qu'il soit détecté au niveau carotidien [175] ou intestinal [176], ce qui est mis en évidence par une altération complète

de sa sécrétion dans des modèles physiopathologiques. Dans le cerveau, ce médiateur tient un rôle clef dans la transduction des effets centraux vers la périphérie car une production de NO dans des régions contrôlant le SNA, comme le NTS, diminue l'activité sympathique et la pression sanguine [177].

Enfin, le NO hypothalamique serait également un médiateur des effets des lipides puisqu'une injection délétère d'acides gras en icv générant une résistance à l'insuline du foie, serait médiée par la nNOS du VMN [178]. Ainsi, tout en étant indispensable à la régulation centrale du métabolisme glucidique, la sécrétion de NO est un paramètre finement régulé qui peut aboutir, lors de perturbations dans sa libération, à la mise en place de pathologies.

d) Espèces Actives de l'Oxygène (EAOs) ou Reactive Oxygen Species (ROS)

Les EAOs sont des espèces radicalaires dérivées de l'oxygène. Tout comme le NO, elles possèdent un ou plusieurs électrons célibataires qui leur confèrent une capacité à réagir avec les molécules environnantes afin d'apparier leurs électrons. Ce fort pouvoir oxydant est corrélé avec une durée de vie extrêmement courte de ces espèces. Par contre, le fait d'arracher un électron va créer un nouveau radical qui pourra ainsi réagir à plus longue distance du lieu d'émission et propager le signal par réactions radicalaires en cascades dans l'organisme [179].

Parmi ces EAOs, le précurseur de toutes les autres formes radicalaires est l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Ce radical est peu diffusible et va très vite former le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par dismutation spontanée ou réagir avec le NO dans les cas de stress oxydant. L' H_2O_2 est la plus stable des EAOs grâce à ces deux atomes d'oxygène portant chacun un électron célibataire. Ainsi, elle possède une durée de vie beaucoup plus longue et est apolaire ce qui lui permet de diffuser librement à travers les composants cellulaires. Par la suite, l' H_2O_2 peut subir des réductions monoélectroniques donnant naissance à d'autres dérivés oxygénés comme le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) qui à son tour réagira avec les chaînes d'acides gras polyinsaturés donnant des radicaux alkyles (R^{\cdot}) et peroxydes (ROO^{\cdot}). Ces derniers sont notamment responsables de l'effet délétère de la peroxydation lipidique (**Figure 13**).

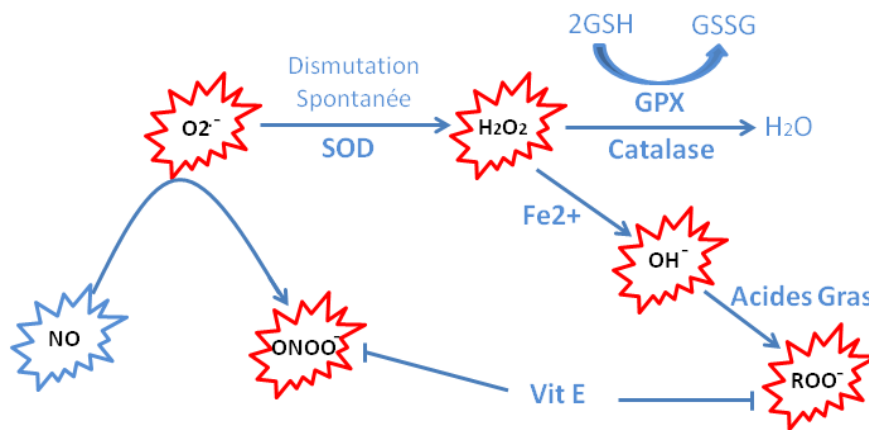


Figure 13 : Genèse des EAOs et défenses antioxydantes

Le précurseur des formes radicalaires est l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Ce composé peut réagir avec le monoxyde d'azote (NO) et former des composés nitrés (ONOO $^{\cdot}$); ou réagir avec une autre molécule d'anion superoxyde générant du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par dismutation spontanée, ou via une enzyme anti-oxydante, la superoxyde dismutase (SOD). Cette H_2O_2 peut par la suite subir des réductions monoélectroniques générant d'autres dérivés oxygénés très réactifs comme le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) qui à son tour réagira avec les chaînes d'acide gras polyinsaturées donnant des radicaux alkyles (R) et peroxydes (ROO $^{\cdot}$) responsables de la peroxydation lipidique. Afin d'éviter les effets délétères d'une accumulation d'EAOs, il existe des systèmes de détoxification spécifique comme la catalase qui va transformer l' H_2O_2 en eau, ou aspécifique comme la glutathion peroxydase (GPX) et les vitamines.

Les EAOs sont majoritairement produites par la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) [180]. La mitochondrie, qui est un organite intracellulaire essentiel à la survie de la cellule car elle assure la transformation des substrats énergétiques en ATP, possède également un rôle signalisant via la production d'EAOs mitochondriales (mEAOs). Cette production de mEAOs se fait de façon proportionnelle à l'entrée de substrat dans la chaîne respiratoire et en fonction de la concentration cellulaire en composé réduit et en oxygène. Ainsi, l'acétylCoA, qui est le produit résiduel des différentes voies métaboliques associées à l'oxydation des nutriments, va subir son oxydation complète dans le cycle de Krebs au sein de la mitochondrie [181]. Ce cycle de Krebs permet l'oxydation complète de l'acétylCoA, libérant de l'énergie sous forme d'équivalents réduits : NADH, H^+ et $FADH_2$, des substrats donneurs d'électrons à la CMR. **(Figure 14)**. Ces deux équivalents réduits vont transmettre leurs électrons respectivement au complexe I et II de la CMR. Ces électrons vont ensuite transiter par le coenzyme Q puis le complexe III, le Cytochrome C et enfin le complexe IV. Ce complexe IV permet l'arrivée des électrons jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène qui va être réduit en eau. Le passage d'électrons à chacun des complexes (I, III et IV) génère un transfert de protons vers l'espace inter-membranaire ce qui crée un gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale, nommé potentiel de membrane. Ainsi

rentre en jeu le dernier complexe mitochondriale qui est une ATP Synthase couplée à un canal entrant à protons. L'énergie dégagée par ce passage de protons permet la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate. Concernant les mEAOs, leur production est réalisée au niveau des complexes I et III par fuite d'oxygène (2 à 6%). Cet oxygène ne subit pas la réduction complète en eau mais plutôt une réduction monoélectronique générant l' $O_2^{\cdot-}$ [182]. L'implication de ces complexes dans la production d' $O_2^{\cdot-}$ varie en fonction du tissu étudié [183], de la nature du substrat et des systèmes moléculaires présents dans la mitochondrie. En effet, il est logique qu'une arrivée massive de substrats augmente la production de mEAOs en augmentant le nombre d'équivalents réduits et donc de la vitesse de fonctionnement de la CRM mais cette augmentation de production de mEAOs se réalise également en présence de céramides [184]. A l'inverse, les protéines découplantes (UCP), des canaux à proton court-circuitant l'ATP Synthase, vont diminuer le potentiel de membrane et ainsi réduire la production de mEAOs [185]. Enfin, ces mEAOs font de la mitochondrie un véritable senseur métabolique puisque la production d' H_2O_2 mitochondriale en réponse à un excès de pyruvate dans la cellule va mettre en place des voies de signalisation dirigées vers le stockage du glucose limitant secondairement l'apport d'équivalents réduits et donc de mEAOs [186].

Mais les EAOs sont également produites par les NADPH Oxydases (NOX), des enzymes qui vont, tout comme la CRM, utiliser des équivalents réduits tels que le $NADH, H^+$ et le NADPH, ainsi que de l'oxygène [187]. Ces NOX sont composées de cinq sous-unités (deux membranaires et trois cytosoliques), qui s'assemblent sous l'influence de protéines G afin de sécréter l' $O_2^{\cdot-}$ [188]. Les NOX ont tout d'abord été étudiées dans le contexte de la réponse immunitaire car elles sont très largement exprimées dans les neutrophiles et macrophages. En effet, l'isoforme phagocytaire de la NADPH Oxydase est responsable de la génèse du « burst oxydatif », cet épisode inflammatoire très violent qui survient en réponse à une infection par sécrétion massive d' H_2O_2 et OH^{\cdot} . Mais les NOX ont également un rôle non négligeable dans la croissance cellulaire [189] et la potentialisation de l'activation de récepteurs tels que le récepteur à l'insuline [190].

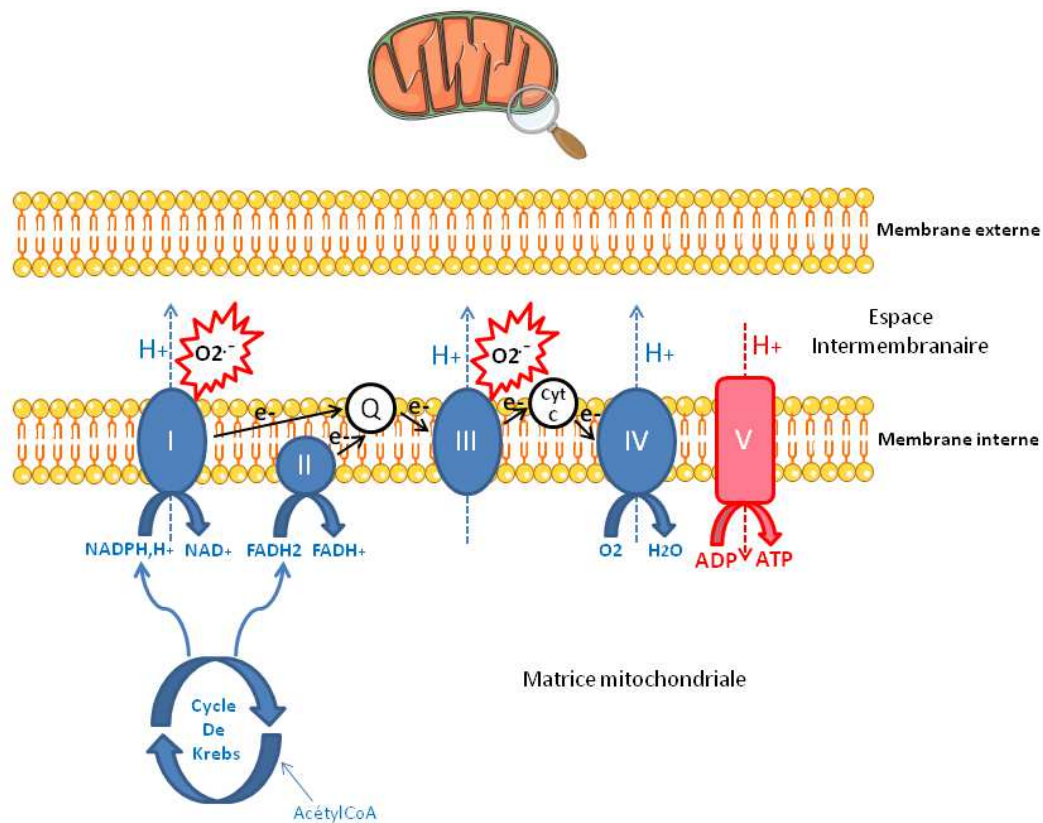


Figure 14 : Fonctionnement de la Chaîne Respiratoire Mitochondriale (CRM)

Après passage dans le cycle de Krebs, l'acétylCoA génère des équivalents réduits donneurs d'électrons tels que le NADH, H^+ et le FADH_2 . Ces deux équivalents réduits transmettent leurs électrons respectivement au complexe I et II de la CRM, électrons qui vont ensuite transiter par le coenzyme Q puis le complexe III, le Cytochrome C et l'accepteur finale : l'oxygène au niveau du complexe IV. Le dernier complexe (complexe V) est une ATP Synthase couplé à un canal à protons entrant tandis que le passage d'électrons à chacun des complexes (I, III et IV) génère un transfert de protons vers l'espace intermembranaire. Ainsi ce gradient de protons rejoint la matrice mitochondriale via le canal entrant de protons générant la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate. Au niveau des complexes I et III, la fuite d'oxygène (2 à 6%) ne subissant pas la réduction complète en eau mais plutôt une réduction monoélectronique génère l' $\text{O}_2^{\cdot -}$ et est à l'origine de la production de mEAOs.

Bien qu'ayant un rôle de molécules signalisantes, les EAOs sont pour certaines extrêmement réactives comme le confirme leur rôle de destructeur des pathogènes dans les cellules immunitaires. L'organisme possède donc des défenses antioxydantes, systèmes enzymatiques ou piègeurs d'EAOs, qui maintiennent à un niveau minime la concentration d'EAOs (**Figure 13**). La première à entrer en action est la Superoxyde Dismutase (SOD), une enzyme qui assure la transformation de l' $\text{O}_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 , et dont l'action est couplée à une autre enzyme, la catalase, qui transforme l' H_2O_2 en molécule d'eau et d'oxygène. La Glutathion Peroxydase (GPX) assure la même réaction mais, à la différence de la catalase, elle n'est pas spécifique de l' H_2O_2 . En effet, en présence de glutathion réduit, cette enzyme piège indifféremment tous les radicaux libres en générant du glutathion oxydé. Les vitamines (E, β

carotène, vitamine C...) sont également aspécifiques et captent les électrons célibataires lorsqu'elles sont à l'état réduit.

Les mitochondries ainsi que les NOX sont présentes dans le cerveau et plus précisément dans l'hypothalamus [191]. Les mEAOs ont clairement été impliquées dans la détection du glucose dans l'hypothalamus [192]. En effet l'injection intra-carotidienne de glucose (donc détectable seulement par l'hypothalamus) va générer une libération de mEAOs hypothalamiques et en périphérie une augmentation de l'insuline plasmatique. Or si le pic de mEAOs dans l'ARC est inhibé par des molécules anti-oxydantes, la libération d'insuline n'a pas lieu en réponse au glucose. Ces résultats sont en adéquation avec les résultats de Andrews *et al.* mettant en évidence un taux basal de mEAOs augmenté en réponse au glucose dans les neurones POMC de l'ARC mais pas dans les neurones NPY/AgRP [193]. Lorsque ce taux de mEAOs hypothalamique est altéré, notamment chez des rats Zucker où il augmente, la réponse insulinémique est anormale et il se produit une hypersensibilité au glucose caractérisée par une hyperinsulinémie pour des doses n'ayant aucun effet chez des rats non obèses/diabétiques [194]. Ce rôle des mEAOs en tant que second messenger de l'hypothalamus est renforcé par leur implication dans le signal satiétogène [195]. En effet, lors d'une injection ip de triglycérides, il y a une production transitoire de mEAOs hypothalamiques dans le VMN qui est nécessaire pour générer un effet satiétogène. La co-administration en icv de molécules anti-oxydantes n'inhibe pas la prise alimentaire.

Concernant les EAOs produites par les NOX, leur production est essentielle afin de générer l'effet anorexigène de l'insuline [196]. Comme en périphérie, la NOX hypothalamique libère des EAOs en réponse à une injection icv d'insuline, ce qui va permettre son effet anorexigène. Ces NOX sont également très importantes pour transmettre les signaux en périphérie puisqu'il a été montré que leur stimulation dans des régions clés contrôlant le SNA comme le NTS, Noyau Ventrolatéral Rostral du tronc cérébral mais également l'hypothalamus allait stimuler l'activité du système nerveux sympathique [197, 198].

Ainsi ces EAOs, qu'elles aient une origine mitochondriale ou enzymatique, ont un rôle de molécule signalisante aussi bien en périphérie que dans l'hypothalamus [199]. Mais lorsque la production d'EAOs dépasse les capacités des défenses antioxydantes il se met en place une inflammation massive, chronique et délétère pour l'organisme nommé stress oxydant et particulièrement présent dans le cadre d'un diabète de type 2.

Ainsi, en 1985, Helmut Sies définit le stress oxydant comme « une perturbation de la balance molécules oxydantes-molécules antioxydantes en faveur des molécules oxydantes » [200]. Cette surproduction d'EAOs est impliquée dans des oxydations protéiques, des peroxydations lipidiques et des altérations de l'ADN [201] mais également dans l'activation de kinases pro-inflammatoires particulièrement délétères pour l'organisme [201]. En synergie avec le stress du Réticulum Endoplasmique (RE) (voir point 2.3b) et l'augmentation du taux de céramides (des acides gras délétères pour le métabolisme), le stress oxydant génère l'activation des kinases Jun Kinase (JNK) et IκB Kinase β (IKKβ) [202]. Ces deux kinases vont respectivement être impliquées dans la diminution de la sensibilité à l'insuline en interférant directement avec le récepteur à l'insuline [203], ou en engendrant la synthèse de nombreuses cytokines et chimiokines proinflammatoires via le facteur de transcription NFκB [204] telles que TNFα et IL-6 [205]. Cette inflammation globale de l'organisme a tout d'abord été caractérisée en périphérie : dans le tissu adipeux [206], le foie [207], le muscle [208, 209], le pancréas [210] ; mais est également particulièrement présente au sein de l'hypothalamus.

Chez des rats nourris avec une alimentation riche en lipides, les voies JNK et IKKβ/NFκB s'activent dans l'hypothalamus [211] allant de paire avec l'augmentation de l'expression des cytokines proinflammatoires TNFα, IL-6 et IL-1β ce qui entraîne une altération de la signalisation à l'insuline [212]. Une inactivation spécifique de cette voie IKKβ/NFκB dans l'hypothalamus ou spécifiquement dans les neurones AgRP protège de l'obésité et de l'intolérance au glucose [213]. En amont de cette inflammation chronique, l'inhibition des EAOs hypothalamiques en excès générant un stress oxydant chez des animaux obèses/diabétiques conduit à une amélioration du métabolisme glucidique chez ces animaux [194]. La production des EAOs hypothalamiques est donc finement régulée puisque leur absence tout comme leur excès génère des altérations du métabolisme glucidique.

2.3 Les organelles

a) La dynamique mitochondriale

Nous avons vu précédemment ce rôle des mitochondries en tant que senseur métabolique par cette capacité à libérer des mEAOs responsables du contrôle du métabolisme glucidique, notamment au niveau hypothalamique. Mais ces organelles sont

organisées en réseaux très dynamiques, signifiant qu'elles vont changer de morphologie, de nombre et de localité en fonction de l'environnement cellulaire afin d'optimiser la fonction de la cellule [214]. Dans cette plasticité, les processus de fusion et de fission mitochondriales tiennent une place privilégiée [215]. Si on observe des mitochondries au microscope, on observe des changements perpétuels de morphologie quelque soit l'organe considéré avec un équilibre dynamique qui s'établit entre des forces de fusion et de fission [216]. Lorsque la composante fission prédomine, les mitochondries prennent un aspect granuleux, elles sont fragmentées petites et très nombreuses ; tandis que lorsque la composante fusion est majoritaire, elles deviennent longues, filamenteuses et peu nombreuses.

Des travaux de marquage des mitochondries par des fluorophores ont mis en évidence une fusion des membranes permettant le mélange des composants mitochondriaux tels que les nucléotides, protéines et complexes respiratoires [217, 218]. Chez les mammifères, ce phénomène est dépendant de deux familles de GTPases, les mitofusines (MFN1 et MFN2) [219] et Optic-Atrophy 1 (OPA1) [220] qui vont former un complexe protéique au niveau des membranes mitochondriales et provoquer la fusion de ces dernières par hydrolyse du GTP. Les mitofusines et particulièrement MFN2 sont particulièrement importantes dans l'établissement d'une interaction mitochondrie-RE nécessaire au bon fonctionnement des flux calciques indispensables au fonctionnement cellulaire [221]. A l'inverse, l'étape de fission, également consommatrice de GTP, va faire intervenir une GTPase principale Dynamine-Related Protein 1 (DRP1) qui est cytosolique et qui va être recrutée à la membrane mitochondriale par la protéine Fis1 située sur la membrane mitochondriale. Une fois transloquée sur la membrane mitochondriale, DRP1 forme un anneau contractile qui va diviser l'organelle en deux via une hydrolyse de GTP [222] (**Figure15**).

Le métabolisme énergétique influe de manière importante sur cette dynamique fission/fusion. En effet, il module l'ultrastructure des mitochondries qui prennent ainsi des conformations très différentes seulement 3 minutes après l'ajout de 2-DG, composé mimant une privation énergétique [223]. Cet équilibre fusion/fission va également changer en fonction des processus de différenciation et va évidemment être altéré dans de nombreuses maladies [224]. En parallèle, il a été mis en évidence une corrélation entre cette dynamique mitochondriale et l'augmentation de la libération d'EAOs [225]. En effet, le processus de fission est nécessaire afin de générer une production importante d'EAOs induite par fortes concentrations de glucose. Si le processus de fission est bloqué, cette production d'EAOs ne

survient pas. Ce phénomène est en lien avec une abolition de la fusion par dissipation du potentiel de membrane [225]. La CRM n'ayant plus d'énergie sous forme de potentiel de membrane, la forme filamenteuse des mitochondries n'est plus requise pour transmettre cette énergie à travers toute la cellule [226].

Cette dynamique mitochondriale est donc primordiale dans la détection du glucose, et plus particulièrement au niveau hypothalamique. En effet ces dernières années, l'utilisation d'animaux knock-out ou de siRNA a pu considérablement faire évoluer l'étude de cet équilibre fusion/fission en agissant sur les acteurs GTPasiques (**Figure 16**). Ainsi l'absence de DRP1 par injection intra-structurale de siRNA dirigés contre la protéine DRP1 dans le VMN et l'ARC empêche la production de mEAOs en réponse à une injection ic de glucose et altère la réponse insulinémique et satiétogène [227].

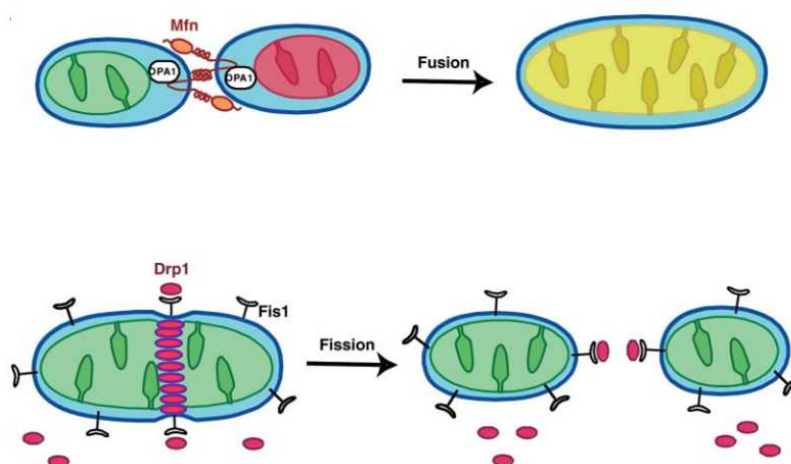


Figure 15 : Dynamique Mitochondriale (d'après [228]).

Le phénomène de fusion fait intervenir deux types de protéines GTPases, Optic-Atrophy 1 (OPA1) et les mitofusines (Mfn) formant un complexe protéique au niveau des membranes mitochondriales afin de les fusionner par hydrolyse du GTP. Le phénomène de fission a lieu via le recrutement à la membrane de la GTPase cytosolique Dynamine-Related Protein 1 (Drp1) par la protéine membranaire Fis1. DRP1 forme alors un anneau contractile qui va diviser l'organelle en deux via une hydrolyse de GTP.

Les mitochondries des animaux ayant reçu le siRNA présente une diminution de l'activité de la CRM en réponse aux substrats ce qui place DRP1 au centre de la signalisation mEAOs-hypothalamique induite par le glucose. En parallèle, Claret *et al.* met en évidence une diminution hypothalamique de MFN2 chez des animaux obèses/diabétiques tandis qu'une injection d'adénovirus exprimant cette GTPase permet d'améliorer ce phénotype [229].

Comme attendu, les animaux déficients pour la MFN2 dans les neurones à POMC vont présenter un phénotype obèse doublé d'une hyperphagie, une résistance à la leptine, une diminution de la dépense énergétique et une altération des neurones à POMC. Au sein de ces neurones POMC, cette absence de MFN2 induit une réduction des interactions Réticulum Endoplasmique-mitochondrie, ainsi qu'un dysfonctionnement des mitochondries qui est caractérisé par une augmentation de la production des EAOs. A l'inverse, cette absence de MFN2 dans les neurones AgRp protège les animaux de l'obésité induite par un régime riche en gras [230]. Cette protection étant principalement due à une diminution des taux d'ATP intracellulaires générant une activité électrique aberrante de ces neurones AgRP et présumant ainsi une altération mitochondriale.

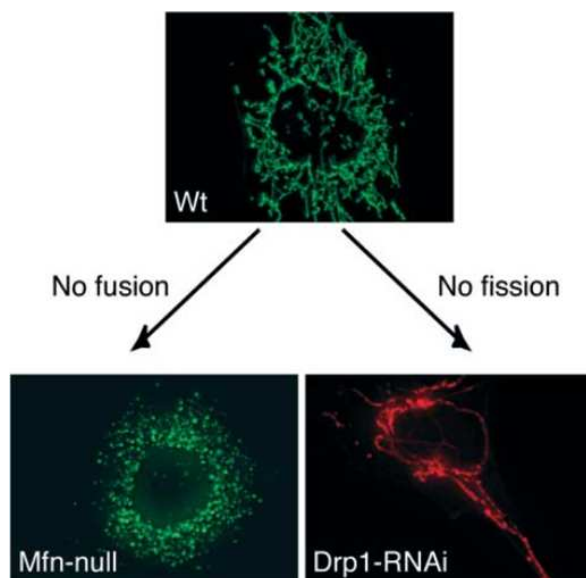


Figure 16 : Modèles d'étude de l'équilibre fission/fusion (d'après [228]).

Dans le cas d'un modèle de souris knock-out pour les mitofusines (*Mfn-null*), les mitochondries ne peuvent plus fusionner et restent à l'état granuleux, fragmentées, elles sont petites et très nombreuses.

A l'inverse lors de l'ajout de siRNA dirigé contre la molécule Dynamine-Related Protein 1 (*Drp1*), les mitochondries restent à l'état de fusion et sont donc longues, filamenteuses et peu nombreuses.

b) Le Réticulum Endoplasmique (RE)

Le RE est une organelle intracellulaire clef dans la synthèse et la maturation des protéines, mais c'est également une importante réserve de calcium et en lien avec les mitochondries il va avoir un rôle important dans le métabolisme [231]. Concernant sa composante sécrétrice, le RE vérifie la bonne conformation des protéines et dirige les « non-réparables » vers un système de dégradation nommé Endoplasmique-Réticulum-Associated-Dégradation (ERAD) [232]. Lorsque la quantité de protéines anormales est très importante, les capacités du RE sont dépassées et il se produit un stress du RE. Ce stress du RE, au même titre que le stress oxydant, va être impliqué dans l'inflammation de « bas bruit »

caractéristique du diabète de type 2, par activation de kinases proinflammatoire (JNK, IKK β , NF κ B... etc) et par induction de gènes pro-apoptotique.

Le stress du RE en lien avec la pathologie diabétique est retrouvé dans la majorité des organes périphériques [233]. Ainsi, au sein du pancréas, ce stress du RE en lien avec une augmentation du stress oxydant, génère un dysfonctionnement de la cellule β conduisant à l'apoptose [234]. Au sein du tissu adipeux, ce stress du RE induit une inflammation importante par productions de nombreuses cytokines proinflammatoires [235], tandis qu'il est à l'origine d'une insensibilité à l'insuline dans le foie et le muscle entraînant respectivement une production hépatique de glucose [236] et une diminution du transport du glucose [237]. Son rôle est particulièrement important dans l'hypothalamus car l'induction d'un stress du RE spécifiquement dans cette région centrale génère des caractéristiques d'un diabète de type 2 [238]. L'injection en icv de Thapsigargin, un inhibiteur des pompes à calcium du RE induisant un stress, génère en trois jours une intolérance au glucose et à l'insuline, couplée à augmentation de la production hépatique de glucose et de l'activité du SNA. A l'inverse, une injection icv de TUDCA, un inhibiteur du stress du RE, chez des animaux rendus obèses/diabétiques par un régime gras améliore les paramètres précédemment cités. Ce stress du RE est également présent dans le modèle génétique d'animaux obèses/diabétiques db/db [176]. En effet, ces souris knock-out pour le récepteur de la leptine présentent une augmentation des marqueurs du stress du RE dans l'intestin mais également dans l'hypothalamus. Ce processus inflammatoire est impliqué dans l'altération de la voie NOergique hypothalamique en réponse au glucose intestinale, conférant au stress du RE et à l'inflammation hypothalamique, un rôle clef dans la genèse de la pathologie diabétique.

3. Interrelation Hypothalamus-Tissus Périphériques et Tissus Périphériques-Hypothalamus dans le contrôle de la glycémie en conditions normales et pathologiques

Dans un contexte physiologique, nous avons vu que l'hypothalamus reçoit des informations issues de la périphérie qui vont moduler l'activité neuronale. Ainsi des signaux

« dits rapides » tels que les afférences nerveuses issues du tractus digestif et/ou de senseurs ainsi que des signaux dits « à long terme » telles que l'insuline, la leptine... stimulent l'hypothalamus, qui, en retour, élabore une réponse appropriée, dirigée vers les tissus cibles périphériques via le SNA, afin de maintenir la glycémie stable (**Figure 17**). Une perturbation de cette boucle de régulation aussi bien dans l'intégration neuronale, la transmission via le SNA ou la réponse périphérique, va générer une altération du maintien de cette glycémie [239].

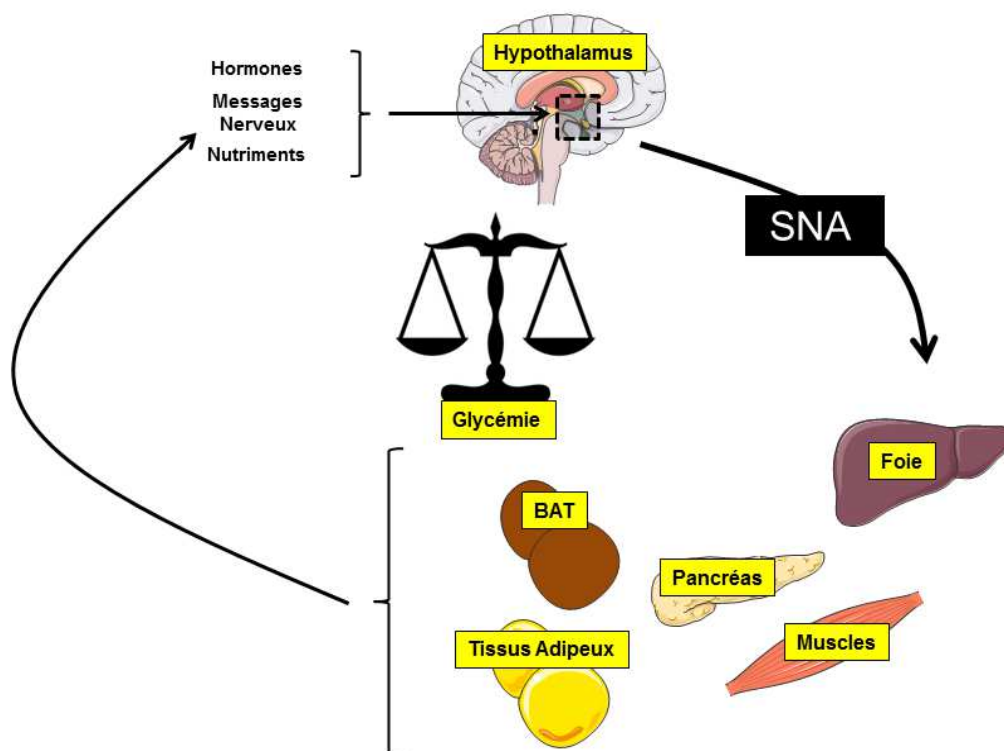


Figure 17 : Schéma intégré de la régulation de la glycémie

Dans la physiologie générale, l'hypothalamus reçoit des informations issues de la périphérie telles que des hormones (insuline, leptine...), des afférences nerveuses et des métabolites (glucose ...) qui vont modifier l'activité neuronale hypothalamique. L'hypothalamus génère une réponse transmise aux tissus périphériques, majoritairement sous contrôle du système nerveux autonome (SNA). Les tissus ciblés sont le tissu adipeux brun (BAT), le tissu adipeux blanc, le pancréas, le foie et les muscles. Des ajustements constants dans cette boucle de régulation permettent de maintenir la glycémie stable.

a) Le pancréas

Dans le contrôle du métabolisme glucidique, le pancréas sécrète les deux hormones historiques régissant le maintien de la glycémie, l'insuline et le glucagon. Cet organe est composé de cellules spécialisées organisées en îlots cellulaires et nommées les îlots de Langerhans.

Insuline

Au sein de ces îlots, les cellules majoritaires sont les cellules β , sécrétrices d'insuline. Comme nous l'avons vu précédemment, l'augmentation de glucose sanguin va être détectée par ces cellules et générer l'exocytose des vésicules d'insuline (**voir figure 10**). Cette libération d'insuline s'effectue également sous l'influence du SNA, et plus particulièrement du système nerveux parasympathique [240]. Le récepteur de l'insuline est principalement exprimé sur le foie, le muscle et le tissu adipeux, à travers lesquels elle induit son action anabolisante [241]. L'action la plus connue de l'insuline est sa capacité à diminuer la glycémie en activant la translocation à la membrane de transporteurs au glucose sur des organes insulino-sensibles tels que les muscles ou le tissu adipeux. Ce transporteur insulino-dépendant se nomme GLUT4 et va conduire à la synthèse de glycogène dans le muscle, une forme de stockage du glucose, via la glycogénogenèse et stocker le glucose sous forme de lipide, via la lipogénèse, dans le tissu adipeux. L'insuline va également favoriser la glycogénogenèse dans le foie et inhiber la néoglucogenèse.

Au niveau central, il a été prouvé que l'insuline traversait la BHE par un système de transporteurs saturables [242, 243] et que son récepteur était fortement exprimé au sein du SNC [244]. Ainsi, une injection d'insuline dans le 3^e ventricule (ciblant ainsi l'hypothalamus) ou dans le 4^e ventricule (ciblant ainsi le NTS) va générer une diminution de la production hépatique de glucose [245, 246] et augmenter la synthèse de glycogène musculaire [151]. Cette action de l'insuline centrale sur la glycémie via la modulation de la production hépatique de glucose passe par le SNA car elle est perdue chez des chiens ayant subi une vagotomie [247]. L'action directe de l'insuline sur les organes spécialisés dans le stockage du glucose est donc renforcée par son action centrale. Mais cette action centrale est primordiale puisque des animaux invalidés pour les récepteurs à l'insuline seulement dans les neurones (souris NIRKO) présentent une hyperphagie et une insulino-résistance [248]. Les mêmes résultats sont trouvés en invalidant ce récepteur dans l'hypothalamus [249]. Ce phénotype est en accord avec la modulation de neurones par l'insuline comme les neurones POMC qui sont stimulés par une injection ip d'insuline [250]. Ces mêmes neurones verront leur libération d' α -MSH augmenter en réponse à une injection icv d'insuline tandis que la libération de NPY sera diminuée dans l'ARC [251, 252]. Cette action centrale de l'insuline est perdue dans un modèle d'animaux rendus obèses par un régime riche en gras mais retrouvée lorsque la nourriture devient plus équilibrée [253].

Ainsi, l'insuline circulante oriente l'organisme vers des actions anaboliques via une action centrale, mais des messagers circulants vont également agir sur la sécrétion d'insuline via l'hypothalamus. En effet, la stimulation électrique du nerf vague ou du LH induit la libération d'insuline par les cellules β pancréatiques, action qui est exacerbée en condition d'hyperglycémie [254]. Un réseau d'afférences nerveuses issues des papilles, de la sphère gastro-intestinale [255] et de la veine hépatoportale [256] va donc atteindre l'hypothalamus et générer une sécrétion d'insuline sous contrôle du système nerveux parasympathique. Un pic d'insuline, bien que modeste, a lieu avant que le glucose atteigne l'estomac, anticipant ainsi l'hyperglycémie post-prandiale [257]. Les régions hypothalamiques qui semblent participer à ce contrôle de la sécrétion d'insuline, en plus du LH sont l'ARC et le PVN car une injection de glucose en ic génère un marquage c-Fos dans ces deux régions, suivi d'une libération d'insuline [124]. Au sein de l'ARC, les neurones à NPY sont impliqués dans la libération d'insuline puisqu'une injection icv de NPY induit en 6 jours une hyperinsulinémie même chez des animaux mangeant la même quantité d'aliments que des contrôles non injectés (pair-fed) [258].

Au sein de l'hypothalamus, une injection de glucose en ic génère une production de mEAOs et engendre en 1 minute un pic d'insuline périphérique sans modifier la glycémie [192]. La co-administration de molécules antioxydantes spécifiques (catalase) ou aspécifiques (trolox) inhibe ce pic d'insulinémie suggérant un rôle clef de ces mEAOs dans le contrôle de la libération d'insuline. Durant un diabète de type 2, cette sensibilité au glucose est complètement altérée et on observe une hypersensibilité de l'hypothalamus caractérisée par une production de mEAOs en réponse à des faibles doses de glucose [194]. Dans la physiologie, une injection ic de glucose à 3mg/kg ne génère pas de pic d'insuline tandis que chez des rats Zucker, l'insulinémie augmente transitoirement, en lien avec un statut redox altéré. Lorsque ce statut redox est restauré grâce à un traitement chronique de glutathion pendant trois jours, une sensibilité au glucose physiologique est retrouvée. Ces résultats sont en corrélation avec les neurones GE hypothalamiques. En effet, les POMC semblent des candidats idéales pour faire partie des GE hypothalamiques [106] et leur altération conduit à la pathogenèse diabétique [259].

Parmi les messagers nutritionnels autre que le glucose, une augmentation des taux de lipides par injection intra-jugulaire (ciblant le cerveau) va également générer une libération

d'insuline sous contrôle du système nerveux parasympathique [260] tout en générant une production de mEAOs hypothalamiques [195].

Glucagon

Au sein des îlots de Langerhans, le pancréas sécrète également une hormone dont les effets sont les exacts opposés de ceux de l'insuline, le glucagon libéré par les cellules α . En effet, une fois libéré dans la circulation sanguine en réponse à une baisse de la glycémie, il va engendrer des actions tournées vers le catabolisme telles que la libération de glucose via la glycogénolyse et la néoglucogenèse [261]. Tout comme l'insuline, le glucagon passe la BHE et son récepteur est exprimé dans l'hypothalamus [262, 263]. Étrangement, le glucagon possède les mêmes effets que l'insuline en central sur la prise alimentaire puisqu'il engendre un effet satiétogène [264]. L'inhibition de la prise alimentaire semble due à une libération de CRF impliquant l'axe hypothalamo-hypophysaire mais ce mode de régulation du glucagon reste encore à identifier [265]. Il est pourtant établi que cette hormone possède une action directe sur les neurones hypothalamiques puisqu'elle inhibe l'activité électrique de neurones glucosensibles du LH sans affecter ceux du VMH [262]. Concernant le métabolisme glucidique, le glucagon injecté en icv va avoir un effet hyperglycémiant [266], hyperglycémie qui est exacerbée lorsque les taux injectés sont très élevés et similaires aux taux retrouvés chez des animaux obèses/diabétiques [267]. Cette action hypothalamique du glucagon est perdue si le modèle a subi une sympathectomie ou une adrénalectomie bilatérale, renforçant le rôle du SNA et de l'axe hypothalamo-hypophysaire dans ce contrôle cerveau-périphérie du métabolisme glucidique.

Tout comme l'insuline, la sécrétion du glucagon est contrôlée par l'hypothalamus. Ainsi, une chute de la glycémie est détectée au niveau de la veine portale, générant une augmentation de l'activité du SNS ciblant les cellules α du pancréas qui libèrent du glucagon [268]. Cette libération de glucagon en réponse à une hypoglycémie peut être bloquée par une injection de glucose dans le VMN et restaurée si de façon concomitante à cette injection intra-VMN de glucose, est également injecté un antagoniste des récepteurs GABA_A [269]. L'acteur hypothalamique impliqué dans cette détection au niveau du VMN semble être le NO [172]. En effet, une injection intra-VMN de L-NMMA (un inhibiteur des NOS) ralentit le

rétablissement d'une euglycémie en réponse à une hyperinsulinémie et diminue le taux d'adrénaline plasmatique, un reflet de l'activité sympathoadrénérique.

Ainsi via son action endocrine, qu'elle soit directe sur les organes permettant l'adaptation rapide de l'organisme aux fluctuations de glucose, mais également indirecte sur les neurones du système nerveux central, le pancréas contribue de façon non négligeable à la régulation de la balance glucidique. En parallèle, la libération de ces deux hormones est très finement contrôlée par l'hypothalamus, sous contrôle du SNA et en réponse aux différents stimuli périphériques informant en temps réel sur le statut énergétique de l'organisme.

b) Le foie

Le foie est un organe primordial dans le contrôle du métabolisme glucidique. Il est le principal organe de stockage et de production de glucose pour le reste de l'organisme. Pendant un repas, le glucose absorbé par l'intestin va transiter vers le foie via la veine porte hépatique. Au sein de celle-ci se trouve des systèmes de détection au glucose qui assurent un relais nerveux vers le NTS et l'hypothalamus, informant ainsi le cerveau sur les stocks de glucose [270].

Le foie est un organe insulino-sensible, c'est-à-dire qu'il va être capable de stocker le glucose sanguin en réponse à une sécrétion d'insuline par le pancréas. Ainsi durant la période postprandiale qui peut se prolonger jusqu'à 2 heures après un repas, la glycémie va augmenter et 10 à 25% du glucose ingéré est stocké dans les hépatocytes [271]. C'est le transporteur de glucose GLUT2 qui permet cette entrée massive de glucose en fonction de son gradient de concentration dans l'hépatocyte. Une fois entré dans la cellule hépatique, le glucose est phosphorylé par une glucokinase (GK) en glucose-6-Phosphate (G6P), l'empêchant ainsi de ressortir de la cellule. En condition de jeûne, la GK est séquestrée dans le noyau par la Glucokinase Regulatory Protein (GCKR). Les concentrations élevées de glucose [272] et l'insuline [273] vont la transloquer dans le cytoplasme afin qu'elle synthétise du G6P, molécule au carrefour de différentes voies métaboliques dont la glycolyse mise en place pour produire de l'énergie cellulaire et la glycogénogénèse pour stocker le glucose dans la cellule.

Ainsi, une fois formé, le G6P peut être directement oxydé, comme dans la majorité des organes, et transformé en molécules de pyruvate et d'ATP. Cette oxydation du glucose se nomme la glycolyse. Elle est stimulée par l'insuline et l'ADP au niveau d'enzymes clefs telles que la GK, la Phosphofructokinase, la Pyruvate Kinase et la Pyruvate Déshydrogénase (**Figure 18**). Par la suite, la phosphorylation oxydative réalisée au sein de la mitochondrie va permettre de synthétiser de l'ATP au niveau de la CRM.

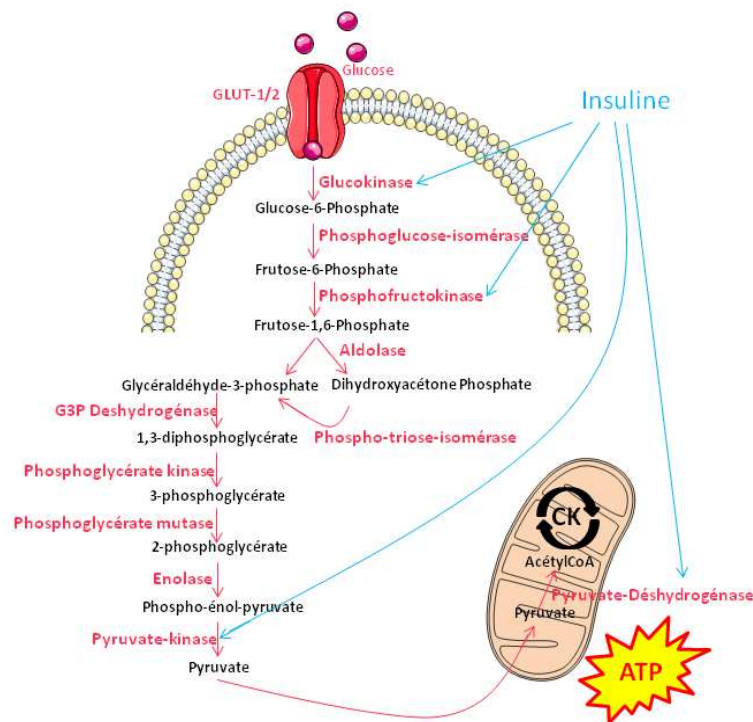


Figure 18 : Glycolyse

Le glucose entre dans l'hépatocyte par diffusion passive via le récepteur GLUT-1/2. Celui-ci est ensuite transformé en Glucose-6-Phosphate par la Glucokinase et s'engage dans la voie de la glycolyse pour aboutir à la formation de pyruvate. Ce composé subit ensuite la phosphorylation oxydative au sein de la mitochondrie afin de générer de l'ATP. L'insuline va contrôler ce processus de glycolyse au niveau de 4 enzymes principales, la Glucokinase, la Phosphofructokinase, la Pyruvate-Kinase et la Pyruvate Déshydrogénase.

Lorsque les stocks d'ATP cellulaires sont suffisants, le G6P va s'orienter vers la voie de stockage de l'organisme ; la glycogénogenèse, une voie métabolique qui synthétise du glycogène, un polymère de glucose (**Figure 19**). L'enzyme terminale de cette synthèse est la Glycogène Synthase (GS) qui va être déphosphorylée (donc activée) par l'insuline, le G6P, et des protéines telles que la Protéine Phosphatase 1 (PP1) tandis qu'en parallèle l'enzyme réalisant la réaction inverse, la glycogène phosphorylase (GP), sera inactivée [274]. En condition de diabète, cette glycogénogenèse est moins effective. En effet des souris rendues obèses/diabétiques présentent des taux de glycogène et d'enzymes de la glycogénogenèse moins élevés [275].

Dans le cas d'un jeûne, les taux d'ATP cellulaires s'épuisent, la glycémie sanguine diminue et le foie, le principal producteur de glucose en cas d'hypoglycémie, met en place la lyse de ses stocks de glycogènes, la glycogénolyse (**Figure 19**). Cette voie métabolique est notamment activée en réponse au glucagon, à l'adrénaline et à l'AMPK qui agissent principalement sur la GS en la phosphorylant [276]. Le G6P généré est transformé en glucose par la Glucose-6-Phosphatase (G6Pase) et peut ainsi rejoindre la circulation sanguine via GLUT2. Cette G6Pase hépatique est primordiale puisqu'elle permet cette sortie de glucose de l'hépatocyte, ce qui la différencie par exemple de la cellule musculaire qui réalise aussi la glycogénolyse mais ne possède pas cette enzyme clef. Son expression est induite par le jeûne et inhibée par l'AMPK [277].

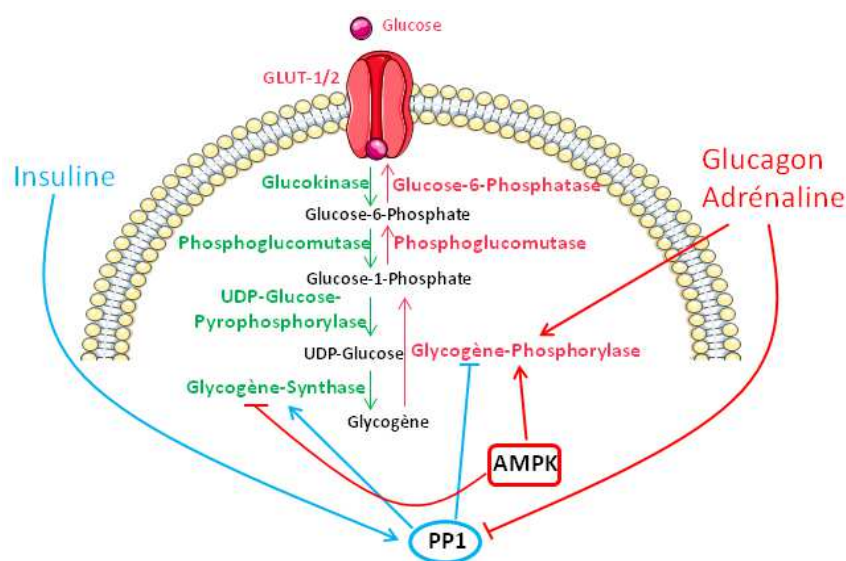


Figure 19 : Glycogénogenèse et Glycogénolyse

Le glucose entre dans l'hépatocyte par diffusion passive via le récepteur GLUT-1/2. Au sein de cette cellule il est transformé en Glucose-6-Phosphate par la Glucokinase puis entre dans la voie de la glycogénogenèse afin de générer la forme de stockage de glucose, le glycogène. Cette voie de synthèse est stimulée par l'insuline qui va activer la Protéine Phosphatase 1 (PP1), favorisant l'activité de l'enzyme terminale de la glycogénogenèse : la Glycogène-Synthase. La lyse du glycogène afin de générer du glucose est la Glycogénolyse, voie métabolique stimulée par l'AMPK, le glucagon et l'adrénaline qui vont activer la Glycogène-Phosphorylase et inhiber PP1. L'enzyme terminale de la glycogénolyse est la Glucose-6-Phosphatase qui va transformer le Glucose-6-Phosphate en glucose, lui permettant de sortir de l'hépatocyte afin de rejoindre la circulation sanguine.

La dernière voie métabolique permettant de produire du glucose dans des phases de jeûne prolongé est la néoglucogenèse. La mise en place de cette voie permet au foie de créer du glucose à partir de substrats non-glucidiques comme le lactate/pyruvate (d'origine majoritairement musculaire), les acides aminés et le glycérol (d'origine adipeuse) qui arrivent dans les hépatocytes via la veine porte (**Figure 20**). Cette étape métabolique a lieu également dans le rein qui contribue pour 10% du glucose produit et dans l'intestin où elle a

surtout un rôle de voie de signalisation [278]. Ainsi, le foie est le principal organe produisant du glucose pendant le jeûne [279]. Il va être stimulé directement par le glucagon, les glucocorticoïdes et l'adrénaline qui vont générer une libération d'AMPc modulant l'expression d'enzymes clefs comme la PhosphoEnol-Pyruvate CarboxyKinase (PEPCK) ou leurs activités comme la Fructose-1,6-biphosphatase [280, 281]. L'enzyme PEPCK a longtemps été considérée comme l'enzyme limitante de la néoglucogenèse. Son expression étant physiologiquement inhibée par l'insuline, cette enzyme est constamment en activité durant un diabète de type 2 et serait en partie responsable de la production hépatique de glucose constante caractéristique de cette pathologie [282]. La G6Pase possède également un rôle clef. En effet, cette enzyme hépatique terminale pour la production hépatique de glucose (glycogénogenèse et néoglucogenèse) se situe dans le RE et va être recrutée dans le cytoplasme en réponse à une augmentation d'AMPc par exemple [283]. Chez des animaux obèses/diabétiques, il a été montré que son activité est augmentée [284]. et son inhibition dans le foie de rat redirige le glucose vers la voie glucogénogénique, en faisant une cible potentielle dans le traitement du diabète de type 2 [285].

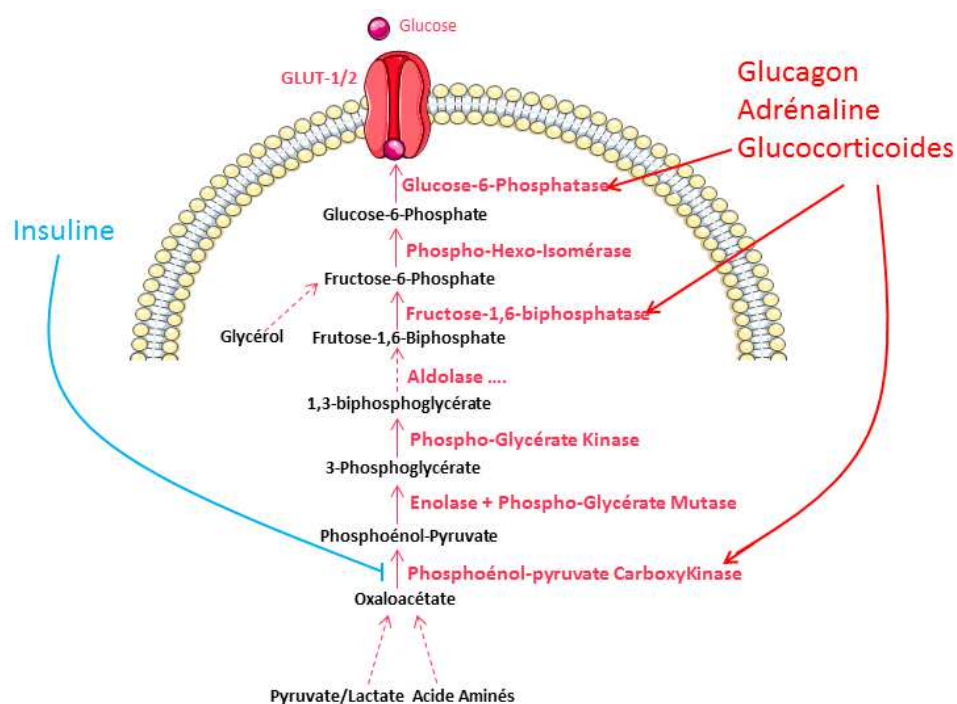


Figure 20 : Néoglucogenèse

La néoglucogenèse est la synthèse de glucose à partir de substrats non glucidiques comme le pyruvate, le lactate, les acides aminés ou le glycérol arrivant au niveau de l'hépatocyte via la veine porte hépatique. Cette voie métabolique est inhibée par l'insuline au niveau d'une enzyme clef, la PhosphoEnol-Pyruvate CarboxyKinase (PEPCK) tandis qu'elle va être stimulée par le glucagon, l'adrénaline et les glucocorticoïdes au niveau de trois enzymes clefs ; la PEPCK, la Fructose-1,6-biphosphatase et la glucose-6-phosphatase. L'enzyme terminale de la néoglucogenèse est la Glucose-6-Phosphatase qui génère le glucose libéré dans la circulation via le transporteur GLUT-1/2.

S'ajoute à ce contrôle endocrine par le système insuline/glucagon, un contrôle nerveux de la sphère hépatique sous la dominance du cerveau. En effet, le foie est largement innervé par le SNA, et plus particulièrement les hépatocytes qui sont directement en contact avec les fibres parasympathiques et sympathiques démontrant un contrôle nerveux direct de la production hépatique de glucose [286]. Cette riche innervation va engendrer des actions anaboliques telles que la glycogénogenèse via le SNP tandis que les phénomènes de catabolisme (glycogénolyse et néoglucogenèse) seront médiés par le SNS [279].

L'hypothalamus est largement impliqué dans ce contrôle du foie via le SNA puisque la stimulation électrique du VMN [287] ainsi que l'activation directe des fibres nerveuses sympathiques hépatiques [288, 289] génère une augmentation de la production hépatique de glucose par augmentation de l'activité des enzymes GP et G6Pase. Le même effet est retrouvé chez des animaux ayant subi une adrénalectomie ou lors d'une stimulation directe du SNS. A l'inverse, la stimulation électrique du LH va diminuer le glucose sanguin par activation de la GS et inhibition de la PEPCK [288, 289]. Une activation directe des fibres nerveuses parasympathiques hépatiques produisent également une baisse de la production hépatique de glucose Au niveau machinerie moléculaire de l'hypothalamus, les canaux K_{ATP} , abordés dans les chapitres précédents, semble posséder un rôle clef puisqu'une injection icv d'un bloqueur de ces canaux empêche la suppression de la production hépatique de glucose médiée par l'insuline avec des augmentations d'expression d'enzymes hépatiques clefs telles que G6Pase et PEPCK [290].

Dans la détection du glucose, s'ajoute à ces deux noyaux hypothalamiques (VMN et LH), la veine hépato-portale. En effet, en réponse à un repas riche en carbohydrates, le gradient glucidique négatif artère/veine porte produit une captation du glucose par le foie [291]. Ce phénomène est complètement perdu chez des chiens ayant subit une dénervation complète du foie [292]. Cette détection du glucose par la veine hépato-portale contrôle également l'utilisation du glucose par les muscles, le BAT et le cœur [293]. En effet, la perfusion de glucose dans la veine hépato-portale à une dose correspondant à la production endogène de glucose pendant le stade post-prandial, génère une hypoglycémie et une augmentation de l'utilisation du glucose par les muscles oxydatifs via une voie de signalisation en partie indépendante de l'insuline. Ces données suggèrent une implication de cette détection hépato-portale dans le contrôle de l'hyperglycémie post-prandiale. Des travaux de cette même équipe mettent en évidence le rôle de GLUT-2 dans la détection du glucose au niveau

de la veine hépato-portale car l'expérience précédemment citée d'injection de glucose en veine porte ne génère pas d'hypoglycémie chez des animaux GLUT-2 knock-out [294].

Un organe longtemps considéré comme une simple voie de passage des nutriments, la sphère gastro-intestinale, est en fait le premier lieu de détection du glucose. En effet, comme mentionné précédemment, la présence d'aliment au niveau des papilles va générer une légère hyperinsulinémie afin de préparer l'organisme à la phase post-prandiale. Mais au sein de l'estomac et de l'intestin, la présence de glucose va engendrer la libération de molécules nommées les incrétines comportant notamment le Glucagon Like Peptide-1 (GLP-1) [295]. Le GLP-1 est synthétisé et sécrété par les cellules entéroendocrines L de l'intestin mais également dans le tronc cérébral [296]. Cette configuration révèle une sécrétion de GLP-1 dans l'intestin en réponse à une arrivée de glucose, ce qui va ainsi activer des afférences vagales générant au niveau du cerveau et plus précisément au niveau hypothalamique, une libération de GLP-1 [297]. Ce GLP-1 central, en condition hyperglycémique, va stimuler la sécrétion d'insuline tout en générant une résistance à l'insuline musculaire transitoire [298]. Ce blocage de la captation du glucose par les muscles permet indirectement une augmentation de la synthèse de glycogène hépatique et prépare ainsi les réserves de glucoses pour palier à des situations de jeûne. Le GLP-1 est également un acteur clef dans le phénomène de détection de glucose par la veine hépato-portale [299]. La co-administration de glucose et d'un antagoniste du GLP-1 (l'Exendin-9) en veine porte inhibe l'hypoglycémie post-prandiale et la clairance du glucose. Cette absence d'effets est retrouvée chez des animaux invalidés pour le récepteur au GLP-1, plaçant le GLP-1 au centre de la détection du glucose hépato-portale.

c) Les muscles squelettiques

Les muscles représentent 30% du poids du corps et tiennent par conséquent une place non négligeable dans le métabolisme de l'organisme. Gros consommateurs de glucose, ils vont utiliser près d'un tiers du glucose sanguin dans des voies métaboliques telles que la glycolyse pour son utilisation directe ou la glycogénogenèse afin d'établir des réserves [300]. Le muscle possède quasiment la même machinerie enzymatique que le foie, excepté la GK remplacée par une Hexokinase qui va être inhibée par des taux trop élevés de G6P et qui est donc saturable. Tout comme le foie, il peut faire de la glycogénogenèse et de la

glycogénolyse mais ne peut libérer du glucose dans la circulation sanguine car il ne possède pas la G6Pase. Ainsi, le glucose musculaire ne sera utilisé que pour le propre métabolisme de cet organe.

Cette entrée du glucose dans le muscle est sous la dépendance de l'insuline qui va induire la translocation à la membrane du transporteur GLUT4. C'est le premier organe touché par le phénomène d'insulino-résistance caractéristique du diabète de type2 qui va se traduire par une diminution de GLUT4 à la membrane [301].

Les muscles sont également sous la dépendance du cerveau via le SNA [302]. En effet, l'injection de leptine (voir point suivant) ou d'orexine dans le VMN va générer une augmentation de la captation de glucose dans le muscle via le SNS et les récepteurs β 2-adrénergiques [71, 303]. Cette voie de régulation stimule également la voie de l'insuline [304]. Ainsi, cette convergence d'effets sur l'entrée de glucose dans le muscle via une voie de signalisation hypothalamus-SNA-récepteurs β 2-adrénergiques est donc particulièrement intéressante dans le contrôle du maintien de la glycémie.

Concernant les acteurs hypothalamiques impliqués dans le métabolisme glucidique musculaire, le GLP-1 central possède une place privilégiée. En effet, une perfusion intragastrique (ig) de glucose ne modifiant pas la glycémie périphérique, et donc n'engendrant pas d'hyperglycémie périphérique, va générer une augmentation du marquage c-Fos dans le NTS, une diminution dans les noyaux hypothalamiques VMN, DMN et ARC ainsi qu'une augmentation de la synthèse de glycogène musculaire [297]. Cette action sur le muscle est perdue chez des animaux recevant en icv une injection d'Exendin 9 mais également chez des animaux knock-out pour le récepteur GLP-1 renforçant le rôle de ce GLP-1 central. La même expérience réalisée chez des animaux obèses/diabétiques révèle une détérioration de cet axe intestin-cerveau-muscle et de cette action centrale du GLP-1.

En parallèle, une injection icv d'Exendin 4, un agoniste des récepteurs au GLP-1, génère une diminution de l'activité des NOS et de la concentration des EAOs hypothalamiques, corrélées à une augmentation des molécules antioxydantes [305]. Ces effets hypothalamiques engendrent, sous clamp hyperglycémique, une diminution du flux sanguin périphérique sous contrôle du SNA. Une diminution de ce flux sanguin périphérique est associée à une diminution de l'utilisation périphérique du glucose. Ces effets sont perdus chez des animaux

subissant de façon concomitante à l'injection d'Exendin 4, une injection icv d'Exendin 9 ou d'H₂O₂.

d) Les tissus adipeux

Les tissus adipeux sont la plus grande réserve de lipides de l'organisme. Ils permettent de palier à une déficience énergétique durant un jeûne en libérant des acides gras dans la circulation sanguine. Parmi les tissus adipeux, sont retrouvés les classiques tissus adipeux blancs nommés White Adipose Tissue (WAT) dont les deux principaux sont le tissu adipeux viscéral et le tissu adipeux sous-cutané ; mais également un tissu particulier, le tissu adipeux Brun nommé Brown Adipose Tissue (BAT).

Le BAT, contrairement au WAT, possède des adipocytes non spécialisés dans le stockage, mais gorgés de mitochondries et transformant l'excédant énergétique en énergie thermique [306]. La CRM de ces mitochondries contient un canal particulier UCP1, qui comme nous l'avons vu précédemment, va dissiper le gradient de protons, ne générant donc pas de production d'ATP mais libérant de la chaleur. Cet organe est particulièrement impliqué dans la dépense énergétique car des animaux ayant subi une délétion d'UCP1 présente un phénotype obèse [307]. La dissipation d'énergie sous forme de chaleur est stimulée par l'insuline et le froid mais l'activité du BAT est également largement contrôlée par le cerveau. En effet, l'injection de BDNF dans le PVN et le VMN va stimuler la dépense énergétique [308, 309] via le SNS [310]. Ce tissu présente la particularité d'être inductible à partir d'adipocytes de WAT via une cascade transcriptionnelle faisant intervenir le facteur de transcription PRDM16, un acteur déterminant dans cette plasticité des tissus adipeux [311]. Le BAT est en effet une piste prometteuse dans le traitement du diabète puisque la greffe de BAT chez une souris rendue diabétique par un régime gras a permis de restaurer le métabolisme glucidique [312].

Longtemps considéré comme un simple organe de stockage des lipides, le WAT va effectivement mettre en réserve le glucose sanguin en excès sous forme de gouttelette lipidique (lipogenèse), mais il va également intervenir dans l'homéostasie glucidique en sécrétant dans la circulation sanguine des facteurs bioactifs nommés adipokines. Le caractère endocrine du tissu adipeux a été mis en évidence par des expériences de parabioses

réalisées par Coleman dans les années 60 et résumées dans un récent article [313]. Cette expérience consiste à mettre en contact le tissu cutané de deux animaux afin de permettre la diffusion de facteurs humoraux de l'un à l'autre. La circulation d'une souris db/db (n'exprimant pas le récepteur à la leptine [314]) a ainsi été croisée avec celle d'une souris normale générant le décès de cette dernière par une absence totale d'alimentation. « Le facteur » sécrété par le tissu adipeux de la souris db/db, mais n'ayant aucun effet chez elle, était donc responsable de cette absence de prise alimentaire chez la souris normale. En effet, les souris db/db possèdent des taux de leptine circulants très élevés auxquels elles sont totalement insensibles puisqu'elles ne possèdent pas le récepteur. Par contre, la souris normale est sensible à ces forts taux de leptine qui vont engendrer une inhibition de la prise alimentaire et aboutir à la mort de l'animal. Suite à cette expérience historique, de nombreuses découvertes d'adipokines ont permis de placer l'adipocyte comme une véritable cellule sécrétoire qui régule de manière autocrine son propre métabolisme glucidique mais également celui de l'organisme.

La leptine

La leptine, découverte en 1994, est considérée comme la première adipokine mise en évidence et impliquée dans le métabolisme énergétique [315]. Cette adipokine est le produit du gène *ob* (communément appelé « gène de l'obésité ») et est sécrétée proportionnellement à la masse de tissu adipeux, elle est ainsi considérée comme un reflet de l'adiposité. Par contre, les souris mutantes délétées pour le gène *ob* (*ob/ob*) sont obèses [316].

La leptine se fixe sur son récepteur OB-R qui existe sous plusieurs formes. Une forme tronquée, courte qui va être largement exprimée dans les tissus périphériques et dans les plexus choroïdes où il semble avoir plutôt un rôle de transporteur, notamment un rôle de transporteur à travers le liquide céphalo-rachidien [317]. Ainsi la leptine va passer la barrière hémato-encéphalique grâce à un système de transporteurs saturables [318] qui seront diminués en condition de privations énergétiques et au contraire augmentés en condition de prise alimentaire [319]. A l'inverse, la forme longue sera plutôt retrouvée dans le SNC et plus particulièrement dans l'hypothalamus [320]. Grâce à ces deux isoformes, la leptine exerce de multiples rôles dans l'organisme et les souris ayant subi une délétion pour le gène de ce

récepteur (db/db) présente un phénotype obèse et diabétique [314]. La délétion spécifiquement dans l'hypothalamus de ce récepteur va générer un phénotype similaire avec toutefois une stabilisation de l'adiposité par rapport aux animaux totalement délétés pour OB-R, suggérant une compensation par d'autres régions cérébrales [321].

En périphérie, la leptine va engendrer la phosphorylation de l'AMPK, aussi bien dans le foie que dans le muscle, stimulant ainsi la glycolyse et la sensibilité à l'insuline [322]. Dans les cas d'hypoleptinémies, une injection de leptine améliore effectivement la sensibilité à l'insuline, par contre dans les cas d'hyperleptinémies souvent caractéristiques d'une résistance à leptine, ces injections se révèlent inefficaces [323, 324].

La principale action centrale de la leptine est son inhibition de la prise alimentaire [325]. Il y a en effet une corrélation entre l'expression de la leptine et le statut nutritionnel avec une diminution des taux dès 12h de jeûne [326] tandis que l'expression du gène ob va être augmentée avec la prise alimentaire ou après une injection d'insuline [327]. La leptine va par la suite modifier l'activité neuronale dans l'ARC, le VMN, le DMN et le NTS [328, 329]. En cohérence avec son action anorexigène, la leptine va générer une inhibition des neurones NPY/AgRP et une stimulation des neurones POMC/CART [46]. En parallèle, la leptine agit également sur la dépense énergétique qui sera augmentée lors de son injection dans le PVN, l'ARC et le VMN [330]. Cette action serait principalement médiée par le SNS vers les organes réalisant la thermogénèse tels que le BAT et le muscle.

La particularité de la leptine dans le cerveau est son inhibition de l'AMPK dans le PVN et l'ARC [55], action inverse de celle qu'elle réalise en périphérie. En effet, une injection icv d'AICAR va inhiber l'action de la leptine sur la prise alimentaire et la dépense énergétique. Dans le cadre d'un diabète de type 2, le passage de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique semble diminuer, on parle de résistance à la leptine car celle-ci ne peut plus agir au niveau de l'hypothalamus [331]. Un lien fort existe également entre EAOs hypothalamiques et leptine puisque les taux d'EAOs dans les neurones à POMC sont corrélés positivement aux taux de leptine plasmatique [332]. Cette corrélation est complètement perdue chez des animaux obèses/diabétiques.

Adiponectine (ou Acrp30)

L'adiponectine est une des rares adipokines dont la sécrétion est inversement proportionnelle à la masse du tissu adipeux mais positivement corrélée avec la sensibilité à l'insuline [333]. Ses taux sont significativement augmentés après une restriction alimentaire et son injection en périphérie va diminuer le poids corporel sans affecter la prise alimentaire [334]. En accord avec ces résultats, les souris knock-out pour l'adiponectine présente une résistance à l'insuline [335].

Les effets de l'adiponectine sont médiés via deux récepteurs couplés à une protéine G : AdipoR1 et AdipoR2. Le récepteur AdipoR1 est plutôt exprimé sur le muscle squelettique tandis que AdipoR2 sera retrouvé sur le foie [336]. Ces deux récepteurs sont également retrouvés dans l'hypothalamus et plus précisément dans les neurones du PVN ainsi que dans les neurones POMC/CART et NPY/AgRP de l'ARC [337, 338]. Ces deux récepteurs sont également retrouvés sur les micro-vaisseaux cérébraux et dans le liquide céphalo-rachidien suggérant un rôle dans le passage de l'adiponectine à travers la barrière hémato-encéphalique [339].

Tout comme la leptine, l'adiponectine va phosphoryler l'AMPK et améliorer la sensibilité à l'insuline [340]. L'adiponectine diminue également la production hépatique de glucose en agissant directement sur l'expression d'enzymes clefs de la néoglucogenèse comme PEPCCK et G6Pase [341], et augmente l'entrée de glucose dans les muscles [340]. Elle possède enfin des propriétés anti-inflammatoires suggérant un rôle protecteur dans les prémices d'installation d'un diabète [342].

Au niveau central, l'adiponectine augmente la dépense énergétique et en agissant dans le PVN via le système mélanocortine et AdipoR2 [343]. Mais certains travaux mettent en évidence qu'une injection icv engendre la phosphorylation de l'AMPK [338], en complète contradiction avec ceux établissant que cette même voie d'injection diminue la prise alimentaire via AdipoR1 [344]. La présence d'AdipoR1 sur la glande pituitaire, impliquant ainsi la voie neuroendocrinienne, et présence de ces deux récepteurs impliquant des voies de signalisations différentes dans des régions différentes expliquent ces divergences d'effets et restent à étudier [345]. Son action dans l'hypothalamus reste toutefois une piste prometteuse dans le traitement de pathologies du métabolisme glucidique tels que le diabète de type 2. En effet, l'injection chronique en icv d'adiponectine pendant 4 semaines

chez des animaux sous régime riche en gras améliore la sensibilité à l'insuline, diminue la production hépatique de glucose et le poids corporel et augmente la dépense énergétique sans toutefois modifier la phosphorylation de l'AMPK [346].

Apeline

L'apeline est une nouvelle venue dans la famille des adipokines. Découverte en 1998 par l'équipe de Tatemoto [347], elle ne fût caractérisée comme adipokines qu'en 2005 [348]. Il existe plusieurs formes d'apeline issues d'un propeptide de 77 acides aminés qui va être sécrété puis clivé en différents fragments tels que l'apeline-36, l'apeline-17 et l'apeline-13. A la différence de la leptine et de l'adiponectine dont l'origine est quasiment exclusivement adipocytaire, l'apeline est exprimée dans tous les organes [349]. Elle est notamment exprimée dans l'hypothalamus ce qui lui confère une originalité toute particulière [350]. En effet l'apeline est libérée en tant que neurotransmetteur par les neurones à POMC de l'ARC [351], mais également par les neurones à vasopressine et à ocytocine qui se projettent du PVN sur l'hypophyse [352].

L'apeline se fixe sur son récepteur couplé à une protéine Gi/o nommé APJ [353]. Ce récepteur est retrouvé quasiment dans tout l'organisme avec une forte densité pour l'hypothalamus et plus particulièrement dans le PVN et l'ARC [354, 355]. On retrouve également APJ sur les plexus choroïdes, suggérant un rôle dans le passage de la BHE bien que l'apeline est assez petite pour potentiellement pouvoir passer au niveau de l'éminence médiane. En effet, la forme majoritaire dans le plasma et dans l'hypothalamus est l'apeline-13, forme composée uniquement de 13 acides aminés [349]. Ainsi, une injection d'apeline en intra-péritonéale va augmenter le marquage c-Fos hypothalamique (dans le PVN et le LH), et dans le tronc cérébral, suggérant que l'apeline plasmatique peut cibler des structures cérébrales [356]. L'apeline est donc une molécule particulièrement intéressante puisqu'elle peut agir au niveau du cerveau en tant que neurotransmetteur mais pourrait également agir en tant qu'adipokine sécrétée en périphérie et atteignant le cerveau via la circulation sanguine.

La littérature indique que le couple apeline–APJ est impliqué dans de nombreuses voies de signalisation ce qui lui confère de nombreux rôles biologiques; une implication dans

l'angiogénèse [357], un rôle anti-inflammatoire dans le contrôle de l'immunité [358], une action sur la sphère cardiaque [359, 360] et gastro-intestinale [361-364]. Parmi les voies de signalisations impliquées, nombreuses sont celles ayant un lien avec le métabolisme glucidique. En effet, l'apeline va générer l'activation de l'AMPK [365], la libération de NO via la eNOS [366], la phosphorylation de la p70S6k suggérant une possible implication de la protéine mTOR (voir point 2.2 b) [367] et une augmentation de l'activité mitochondriale [368]. Son rôle clef dans le métabolisme glucidique est mis en valeur par un lien étroit avec l'insuline. L'apeline va être sécrétée en réponse à une injection d'insuline [369] tandis que l'injection d'apeline sur des îlots pancréatiques diminue la production d'insuline [370]. Ainsi, une injection d'apeline en périphérie lui confère un rôle antidiabétique sur différents organes. Elle va notamment améliorer la sensibilité à l'insuline et la captation du glucose au niveau du muscle squelettique et du tissu adipeux aussi bien chez des souris normales qu'obèses/diabétiques [365]. Un traitement à l'apeline de deux semaines chez des souris insulino-résistantes restaure la sensibilité à l'insuline tandis que des souris ayant subi une délétion du gène de l'apeline ont une diminution de leur sensibilité à l'insuline [371]. Ce même traitement d'apeline injectée pendant deux semaines à des souris obèses/diabétiques va diminuer leur poids corporel en augmentant l'activité thermogénique du BAT et l'expression d'UCP1 [372].

Cette adipokine est paradoxale car en condition d'obésité et de diabète, ses taux sanguins vont augmenter aussi bien chez l'homme que la souris [348] mais une injection aigue d'apeline va améliorer la sensibilité à l'insuline et diminuer l'hyperglycémie de souris obèses diabétiques [365]. La périphérie de ces animaux est donc toujours sensible à l'apeline et ce contexte suggère une implication du cerveau sur le contrôle du métabolisme glucidique dans l'action de ce peptide.

Concernant son rôle dans le cerveau, le couple apeline-APJ semble plutôt présent au niveau des neurones mais bien que ses taux astrocytaires soient faibles, il entretient néanmoins une relation avec ce type cellulaire puisqu'il est impliqué dans leur maturation [373]. L'apeline a été mise en évidence dans le cerveau pour son action neuroprotectrice [373], mnésique [374] et dans la genèse de la douleur [375]. De nombreuses voies de régulation, parfois antagonistes semblent impliquées dans ces nombreuses actions. Au niveau hypothalamique, l'apeline va avoir une implication neuroendocrinienne puisque le modèle de souris déficient pour APJ a une diminution de la libération d'ACTH en réponse à un stress hypoglycémique

[376]. En parallèle, l'apeline a clairement été mise en évidence pour ses propriétés diurétiques via son expression dans les neurones à vasopressine, une injection icv d'apeline inhibant ces neurones et activant la diurèse [377].

Bien que 89% des neurones immuno-marqués par des anticorps anti-apeline expriment POMC et que plus de la moitié des neurones POMC de l'ARC expriment l'ARN du récepteur APJ [351], le rôle de l'apeline dans la prise alimentaire reste peu claire. Une étude montre un effet orexigène chez des rats nourris [378], tandis qu'un effet anorexigène, logique avec la nature des neurones impliqués, semble être prédominant mais est perdu chez des animaux obèses diabétiques [379, 380]. Dans le cadre du contrôle du métabolisme glucidique, la voie NOergique, déjà démontrée dans le muscle squelettique, a également été mise en évidence dans l'hypothalamus. En effet, l'injection icv d'apeline chez la souris nourrie diminue la glycémie via une phosphorylation de la eNOS [381]. En parallèle, une injection d'apeline dans le PVN augmente l'activité du BAT via le SNS [382]. Une voie de signalisation récemment mise en évidence semble impliquer les EAOs dans les effets de l'apeline puisque son injection sur des neurones en culture stimule l'activité de la NADPH oxydase [383].

Chez des animaux présentant un diabète de type 2, les taux hypothalamiques d'apeline sont augmentés [351], en corrélation avec l'augmentation des taux sanguins. Ainsi, l'injection icv, à une souris normale, de forts taux d'apeline, similaires à ceux retrouvés dans les hypothalami d'animaux obèses/diabétiques, génère des caractéristiques d'un diabète de type 2 tels qu'une hyperglycémie et une hyperinsulinémie à jeun [381]. Ces animaux présentent également une augmentation du marquage c-Fos dans le VMN suggérant une implication de cette structure hypothalamique dans ces effets délétères. Ce même traitement exacerbe l'hyperglycémie à jeun d'animaux obèses/diabétiques démontrant qu'à la différence de la leptine, il n'y a pas de résistance hypothalamique à l'apeline dans le cadre d'un diabète de type 2 et qu'au contraire, des forts taux d'apelines hypothalamiques semblent impliqués dans la mise en place de cette pathologie.

Pour finir, les taux apelinergiques plasmatiques murins ont été dosés sur 24h et ont permis de montrer une régulation circadienne avec des taux augmentés durant la phase nocturne, période majoritairement dédiée à la prise alimentaire chez ces animaux. Ces taux plasmatiques augmentés durant la prise alimentaire pourraient donc atteindre l'hypothalamus et stimuler le métabolisme glucidique vers une diminution de la glycémie

post-prandiale [381]. Cette cyclicité dans la sécrétion de l'apeline est perdue chez des animaux obèses/diabétiques avec des taux sanguins d'apeline très importants qui pourraient être responsables des forts taux hypothalamiques.

Partie 3 : Impact de l'Apeline Hypothalamique dans la transition d'un état normal à un état diabétique

1. Objectifs

Il est maintenant prouvé que lors d'un diabète de type 2, les taux d'apeline sont augmentés aussi bien en périphérie [348] que dans l'hypothalamus [351]. Précédemment dans notre équipe, nous avons pu mettre en évidence que l'injection en icv de forts taux d'apeline, similaires à ceux retrouvés dans les hypothalami d'animaux obèses/diabétiques, généraient une hyperglycémie à jeun, une des caractéristiques du diabète de type 2 [381]. Les voies de signalisation impliquées dans ces effets hyperglycémiant ainsi que les tissus périphériques ciblés par ces forts taux d'apeline hypothalamique n'avaient pas été identifiés.

Mes différents objectifs de thèse ont été :

- 1) d'identifier l'acteur moléculaire hypothalamique impliqué dans les effets de ces forts taux d'apeline hypothalamique.**

Nous nous sommes intéressés aux EAOs hypothalamiques, molécules clés dans le contrôle hypothalamique du métabolisme glucidique. Ces médiateurs originaux sont impliqués dans la détection hypothalamique du glucose [384] et sont libérés par des neurones en réponse à une injection d'apeline [383]. Dans le cas d'un diabète de type 2, leur libération hypothalamique est altérée [194] et pourrait contribuer à l'inflammation hypothalamique retrouvée dans cette pathologie [385].

- 2) de déterminer le lien entre l'hypothalamus et la périphérie médiant l'action de l'apeline hypothalamique en nous intéressant plus particulièrement au SNA et au foie.**

Durant cette étude, nous avons utilisé deux modèles de souris, un modèle aigu d'animaux sains recevant les forts taux d'apeline en icv, et un modèle chronique de surexpression de l'apeline par des lentivirus dans un noyau spécifique de l'hypothalamus : le VMN. Nous avons focalisé nos recherches sur la production hépatique de glucose car le foie est le principal organe impliqué dans la libération de glucose durant le jeûne et celle-ci est profondément altérée dans le cadre d'un diabète de type 2 [386]. En parallèle, nous avons

étudié l'activité du SNA car celui-ci est contrôlé par des noyaux hypothalamiques et contrôle le métabolisme glucidique des organes périphériques, notamment la production hépatique de glucose, le plaçant comme intermédiaire clef entre l'hypothalamus et le foie.

3) d'observer si ces effets sont conservés, voir amplifiés, chez des animaux obèses/diabétiques.

Nous avons donc réalisé toute l'étude précédemment citée sur l'hypothalamus, le SNA et le foie, sur un modèle physiopathologique de diabète de type 2 induit par une alimentation riche en graisse.

L'ensemble de ce travail a permis de mettre en évidence, dans un modèle intégré, l'implication de l'apeline hypothalamique dans la genèse d'une voie EAOs hypothalamiques-SNA-foie.

2. Résultats

Au début de ce travail de thèse, l'apeline avait été mise en évidence dans notre laboratoire comme étant une adipokine, une sécrétion adipocytaire libérée dans la circulation sanguine et dont les taux sont augmentés dans le cadre d'un diabète de type 2 [348]. Cette apeline a ensuite été décrite comme améliorant le métabolisme glucidique aussi bien chez des souris normales que chez des animaux obèses/diabétiques via une injection iv [365].

En parallèle, l'apeline est également libérée par les neurones POMC au sein de l'hypothalamus, une région cérébrale clef dans le contrôle du métabolisme glucidique [351]. Des travaux du laboratoire ont montré qu'une injection de faibles taux d'apeline en icv chez une souris nourrie va diminuer la glycémie [381]. Cette injection est sans effet lorsque les animaux sont à jeun ou obèses/diabétiques. Par contre, les taux hypothalamiques d'apeline sont augmentés durant un diabète de type 2 et l'injection de forts taux d'apeline, similaires aux taux hypothalamiques d'animaux obèses/diabétiques, génère une hyperglycémie à jeun.

Identification de l'acteur moléculaire hypothalamique : H₂O₂

Dans un premier temps, nous avons vérifié que l'hyperglycémie générée par l'injection icv d'apeline était imputable à l'apeline. Les animaux ont été mis à jeun pendant 6 heures et avant l'injection d'apeline, nous leur avons administré en icv un antagoniste du récepteur APJ (le seul récepteur connu de l'apeline) nommé F13A. Cette post-injection a annulé les effets hyperglycémiantes de l'apeline.

Par la suite nous nous sommes intéressés aux acteurs hypothalamiques potentiels médiant ces effets de l'apeline. De nombreuses publications mettent en évidence l'implication des EAOs dans les effets hyperinsulinémiants du glucose [192], et également comme médiateur neuronal des effets de l'apeline [383]. Nous avons donc administré en icv du trolox (une molécule anti-oxydante dérivée de la vitamine E) chez des animaux à jeun avant l'injection d'apeline. Cette injection de trolox inhibe l'effet hyperglycémiant de l'apeline permettant de caractériser les EAOs comme médiateur potentiel des effets de l'apeline. Le trolox n'est pas spécifique d'une EAO en particulier, afin de discriminer plus précisément la molécule antioxydante impliquée, nous nous sommes focalisés sur l'H₂O₂, l'EAO la plus stable et donc majoritairement impliquée dans les effets biologiques [387]. La libération hypothalamique

d' H_2O_2 en réponse à l'apeline a donc été étudiée *ex vivo* sur des hypothalami maintenus en survie. Nous avons tout d'abord mesuré la sécrétion d' H_2O_2 en réponse à l'apeline via une technique classique de dosage à l'Amplex red (une sonde colorimétrique), mais également via une technique originale de mesure en temps réel nommée l'ampérométrie. Ainsi, nous avons pu caractériser l' H_2O_2 comme médiateur hypothalamique des effets de l'apeline.

Détermination du lien entre l'hypothalamus et la périphérie : SNS et Foie

Dans le but d'identifier le lien entre l'hypothalamus et la périphérie ainsi que l'organe cible, nous avons étudié le SNA ainsi que le foie, principal organe à libérer du glucose dans les situations de jeûne par glycogénolyse et néoglucogénèse. Ces deux voies métaboliques ont été étudiées en réponse à l'apeline icv avec ou sans post-traitement au trolox. L'apeline injectée en icv augmente la glycogénolyse hépatique ainsi que la néoglucogénèse générant ainsi l'effet hyperglycémiant à jeun. En parallèle, les taux de noradrénaline plasmatiques sont augmentés, mettant en lumière une activation du SNS.

Dans une précédente étude, notre équipe a « régionalisé » les effets de l'apeline dans l'hypothalamus démontrant que l'injection de forts taux d'apeline en icv augmente le marquage c-Fos de neurones présents dans le VMN [381]. Nous avons donc surexprimé l'apeline dans ce noyau hypothalamique afin d'évaluer si cette surexpression pouvait générer les caractéristiques d'un diabète de type 2. Pour cela, des animaux sains ont reçu en intra-structural dans le VMN des lentivirus surexprimant l'apeline. Ces animaux présentaient une hyperglycémie à jeun, une intolérance à l'insuline, une production hépatique de glucose augmentée ainsi qu'un taux important de noradrénaline plasmatique. L'ensemble de ces caractéristiques est présente dans le cadre d'un diabète de type 2, faisant de ces animaux un bon modèle de cette pathologie.

Amplification de la voie H_2O_2 hypothalamique-Foie dans un modèle physiopathologique

Enfin, nous avons étudié cette voie « H_2O_2 hypothalamique-SNA-foie » afin d'évaluer si elle était toujours conservée dans un modèle physiopathologique de diabète généré par une alimentation riche en gras. L'injection icv d'apeline chez des animaux obèses/diabétiques génère une hyperglycémie à jeun exacerbée due à une augmentation de la production

hépatique de glucose par glycogénolyse. En parallèle et en *ex vivo*, les taux hypothalamiques d'H₂O₂ sont également augmentés en réponse à l'apeline. Cette voie est donc toujours conservée et même amplifiée chez un modèle d'animaux obèses/diabétiques. Ces résultats sont directement imputables à l'apeline car un traitement icv journalier pendant 15 jours au F13A (un antagoniste du récepteur à l'apeline) de ces animaux a permis d'améliorer ces paramètres.

Innovation

Central apelin is known to control glycemia in a dose-dependent manner. In the brain, a slight physiological increase of apelin stimulates a hypothalamic nitric oxide (NO) pathway, which results in an increase in peripheral glucose utilization. On the contrary, a high increase in central apelin, similar to that observed in obese/diabetic mice, provoked fasted hyperglycemia in normal mice. We demonstrate that central apelin participates in the establishment of a type 2 diabetes state by modulating the release of reactive oxygen species in the hypothalamus. Consequently, the autonomic nervous system provokes an over-activation of glycogenolysis and gluconeogenesis in the liver, resulting in fasted hyperglycemia.

from the normal to diabetic state. First, apelin expression is increased in the hypothalamus of obese/diabetic mice (42). Second, acute and chronic intracerebroventricular (icv) injections of a high quantity of apelin (similar to that observed in obese/diabetic mice) in fasted normal mice induce type 2 diabetes symptoms such as hyperinsulinemia, hyperglycemia, glucose intolerance, and insulin resistance (11). This result suggests that hypothalamic apelin may control liver glucose metabolism, thereby controlling glucose release *via* glycogenolysis and/or gluconeogenesis in fasted state. Reinforcing this hypothesis, we clearly demonstrated that central apelin exerts its glycemic effect by targeting the ventromedial hypothalamic nuclei (11), a region whose electrical stimulation triggers the activation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis *via* the ANS (44, 49).

One molecular target of apelin actions is the reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H₂O₂). Finely balanced mitochondrial ROS (mROS) production may be at the core of proper metabolic maintenance, and unbalanced mROS production, which is largely documented, might be an important trigger of metabolic disorders (15, 23). Data from literature demonstrate that apelin increases the production of ROS in neuronal cells culture (57). In the brain, hypothalamic hyperglycemia increases mROS hypothalamic production, which, in turn, stimulates peripheral hyperinsulinemia, thereby supporting the implication of brain mROS in the control of glucose homeostasis (24). Under metabolic dysfunction, mitochondria are considered the principal source of H₂O₂ (2), and an elevated mitochondrial H₂O₂ emission is a primary cause of insulin resistance (2, 15).

Thus, unraveling the hypothalamic apelin to liver axis involved in the onset of type 2 diabetes appears to be of major importance. However, the downstream molecular pathways and functional effects of hypothalamic apelin on the liver remain to be established. Given the well-established role of central apelin in the control of glycemia, we tested here the possibility that hypothalamic apelin positively regulates hepatic glucose production. To address this hypothesis, we used pharmacological and genetic approaches to increase hypothalamic level of apelin in normal and high-fat diet (HFD) obese/diabetic mice. These experiments allowed us to examine whether the increased levels of hypothalamic apelin is sufficient to modify hypothalamic ROS/H₂O₂ production and, consequently, hepatic glucose release *via* ANS.

Results

Antioxidants counterbalanced icv apelin-induced fasted-hyperglycemia in mice

We confirmed here that acute apelin icv injection provoked fasted hyperglycemia in normal mice (Fig. 1A) (11). Since ROS are potential targets of apelin action, we injected icv apelin in mice previously treated with an antioxidant, trolox at 1 mM. At this concentration, trolox is able to prevent hyperinsulinemia generated by glucose-induced hypothalamic ROS production (8). Treatment with icv trolox completely prevented apelin-induced hyperglycemia (Fig. 1A, B). All icv conditions did not modify food intake during re-feeding (Supplementary Fig. S1A; Supplementary Data are available online at www.liebertpub.com/ars) and plasma apelin levels (Supplementary Fig. S1B), demonstrating that (i) icv apelin did not modify the behavior of animals after injection and (ii) the specificity of central apelin action on glucose homeostasis.

Apelin stimulates hypothalamic ROS production in mice

The implication of ROS/H₂O₂ in the control of glucose metabolism in normal and physiopathological states is well established (15). To determine whether hypothalamic apelin requires an H₂O₂-dependent signaling pathway, our first approach used an indirect method of detection of H₂O₂ release by hypothalamus in response to apelin. We demonstrated that apelin significantly increased H₂O₂ release (Fig. 1C). Based on this result, we developed for the first time in hypothalamic explants a method using specific amperometric probes that was highly and specifically sensitive to H₂O₂ in order to detect its release in real time (54). As observed in Figure 1D, apelin rapidly increased hypothalamic H₂O₂ release from 2 to 20 min. This effect was completely blunted by trolox, thereby demonstrating the existence of an hypothalamic apelin/H₂O₂ signaling pathway (Fig. 1D). It is well established that the majority of hypothalamic ROS implicated in rapid signaling pathway have a mitochondrial origin (3). Data from literature show that hypothalamic NADPH oxidase is implicated in the control of energy homeostasis (*i.e.*, food intake) *via* ROS production (19). To test whether NADPH oxidase could be a major enzymatic target of hypothalamic apelin action, we tested the effect of icv diphenyleneiodonium (DPI), an inhibitor of NADPH oxidase, on glycemia. icv DPI injection failed to counterbalance hyperglycemia induced by icv apelin (Fig. 1E).

Central apelin controls glycemia via APJ receptor

Nowadays, there is only one known apelin receptor called APJ. To determine the specificity of icv apelin on glycemia, we treated mice with F13A, an APJ antagonist (26). Acute icv F13A injection blocked icv apelin-induced hyperglycemia (Fig. 1F).

Central apelin stimulates glycogenolysis and gluconeogenesis via hypothalamic ROS production and the ANS in mice

During fasting, the liver is the principal organ able to release glucose *via* the activation of glycogenolysis and/or gluconeogenesis. The brain, and more specifically the hypothalamus, contributes to the regulation of liver glucose metabolism during fasting *via* the ANS. To test whether

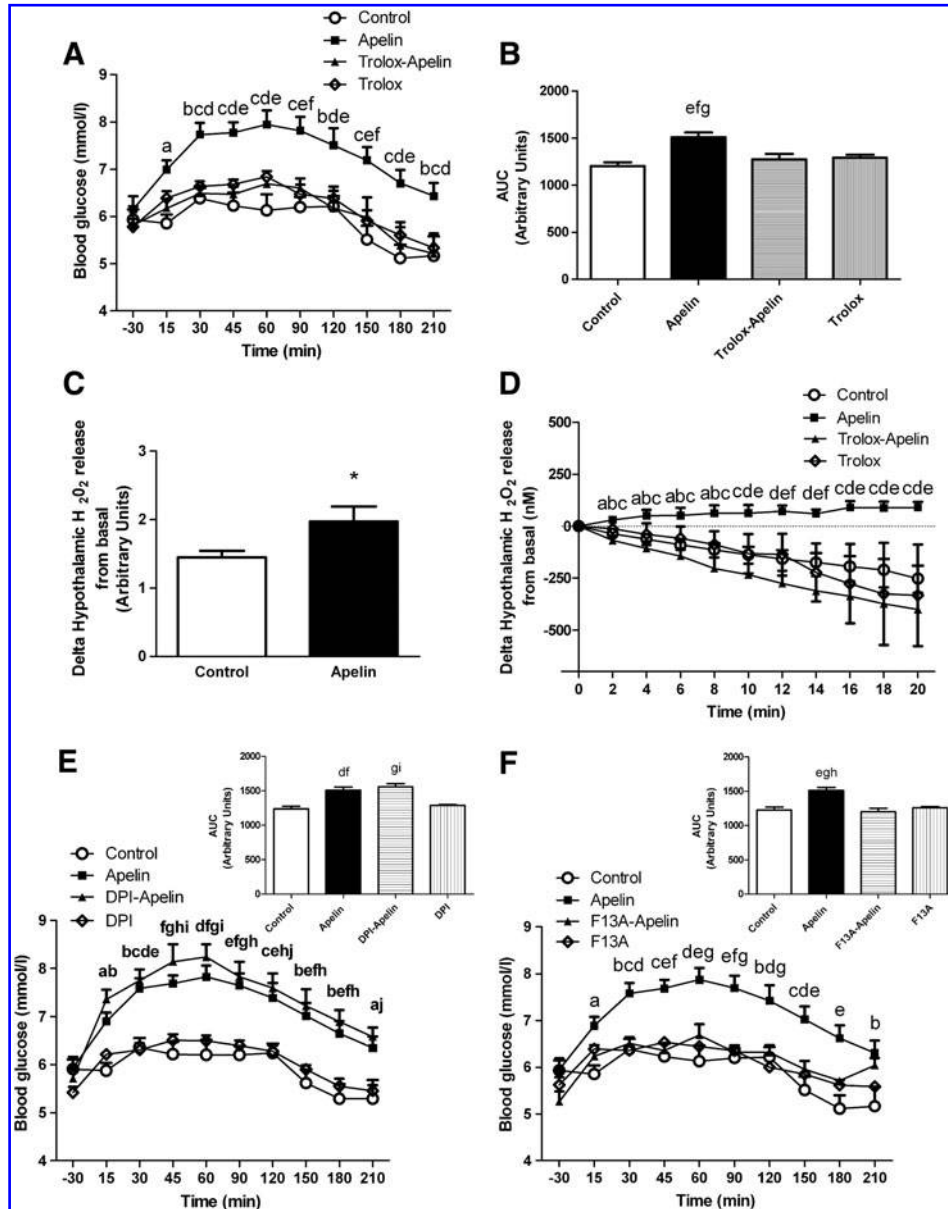


FIG. 1. Central apelin induces fasting hyperglycemia via hypothalamic hydrogen peroxide (H₂O₂) production in normal mice. (A) Effect of acute intracerebroventricular (icv) apelin injection on blood-glucose-fasted mice (*n* = 10) compared with artificial cerebrospinal fluid (aCSF)-injected fasted mice (*n* = 9), to Trolox-Apelin-injected fasted mice (*n* = 6) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted mice (*n* = 8). (B) The average area under the curve (AUC) associated with the previous fasted blood glucose. ^a*p* ≤ 0.05 Apelin versus Control; ^b*p* ≤ 0.01 Apelin versus Control; ^c*p* ≤ 0.05 Apelin versus Trolox-Apelin; ^d*p* ≤ 0.05 Apelin versus Trolox; ^e*p* ≤ 0.001 Apelin versus Control; ^f*p* ≤ 0.01 Apelin versus Trolox; ^g*p* ≤ 0.01 Apelin versus Trolox-Apelin. (C) *Ex vivo* hypothalamic H₂O₂ release measured by indirect enzymatic detection in fasted mice after injection of apelin (*n* = 10) or krebs-ringer solution (*n* = 10); **p* < 0.05. (D) *Ex vivo* hypothalamic H₂O₂ release measured by real-time amperometric detection in fasted mice after injection of apelin (*n* = 5) or aCSF (*n* = 5) or Trolox-Apelin (*n* = 4) or Trolox (*n* = 4). ^a*p* ≤ 0.05 Apelin versus Control; ^b*p* ≤ 0.05 Apelin versus Trolox; ^c*p* ≤ 0.01 Apelin versus Trolox-Apelin; ^d*p* ≤ 0.01 Apelin versus Control; ^e*p* ≤ 0.01 Apelin versus Trolox; ^f*p* ≤ 0.001 Apelin versus Trolox-Apelin. (E) Effect of acute icv apelin injection on blood-glucose-fasted mice (*n* = 10) compared with aCSF-injected fasted mice (*n* = 9), to diphenyleiiodonium (DPI)-Apelin-injected fasted mice (*n* = 6) and to DPI-aCSF (DPI)-injected fasted mice (*n* = 6). The adjacent bar graph represents the average AUC. ^a*p* ≤ 0.05 Apelin versus Control; ^b*p* ≤ 0.01 Apelin-DPI versus Control; ^c*p* ≤ 0.01 Apelin versus Control; ^d*p* ≤ 0.01 Apelin versus DPI; ^e*p* ≤ 0.05 Apelin-DPI versus DPI; ^f*p* ≤ 0.001 Apelin versus Control; ^g*p* ≤ 0.001 Apelin-DPI versus Control; ^h*p* ≤ 0.05 Apelin versus DPI; ⁱ*p* ≤ 0.01 Apelin-DPI versus DPI; ^j*p* ≤ 0.05 Apelin-DPI versus Control. (F) Effect of acute icv apelin injection on blood-glucose-fasted mice (*n* = 10) compared with aCSF-injected fasted mice (*n* = 9), to F13A-Apelin-injected-fasted mice (*n* = 7) and to F13A-aCSF (F13A)-injected fasted mice (*n* = 5). The adjacent bar graph represents the average AUC. ^a*p* ≤ 0.05 Apelin versus Control; ^b*p* ≤ 0.01 Apelin versus Control; ^c*p* ≤ 0.05 Apelin versus F13A; ^d*p* ≤ 0.05 Apelin versus F13A-Apelin; ^e*p* ≤ 0.001 Apelin versus Control; ^f*p* ≤ 0.01 Apelin versus F13A-Apelin; ^g*p* ≤ 0.01 Apelin versus F13A; ^h*p* ≤ 0.001 Apelin versus F13A-Apelin.

hypothalamic apelin/ROS triggers fasted hyperglycemia by mechanisms involving the liver, we measured the consequence of icv apelin \pm trolox on glycogenolysis and gluconeogenesis in fasted mice. An acute icv injection of apelin decreased hepatic glycogen content as observed by histological (Fig. 2A, B) and biochemical (Fig. 2C) measurements. Consistent with the effect observed in the hypothalamus, trolox treatment abolished the activation of hepatic glycogenolysis in apelin icv-injected mice (Fig. 2A–C). Then, in response to an intraperitoneal pyruvate injection, apelin significantly increased glycemia, demonstrating an activation of liver gluconeogenesis (Fig. 2D). Similar to glycogenolysis, icv apelin effect on gluconeogenesis is blocked by icv trolox.

Numerous enzymes are implicated in the control of glycogenolysis and/or gluconeogenesis. Among them, the activity of glucose 6-phosphatase (G6Pase), a key enzyme that is known to stimulate glycogenolysis and gluconeogenesis (1), was significantly increased in the liver of icv apelin-treated mice (Fig. 2E). This effect was blocked by icv trolox. No significant variation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), glycogen synthase, and glycogen phosphorylase activities was observed in all experimental conditions (Fig. 2F–H). The effects of icv apelin on glucose metabolism were not associated to the modification of plasma triglycerides (TG) (Supplementary Fig. S2A), free fatty acid (FFA) (Supplementary Fig. S2B), ketone bodies (Supplementary Fig. S2C), liver TG (Supplementary Fig. S2D), and lipid (Supplementary Fig. S2E) content.

Given that the sympathetic nervous system (SNS) controls glycogenolysis and gluconeogenesis, we measured norepinephrine release in the blood of icv apelin \pm trolox-treated mice as an index of SNS activation. Norepinephrine levels were significantly higher in response to icv apelin than control mice, but not in icv apelin/trolox or trolox-alone treated mice (Fig. 3A). No significant variation of plasma epinephrine was observed (Fig. 3B). Alpha(1) adrenergic receptors are the principle receptors implicated in the control of hepatic glucose metabolism in mice (28). An intraperitoneal injection of prazosin, an alpha(1) adrenergic receptors antagonist, prevented icv apelin-induced hyperglycemia (Fig. 3C), thereby demonstrating the existence of a central apelin-SNS-liver signaling pathway. In addition to an alpha(1) adrenergic receptors-mediated effect on glycemia, activation of SNS by icv apelin is associated to an increase in plasma glucagon release (Fig. 3D), which further stimulates hepatic glucose production (41).

Apelin over-expression in the medio-basal hypothalamus stimulates hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis

We have previously demonstrated that the medio-basal hypothalamus (MBH) is a hypothalamic target of apelin action on peripheral glucose homeostasis, as c-Fos expression is increased in the MBH of hyperglycemic apelin icv-injected mice (11). Moreover, electrical stimulation of ventro-medial hypothalamus stimulates hepatic glucose release (48). To determine whether apelin controls liver function *via* an action on MBH, we injected apelin-expressing lentivectors specifically in the MBH of normal mice. Four weeks after infection, the level of apelin mRNA was significantly increased in the MBH of mice that received apelin-expressing lentivectors (Fig. 4A). The relative expression of apelin mRNA was increased by about 1.5-fold, similar to that observed at the protein level in

obese/diabetic mice (42), demonstrating that this over-expression of apelin in normal mice corresponds to the level found in pathological conditions. To identify the impact on glucose homeostasis, we performed insulin tolerance test (ITT). Lentivectors apelin-infected mice presented fasted hyperglycemia and an insulin intolerance typical features of type 2 diabetes (Fig. 4B). This metabolic phenotype was associated to an increase in TNFalpha mRNA expression in the hypothalamus of lentivectors apelin-infected mice (Fig. 4C), suggesting an increase in hypothalamic inflammation that is clearly associated to a diabetic state (51); whereas hypothalamic IL1beta mRNA tends to increase in lentivectors apelin-infected mice, but did not reach significance ($p=0.074$, Fig. 4D). This inflammatory state was specific to the hypothalamus, as we did not observe any modification of mRNA TNFalpha and IL1beta expressions in the liver and adipose tissues (Supplementary Fig. S3C–H). In this chronic apelin expressed model, we showed no significant difference in plasma apelin (Supplementary Fig. S4F) and liver apelin/APJ mRNA expressions (Supplementary Fig. S3A, B) between the two experimental groups, suggesting that central control of apelin did not affect its own release in periphery.

Then, we measured the impact of apelin over-expression in the MBH on liver glucose metabolism. Hypothalamic apelin over-expression decreased liver glycogen content (Fig. 5A–C) and increased gluconeogenesis (Fig. 5D). This metabolic phenotype was associated to an increase in G6Pase activity during fasted state (Fig. 5E), but not PEPCK (Fig. 5F), glycogen synthase (Fig. 5G), and glycogen phosphorylase (Fig. 5H). No significant modification of plasma TG (Supplementary Fig. S4A), FFA (Supplementary Fig. S4B), ketone bodies (Supplementary Fig. S4C), liver TG (Supplementary Fig. S4D), and lipid content (Supplementary Fig. S4E) was observed between the two groups. This result clearly demonstrates that the diabetic state generated by apelin over-expression in the MBH is not associated to the modification of lipid metabolism, but specifically links to direct alteration of glucose metabolism.

Similar to that observed in response to an acute apelin injection (Fig. 3A, B), apelin over-expression in the MBH was associated to an increase in plasma norepinephrine (Fig. 6A), but not epinephrine (Fig. 6B), showing the over-activation of SNS. On the contrary, we did not observe any significant difference in plasma glucagon (Fig. 6C), suggesting that SNS over-activation coupled to modification of G6Pase activity was sufficient to generate a diabetic state.

Antioxidants counterbalanced icv apelin-induced fasted hyperglycemia in obese/diabetic mice

We previously found that glycemia of HFD obese/diabetic mice could further increase in response to acute icv apelin injection (11), suggesting that the hypothalamic to liver axis is functionally still able to respond to a central stimulation by releasing hepatic glucose. Here, we showed that icv trolox completely abolished the hyperglycemic effect of apelin in HFD mice (Fig. 7A, B), suggesting that the hypothalamic apelin/ROS pathway was still effective.

Apelin amplifies the H₂O₂ release by the hypothalamus of obese/diabetic mice

The hypothalamic ROS signaling pathway is profoundly altered in obese/diabetic mice participating in an insulin-

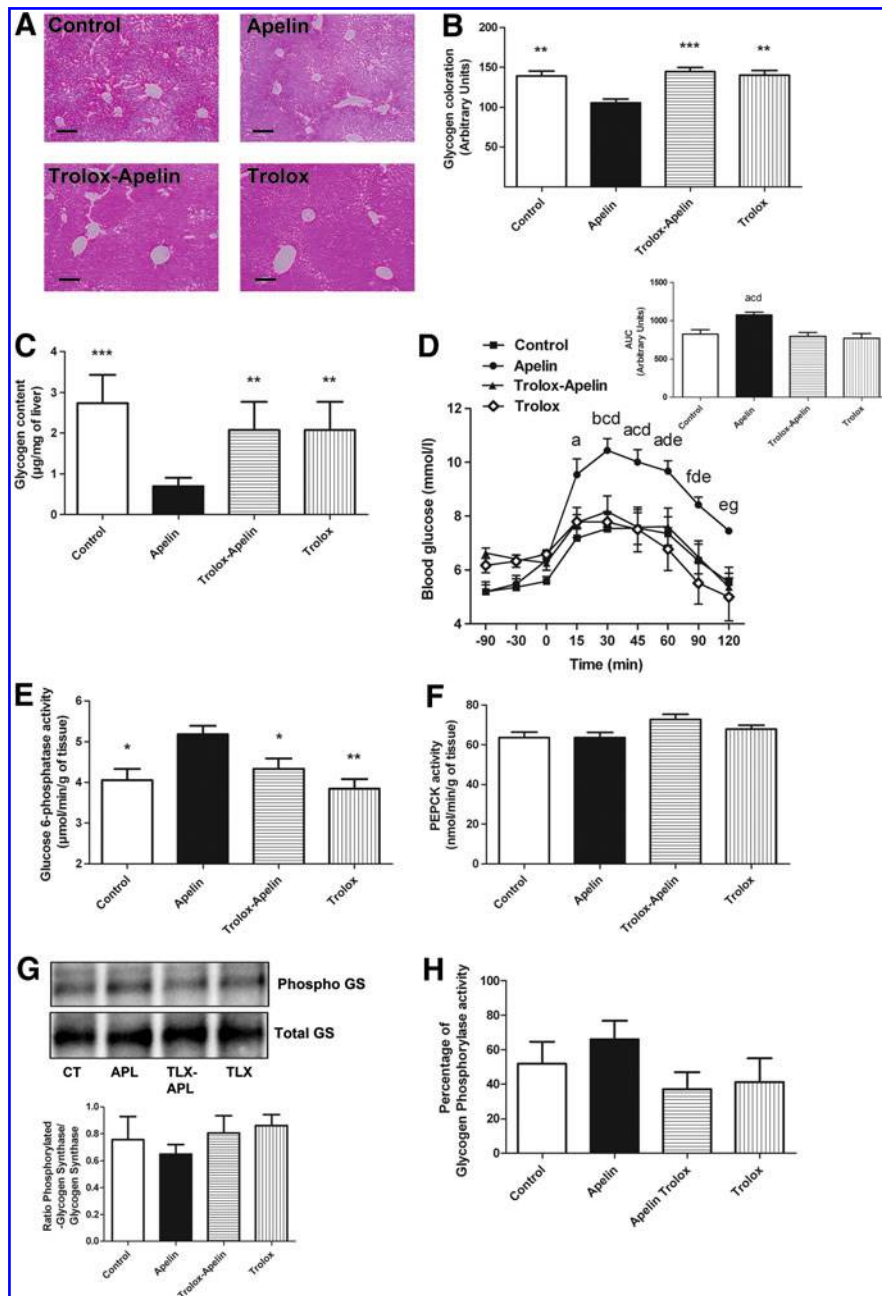


FIG. 2. Central apelin stimulates glycogenolysis and gluconeogenesis via hypothalamic reactive oxygen species (ROS) in normal mice. (A) Histological visualization of hepatic glycogen after acute icv apelin injection on fasted mice ($n=5$) compared with aCSF-injected fasted mice ($n=5$), to Trolox-Apelin-injected fasted mice ($n=4$), and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted mice ($n=5$). Scale bar: $200\ \mu\text{m}$. (B) Quantification of coloration associated with the previous histological visualization. (C) Effect of acute icv apelin injection on hepatic glycogen content of fasted mice ($n=12$) compared with aCSF-injected fasted mice ($n=13$), to Trolox-Apelin-injected fasted mice ($n=12$), and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted mice ($n=7$). $**p < 0.01$ versus Apelin; $***p < 0.001$ versus Apelin. (D) Effect of acute icv apelin injection on gluconeogenic activity of fasted mice ($n=8$) compared with aCSF-injected fasted mice ($n=8$), to Trolox-Apelin-injected fasted mice ($n=10$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted mice ($n=6$). The adjacent bar graph represents the average AUC. $^ap \leq 0.01$ Apelin versus Control; $^bp \leq 0.001$ Apelin versus Control; $^cp \leq 0.01$ Apelin versus Trolox-Control; $^dp \leq 0.01$ Apelin versus Trolox; $^ep \leq 0.05$ Apelin versus Trolox-Apelin; $^fp \leq 0.05$ Apelin versus Control; $^gp \leq 0.05$ Apelin versus Trolox. (E) Effect of acute icv apelin injection on hepatic glucose-6-phosphatase (G6Pase) activity—fasted mice ($n=5$) compared with aCSF-injected fasted mice ($n=5$), to Trolox-Apelin-injected fasted mice ($n=5$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted mice ($n=6$). $*p < 0.05$ versus Apelin; $**p < 0.01$ versus Apelin. (F) Effect of acute icv apelin injection on hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) activity—fasted mice ($n=5$) compared with aCSF-injected fasted mice ($n=4$), to Trolox-Apelin-injected fasted mice ($n=4$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted mice ($n=6$). (G) Effect of acute icv apelin injection on ratio of phosphorylated hepatic glycogen synthase/total hepatic glycogen synthase on fasted mice ($n=3$) compared with aCSF-injected fasted mice ($n=3$), to Trolox-Apelin-injected fasted mice ($n=3$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted mice ($n=3$). (H) Effect of acute icv apelin injection on hepatic glycogen phosphorylase activity—fasted mice ($n=4$) compared with aCSF-injected fasted mice ($n=4$), to Trolox-Apelin-injected fasted mice ($n=4$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted mice ($n=4$).

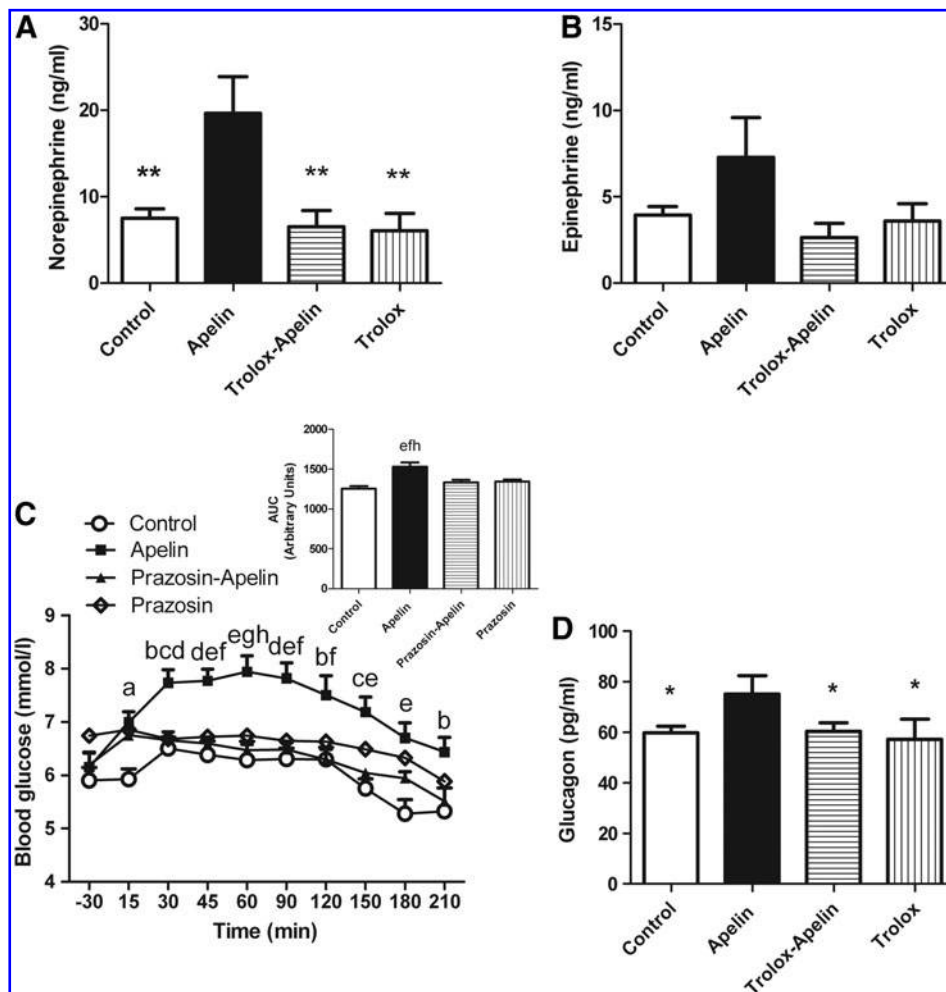


FIG. 3. Central apelin stimulates glycogenolysis and gluconeogenesis via autonomous nervous system (ANS) activation in normal mice. (A) Effect of acute icv apelin injection on blood norepinephrine-fasted mice ($n=7$) compared with aCSF-injected fasted mice ($n=9$), to Trolox-Apelin-injected fasted mice ($n=7$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted mice ($n=8$). $**p < 0.01$ versus Apelin. (B) Effect of acute icv apelin injection on blood epinephrine-fasted mice ($n=7$) compared with aCSF-injected fasted mice ($n=9$), to Trolox-Apelin-injected fasted mice ($n=7$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted mice ($n=8$). (C) Effect of acute icv apelin injection on blood glucose-fasted mice ($n=11$) compared with aCSF-injected fasted mice ($n=8$), to intraperitoneal injection of prazosin before apelin icv injection (Prazosin-Apelin) on fasted mice ($n=6$), and to intraperitoneal injection of prazosin before aCSF icv injection (Prazosin) on fasted mice ($n=6$). The adjacent bar graph represents the average AUC. $^ap \leq 0.05$ Apelin versus Control; $^bp \leq 0.01$ Apelin versus Control; $^cp \leq 0.05$ Apelin versus Prazosin; $^dp \leq 0.05$ Apelin versus Prazosin-Apelin; $^ep \leq 0.001$ Apelin versus Control; $^fp \leq 0.01$ Apelin versus Prazosin; $^gp \leq 0.001$ Apelin versus Prazosin; $^hp \leq 0.01$ Apelin versus Prazosin-Apelin. (D) Effect of acute icv apelin injection on blood glucagon-fasted mice ($n=4$) compared with aCSF-injected fasted mice ($n=5$), to Trolox-Apelin-injected fasted mice ($n=5$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted mice ($n=4$). $*p < 0.05$ versus Apelin.

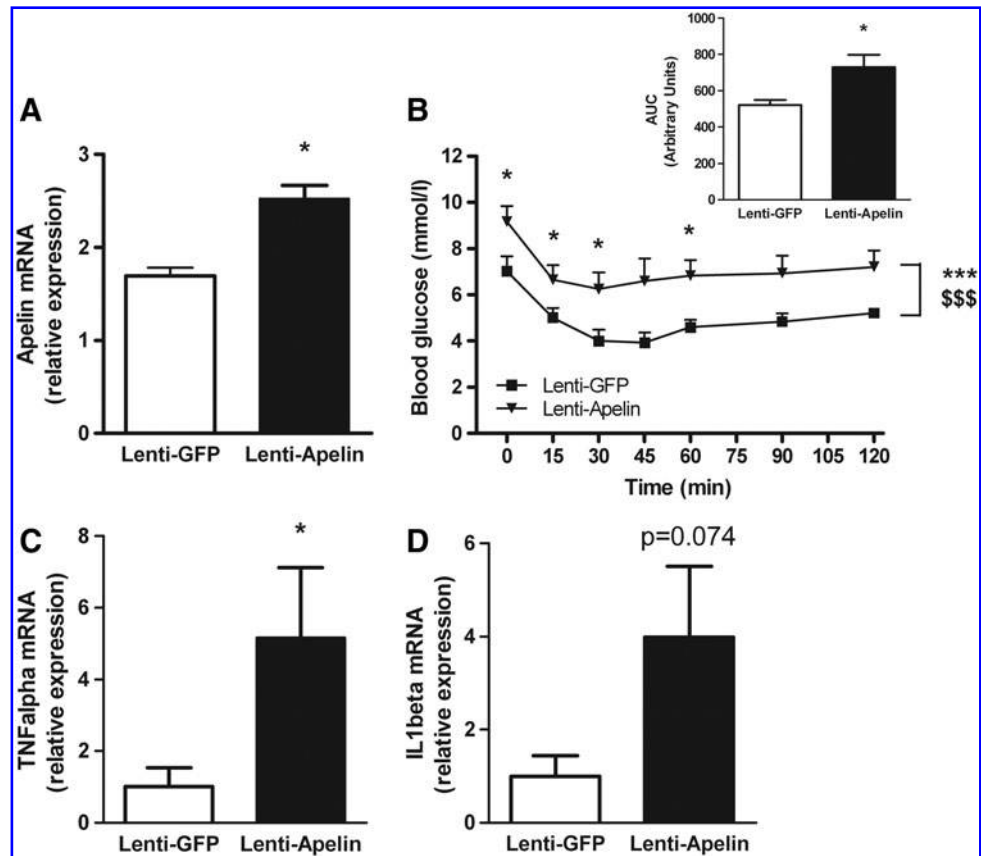
resistant state (15). Similar to that performed in normal mice, we measured real-time H_2O_2 release in response to apelin on hypothalamic explants from HFD mice. In this pathological model, apelin stimulated an exacerbated H_2O_2 release in the hypothalamus, and this was counterbalanced by trolox treatment (Fig. 7C).

Central apelin stimulates glycogenolysis but not gluconeogenesis via hypothalamic ROS in HFD mice

The liver is one of the most important organ in glucose homeostasis whose activity is deeply disturbed during metabolic diseases (36). Indeed, previous data demonstrate that

gluconeogenic activity of the liver of obese/diabetic mice is exacerbated (55). We demonstrated that HFD mice are able to increase quickly fasted glycemia (Fig. 7A, B) on apelin treatment; this corresponds to the activation of glycogenolysis but not gluconeogenesis (45–48). In accordance to glycemia, hepatic glycogenolysis was activated by icv apelin and blocked when icv trolox was co-injected (Fig. 8A–C). Acute icv apelin injection in HFD mice did not significantly modify gluconeogenic function in the liver (Fig. 8D). The decrease of glycogen content was mirrored by an increase in liver G6Pase activity (Fig. 8E) without modification of PEPCK, glycogen phosphorylase, and glycogen synthase (Supplementary Fig. S5A–C). Plasma norepinephrine, epinephrine, and glucagon

FIG. 4. Apelin over-expression into the medio-basal hypothalamus (MBH) generates insulin intolerance state. (A) Relative expression of apelin mRNA in hypothalamus of lenti-Apelin mice ($n=4$) compared with lenti-GFP mice ($n=5$), $*p < 0.05$. **(B)** Insulin tolerance test (ITT) in 6-h-fasted lenti-Apelin mice ($n=5$) compared with lenti-GFP mice ($n=5$), $*p < 0.05$. Two-way ANOVA followed by *t*-test *post hoc* reveals time ($***p < 0.001$) and treatment ($$$$p < 0.001$) effects. The adjacent bar graph represents the average AUC. **(C)** Relative expression of TNF α mRNA in hypothalamus of lenti-Apelin mice ($n=4$) compared with lenti-GFP mice ($n=5$), $*p < 0.05$. **(D)** Relative expression of IL1 β mRNA in hypothalamus of lenti-Apelin mice ($n=4$) compared with lenti-GFP mice ($n=5$).



concentrations did not vary in our experimental conditions (Fig. 8G, H).

Blockade of central apelin ameliorates diabetic state of HFD mice

Our data show that a high level of central apelin participates in the establishment of a type 2 diabetes. To test whether blockade of apelin action in the hypothalamus could be a major target to restore a fasted normal glycemia, we have daily injected icv mice with an APJ antagonist, F13A, during 2 weeks after 3 months of HFD. Our data show that icv F13A decreased fasted hyperglycemia and insulin intolerance in HFD mice (Fig. 9A). HFD mice presented a decrease in glycogen content (Fig. 9B–D) at a level similar to that measure in normal mice (Fig. 2C), demonstrating an amelioration of the diabetic state in HFD mice. This phenotype is associated to an increase in liver glycogen phosphorylase activity, which could explain the low level of glycogen store (Fig. 9E). The activities of G6Pase, PEPCK and glycogen synthase did not vary between the two groups (Supplementary Fig. S6A–C). Plasma norepinephrine and epinephrine did not vary between the two groups of mice (Fig. 9F, G). Plasma glucagon concentration was decreased in F13A mice as compared with control HFD mice (Fig. 9H), thereby suggesting that chronic central apelin blockade improves glucose homeostasis regulation during diabetic state.

Discussion

Hypothalamic apelin is implicated in the control of peripheral glucose utilization in normal and pathological con-

ditions (11). In the present study, we have identified for the first time the hypothalamic molecular signaling pathway implicated in deleterious effect of apelin. Moreover, we report that the couple apelin/ROS in the hypothalamus controls hepatic glucose production *via* the SNS to induce peripheral hyperglycemia.

The role of central apelin in the control of glucose homeostasis is poorly defined. We were the first to demonstrate that central apelin may have beneficial or deleterious effects on glucose homeostasis depending on the injected dose and/or the nutritional state (11). Indeed, an injection of a low dose of icv apelin induces an increase in glucose tolerance in normal mice. This result suggests that the slight increase of plasma apelin concentration observed in fed state in normal mice may reach the hypothalamus, a neurohemal structure which facilitates communications with peripheral hormones (25), to decrease glycemia in fed state (11). On the contrary, obese/diabetic mice fed a HFD show a disruption of circadian apelin regulation (11). Then, over-increased hypothalamic apelin expression observed in obese/diabetic (11, 42) is associated to abnormal regulation of glycemia (11). To reinforce this hypothesis, an icv injection of a high dose of apelin (used in this study and similar to that observed in obese/diabetic mice) in normal mice induces fasted hyperglycemia and insulin resistance (11), characterizing a type 2 diabetes. The liver is the main organ that is able to release glucose in fasted state *via* glycogenolysis and/or gluconeogenesis (30). Thus, we focused our attention on the hypothalamic apelin to liver axis in normal and physiopathological conditions. In all the models investigated, central apelin stimulated hepatic glucose

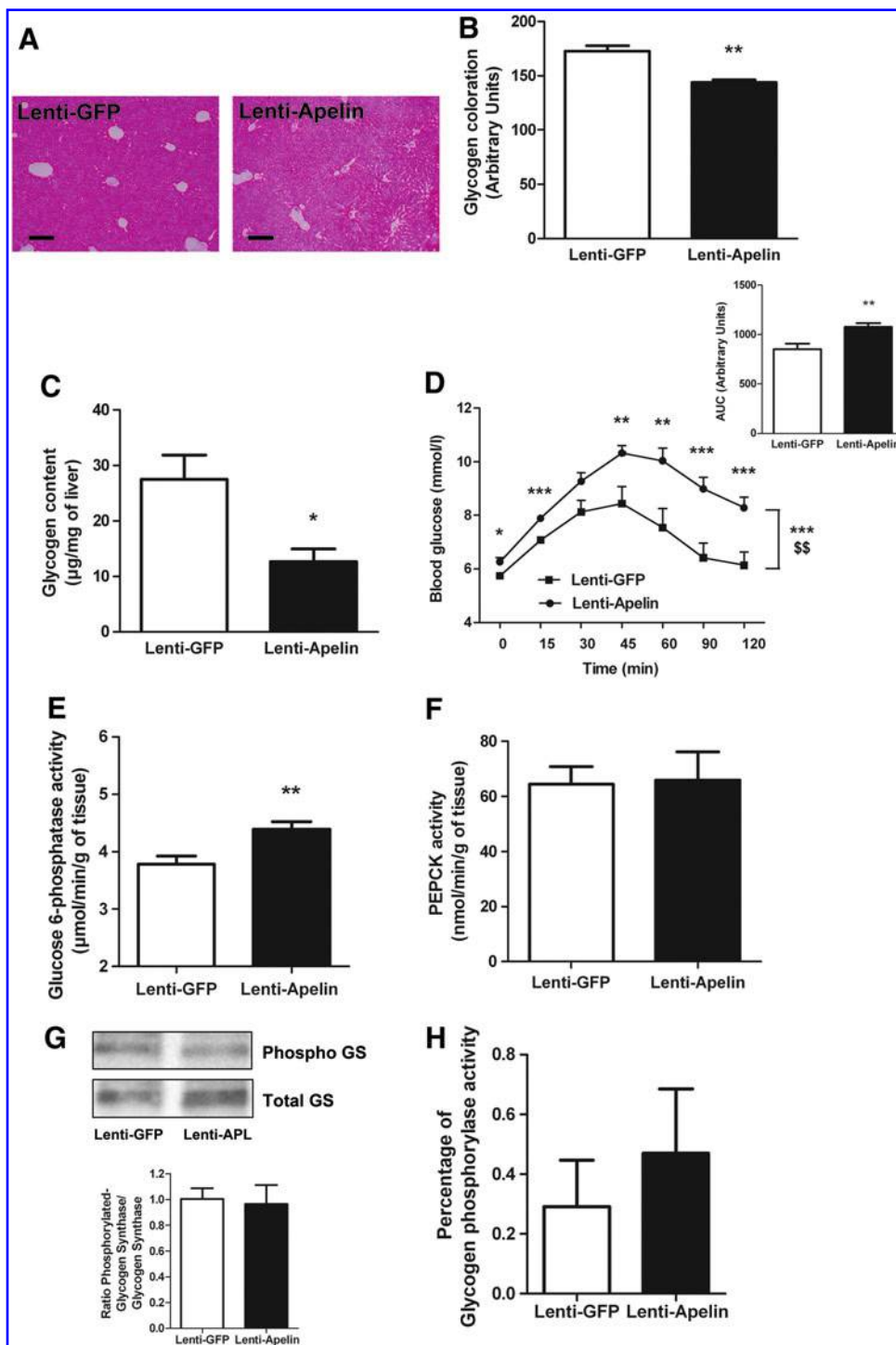


FIG. 5. Apelin over-expression into the MBH stimulates hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis. (A) Histological visualization of hepatic glycogen of fasted lenti-Apelin mice ($n=4$) compared with fasted lenti-GFP mice ($n=5$). Scale bar: $200\ \mu\text{m}$. (B) Quantification of coloration associated with the previous histological visualization. $**p<0.01$ (C) Hepatic glycogen content of fasted lenti-Apelin mice ($n=5$) compared with fasted lenti-GFP mice ($n=5$) $*p<0.05$. (D) Gluconeogenic activity of fasted lenti-Apelin mice ($n=9$) compared with fasted lenti-GFP mice ($n=9$); $*p<0.05$; $**p<0.01$; $***p<0.001$. Two-way ANOVA followed by *t*-test *post hoc* reveals time ($***p<0.001$) and treatment ($^{**\$}p<0.01$) effects. (E) Hepatic G6Pase activity in fasted lenti-Apelin mice ($n=7$) compared with fasted lenti-GFP mice ($n=9$). $**p<0.01$. (F) Hepatic PEPCK activity in fasted lenti-Apelin mice ($n=8$) compared with fasted lenti-GFP mice ($n=8$). (G) Ratio of phosphorylated hepatic glycogen synthase/total hepatic glycogen synthase in fasted lenti-Apelin mice ($n=3$) compared with fasted lenti-GFP mice ($n=3$). (H) Hepatic glycogen phosphorylase activity in fasted lenti-Apelin mice ($n=5$) compared with fasted lenti-GFP mice ($n=5$).

production and release *via* glycogenolysis and/or gluconeogenesis. Importantly, the previously described kinetics of glucose release by the liver (glycogenolysis within minutes; gluconeogenesis within hours) (45, 46, 48) clearly fits with our two waves of increased glucose release induced by icv apelin injections. The only exception of this concept is observed in HFD mice, where an icv apelin injection did not modify gluconeogenesis (Fig. 8D). This result is in accordance with data from literature showing that liver gluconeogenesis is over-activated during metabolic disorders (55), leading to hy-

pothesize that icv apelin treatment is not able to stimulate more than possible the hepatic glucose production. Moreover, these results could be correlated to the absence of stimulatory action of icv leptin on liver gluconeogenesis in over-feeding rats as opposed to normal chow-fed rats (34). In our experimental procedure, it is difficult to evaluate the potential variation of glycogenic and/or gluconeogenic enzymes activities in response to icv apelin. It is worth noting that the electrical stimulation of the hypothalamus stimulates hepatic glucose release in a few minutes, but the kinetic of activation of

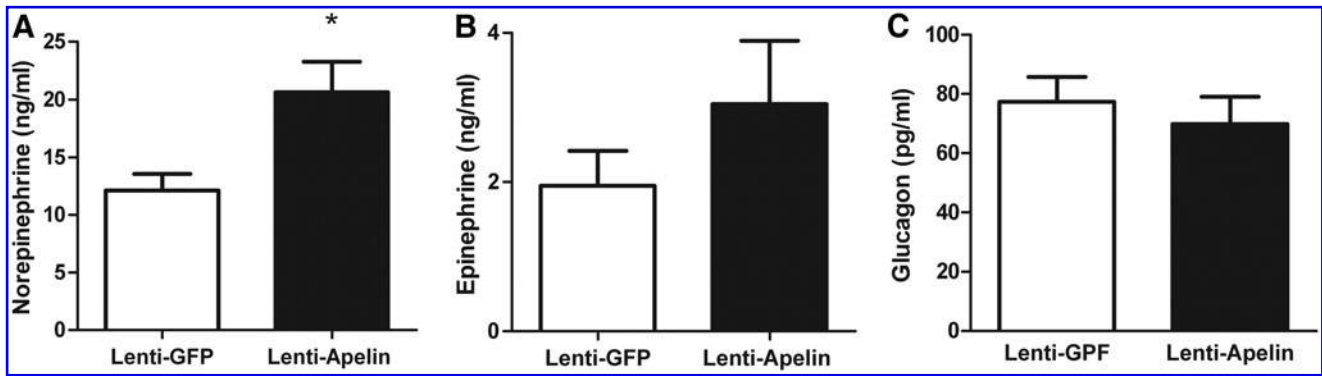


FIG. 6. Apelin over-expression into the MBH stimulates hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis *via* ANS activation. (A) Plasma norepinephrine in fasted lenti-Apelin mice ($n=5$) compared with fasted lenti-GFP mice ($n=5$); $*p<0.05$. (B) Plasma epinephrine in fasted lenti-Apelin mice ($n=5$) compared with fasted lenti-GFP mice ($n=5$). (C) Plasma glucagon in fasted lenti-Apelin mice ($n=4$) compared with fasted lenti-GFP mice ($n=4$).

enzymes precedes the effect. In fact, in response to hypothalamic stimulation, the activities of G6Pase in the liver are increased in ~ 30 s (46). However, in a longer period of time, a sustained electrical stimulation of the ventro-median hypothalamus (20 s periods once every 3 min for 4 h) increases liver PEPCCK activity after 120 min (49). Whether an acute stimulation of hypothalamic nuclei in response to icv apelin

modifies enzymes activities in the liver within seconds or minutes remains to be determined. Our data suggest a kinetic of activation closed to this, as variations of glycemia are observed from 15 to 210 min in our protocol. For this reason, we evaluate the activities of four enzymes implicated in the control of glycogenolysis and/or gluconeogenesis in the liver in all experimental conditions after 30 min of icv treatment.

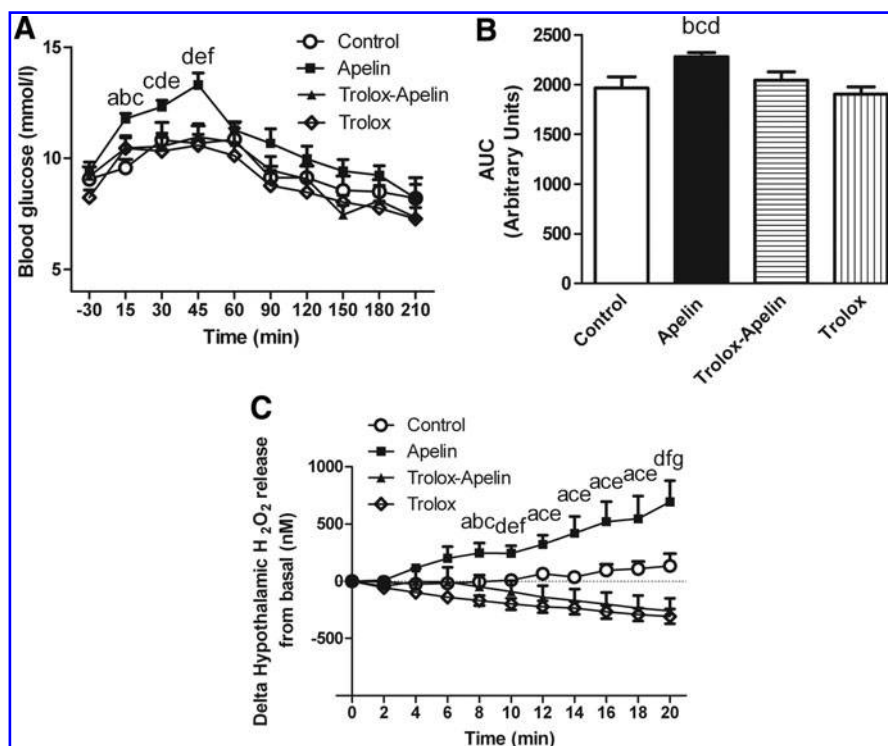


FIG. 7. Central apelin stimulates fasting hyperglycemia *via* H₂O₂ hypothalamic production in obese and diabetic mice. (A) Effect of acute icv apelin injection on blood glucose fasted high-fat diet (HFD) mice ($n=10$) compared with aCSF-injected fasted HFD mice ($n=9$), to Trolox-Apelin-injected fasted HFD mice ($n=10$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted HFD mice ($n=6$). (B) The average AUC associated with the previous fasted blood glucose. ^a $p\leq 0.001$ Apelin *versus* Control; ^b $p\leq 0.05$ Apelin *versus* Trolox-Apelin; ^c $p\leq 0.05$ Apelin *versus* Trolox; ^d $p\leq 0.01$ Apelin *versus* Control; ^e $p\leq 0.01$ Apelin *versus* Trolox; ^f $p\leq 0.01$ Apelin *versus* Trolox-Apelin. (C) *Ex vivo* hypothalamic H₂O₂ release measured by real-time amperometric detection in fasted HFD mice after injection of apelin ($n=5$) or aCSF ($n=5$) or Trolox-Apelin ($n=4$) or Trolox-aCSF ($n=4$). ^a $p\leq 0.05$ Apelin *versus* Control; ^b $p\leq 0.05$ Apelin *versus* Trolox-Apelin; ^c $p\leq 0.01$ Apelin *versus* Trolox; ^d $p\leq 0.01$ Apelin *versus* Control; ^e $p\leq 0.01$ Apelin *versus* Trolox-Apelin; ^f $p\leq 0.001$ Apelin *versus* Trolox; ^g $p\leq 0.001$ Apelin *versus* Trolox-Apelin.

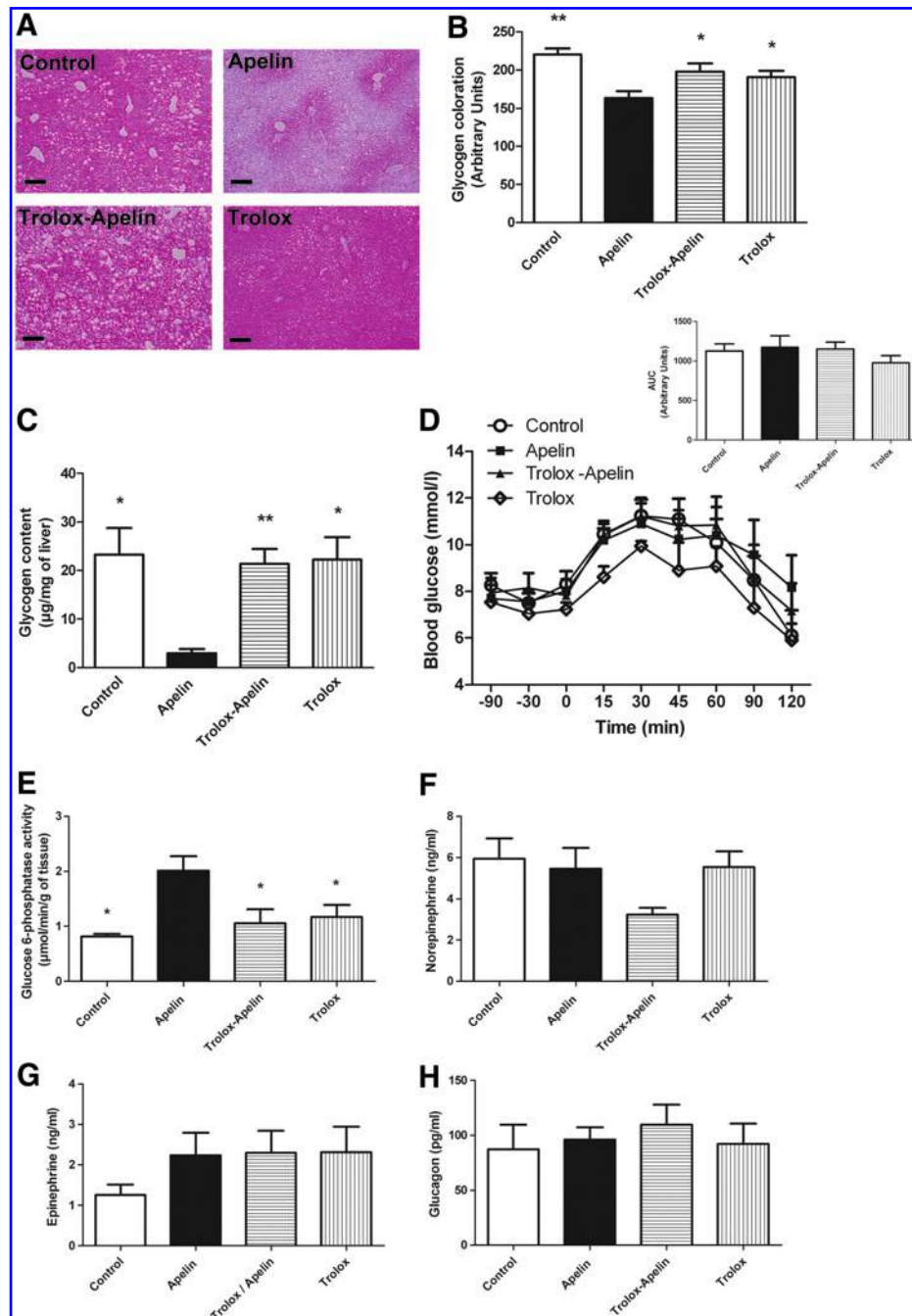
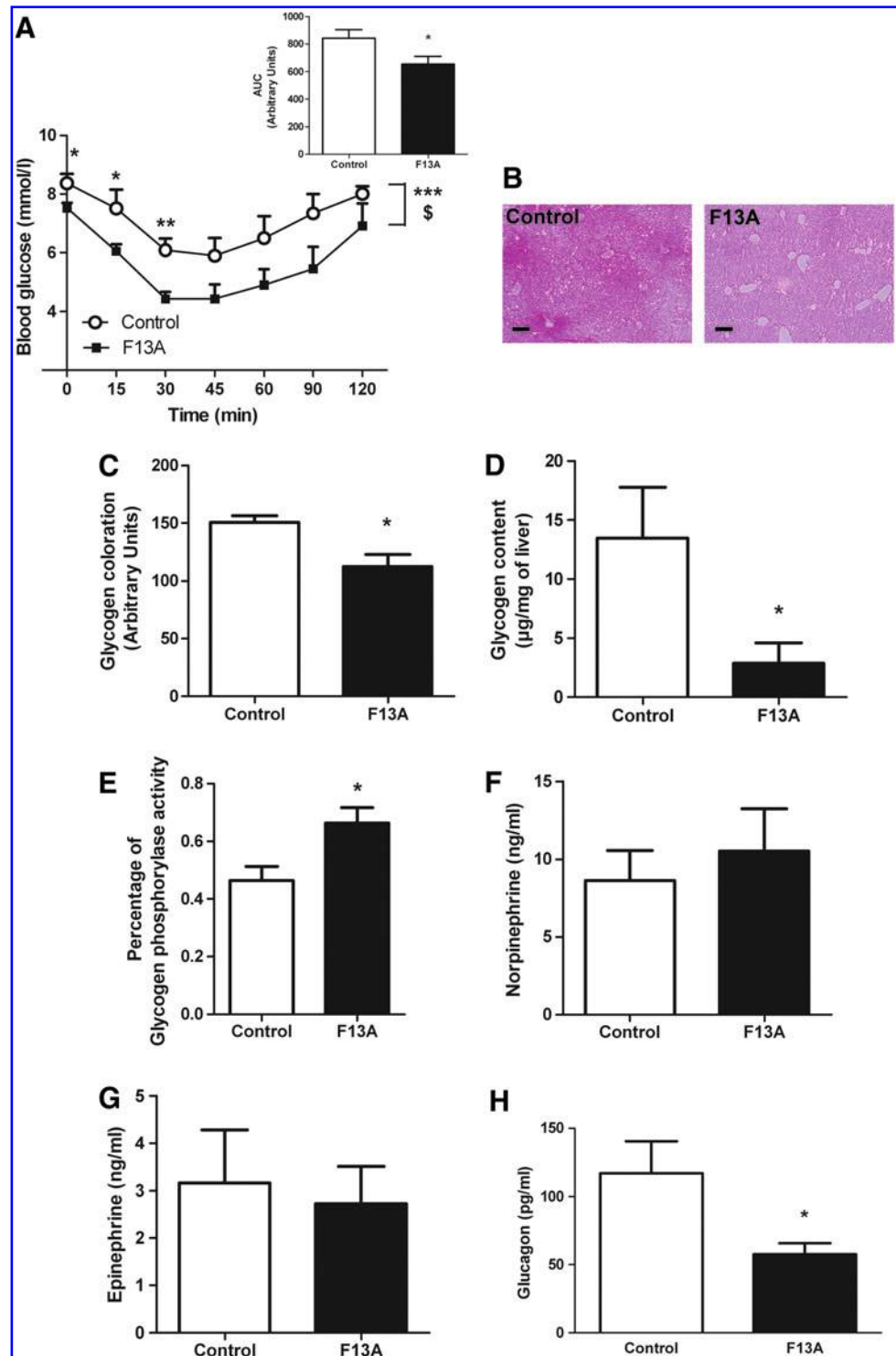


FIG. 8. Central apelin stimulates glycogenolysis via hypothalamic ROS release and ANS activation in obese and diabetic mice. (A) Histological visualization of hepatic glycogen after acute icv apelin injection on fasted HFD mice ($n=6$) compared with aCSF-injected fasted HFD mice ($n=6$), to Trolox-Apelin-injected fasted HFD mice ($n=5$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted HFD mice ($n=4$); scale bar: 200 μm . (B) Quantification of coloration associated with the previous histological visualization. $*p < 0.05$ versus Apelin; $**p < 0.01$ versus Apelin. (C) Effect of acute icv apelin injection on hepatic glycogen content of fasted HFD mice ($n=6$) compared with aCSF-injected fasted HFD mice ($n=7$), to Trolox-Apelin-injected fasted HFD mice ($n=13$), and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted HFD mice ($n=4$). $*p < 0.05$ versus Apelin; $**p < 0.01$ versus Apelin. (D) Effect of acute icv apelin injection on gluconeogenic activity of fasted HFD mice ($n=7$) compared with aCSF-injected fasted HFD mice ($n=6$), to Trolox-Apelin-injected fasted HFD mice ($n=5$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted HFD mice ($n=4$). The adjacent bar graph represents the average AUC. (E) Effect of acute icv apelin injection on hepatic G6Pase activity in fasted HFD mice ($n=4$) compared with aCSF-injected fasted HFD mice ($n=4$), to Trolox-Apelin injected in fasted HFD mice ($n=4$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted HFD mice ($n=4$). $*p < 0.05$ versus Apelin. (F) Effect of acute icv apelin injection on blood norepinephrine in fasted HFD mice ($n=7$) compared with aCSF-injected fasted HFD mice ($n=9$), to Trolox-Apelin-injected fasted HFD mice ($n=7$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted HFD mice ($n=4$). (G) Effect of acute icv apelin injection on blood epinephrine in fasted HFD mice ($n=7$) compared with aCSF-injected fasted HFD mice ($n=9$), to Trolox-Apelin-injected fasted HFD mice ($n=7$) and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted HFD mice ($n=4$). (H) Effect of acute icv apelin injection on blood glucagon in fasted HFD mice ($n=4$) compared with aCSF-injected fasted HFD mice ($n=5$), to Trolox-Apelin-injected fasted HFD mice ($n=4$), and to Trolox-aCSF (Trolox)-injected fasted HFD mice ($n=5$).

FIG. 9. Blockade of central apelin ameliorates diabetic state in HFD mice. (A) ITT in 6-h-fasted HFD mice with F13A chronic treatment ($n=6$) compared with HFD mice with aCSF chronic treatment ($n=5$), $*p<0.05$, $**p<0.01$. Two-way ANOVA followed by *t*-test *post hoc* reveals time ($***p<0.001$) and treatment ($*p<0.05$) effects. The adjacent bar graph represents the average AUC. (B) Histological visualization of hepatic glycogen of fasted HFD mice with F13A chronic treatment ($n=5$) compared with HFD mice with aCSF chronic treatment ($n=4$). Scale bar: $200\ \mu\text{m}$. (C) Quantification of coloration associated with the previous histological visualization. $*p<0.05$. (D) Hepatic glycogen content of fasted HFD mice with F13A chronic treatment ($n=5$) compared with HFD mice with aCSF chronic treatment ($n=4$). $*p<0.05$. (E) Hepatic glycogen phosphorylase activity in fasted HFD mice with F13A chronic treatment ($n=5$) compared with HFD mice with aCSF chronic treatment ($n=4$). $*p<0.05$. (F) Plasma norepinephrine in fasted HFD mice with F13A chronic treatment ($n=6$) compared with HFD mice with aCSF chronic treatment ($n=5$). (G) Plasma epinephrine in fasted HFD mice with F13A chronic treatment ($n=6$) compared with HFD mice with aCSF chronic treatment ($n=5$). (H) Plasma glucagon in fasted HFD mice with F13A chronic treatment ($n=5$) compared with HFD mice with aCSF chronic treatment ($n=3$). $*p<0.05$.



Our data show that the central apelin effect on glycemia is associated to an increase in G6Pase activity in the liver, an enzyme which is known to be implicated in the control of glycogenolysis and gluconeogenesis, which is in close correlation with hyperglycemia. In spite of the absence of variations in PEPCK, glycogen synthase, and glycogen phosphorylase in normal conditions, lentivectors expressed apelin or HFD mice models, we cannot totally exclude an implication of those enzymes on hepatic glucose production in response to icv apelin. Indeed, due to a large range of time

of kinetics of glycemia (from 0 to 210 min) which could make us miss interesting results, it will be easy to speculate that specific variations of one or more types of enzymes may vary during this time-course period.

The importance of ROS in the pathological state is well documented. Obese and insulin-resistant rodents present a profoundly altered hypothalamic mROS signaling (8). Indeed, metabolic abnormal responses are in close correlation with increased hypothalamic mROS level, leading to a constitutive oxidized environment at both the cellular and

mitochondrial levels associated to a dysfunction in mitochondrial respiration (8). Here, we found that hypothalamic action of apelin needs an ROS/H₂O₂-dependent production to stimulate hepatic glucose release to induce fasted hyperglycemia. Using specific probes that detect H₂O₂ in real time, we demonstrate that exogenous apelin applied on hypothalamic explants from normal mice stimulates H₂O₂ release. Interestingly, this H₂O₂ release is exacerbated in hypothalamic explants from HFD mice. Those data are in accordance with literature linking high levels of hypothalamic mROS, and, in particular H₂O₂, are deleterious for the control of glucose homeostasis, and, more specifically, in diabetic models (23). Indeed, mitochondrial respiration that is considered the primary source of H₂O₂ (3) is profoundly increased in the hypothalamus of diabetic rodents in association with high levels of ROS (8). Our original approach to measure H₂O₂ is used here for the first time in *ex vivo* hypothalami and gives access to a new technology to determine the exact quantity of H₂O₂ release directly in tissue, which is of crucial importance to unravel the role of ROS in the biological process (32). Then, levels of H₂O₂ measured in our experimental conditions reinforced the hypothesis that an increase in H₂O₂ release by tissue is clearly associated to a pathological state (53).

In spite of the fact that apelin is known to have an antioxidant effect (16), some publications reveal that apelin may be considered a new oxidative marker. First, Yu *et al.* (58) suggest that high levels of plasma apelin observed in obese/diabetic patients may be not only the results of compensatory response to insulin resistance, but also a causative factor of insulin resistance. Then, apelin can participate in the establishment of an inflammatory and oxidative stress state observed in metabolic disorders. In neuronal cell culture, exogenous apelin treatment increases ROS production (57). Our data show that apelin effects on hepatic glucose metabolism are mediated by ROS in *in vivo* and *ex vivo* conditions. Such a deleterious environment caused by apelin in the hypothalamus may be one of the first signals triggering a diabetic state, that is, fasted hyperglycemia. The hypothesis of the existence of a link between apelin and inflammation is reinforced by our results demonstrating that apelin over-expression in the ventromedian hypothalamus increase the mRNA expression of the pro-inflammatory marker TNF α in the hypothalamus. This specific variation in hypothalamic inflammation generated by apelin, without modification of peripheral inflammation, is responsible for the emergence of a type 2 diabetic state, including fasted hyperglycemia and insulin intolerance (6). This diabetic phenotype is clearly linked with an increase in (i) G6Pase activity in the liver and (ii) plasma norepinephrine concentration. Then, alteration of hypothalamic signaling (*i.e.*, ROS and inflammation) by apelin leads to type 2 diabetes characteristics.

The role of ANS in the control of glucose homeostasis is well established. Metabolic disorders are characterized by increased basal SNS activity but an impaired sympathetic response to various stimuli, such as insulin (18). Here, we show that basal norepinephrine level is increased in hypothalamic apelin over-expressing mice, suggesting an increase in basal SNS tone activity. These data are in accordance with those of Masaki *et al.* (27), who demonstrate that a microinjection of apelin into the paraventricular nucleus of the hypothalamus increases sympathetic nerve activity.

Norepinephrine can exert its action in the whole body *via* alpha(1–2) and/or beta(1–2) receptors. In the liver of adult rodents, hepatic glucose production is regulated *via* alpha(1) receptors (28), as (i) blockade of alpha(2) receptors did not modify glycogenolysis (31), and (ii) beta receptors become irrelevant in the livers of mice at adulthood (13). Our data confirm the importance of alpha(1) regulatory pathway of glycemia, as blockade of alpha(1) adrenergic receptors failed to increase icv apelin-induced hyperglycemia. Whether SNS activation occurs early in the process or secondary to long-standing metabolic syndrome is unclear, but our data obtained after an icv acute injection of apelin strongly supports the first hypothesis. Indeed, Prior *et al.* (37) show that a short-term HFD (4 weeks) drives toward sympathetic activation associated to an increase in visceral fat depot. On the contrary, we were not able to observe a significant increase in plasma norepinephrine levels in our 3 months HFD mice. The logical explanation of this result is the fact that over time, with obesity, adrenoreceptors down-regulation and/or reduced sensitivity are likely to develop in peripheral tissue, resulting in reduced sympathetic responsiveness (18). Then, this possibility could also explain the absence of activation of gluconeogenesis but not glycogenolysis in HFD mice.

Additional to SNS regulation, hepatic glucose production is under the influence of glucagon (41). Here, we show that acute icv apelin stimulates plasma glucagon secretion in normal mice, suggesting that glucagon is able to participate to fasted hyperglycemia. In accordance to our results, the group of Cherrington clearly demonstrates that in response to a physiological rise in glucagon, the increase observed in hepatic glucose production is entirely attributable to glycogenolysis but not (or little to quote the authors) to gluconeogenesis (41). Then, glucagon could be one important molecular actor participating in deleterious central action of apelin during the onset of a type 2 diabetes. In longer time, when type 2 diabetes is well established, icv apelin cannot increase glucagon secretion as observed in HFD mice, suggesting that hyperglucagonemia of those diabetic mice is too important to be even more increased. For all these reasons, therapeutic strategies cannot rule out the importance of pancreatic alpha cells as potential good targets to treat hyperglycemia and insulin resistance (5). In our central apelin to liver axis, the participation of glucagon to hyperglycemia is real, but lentivectors approach tends to focus on a direct norepinephrine action on liver, as plasma norepinephrine is increased in lentivectors apelin mice, but not glucagon.

Our data show that central apelin participates in the establishment of type 2 diabetes. We have previously shown that obese/diabetic mice present an increase in plasma apelin (11) and in hypothalamic apelin expression (42). The hypothalamus is a neurohemal structure that facilitates communication with peripheral signal, including hormones and metabolites. Then, in physiological and pathological conditions, the hypothalamus may be influenced by hypothalamic and/or peripheral apelin. To test whether targeting central apelin in an advanced type 2 diabetes could ameliorate the metabolic phenotype, we have injected obese/diabetic mice (3 months HFD) during 14 consecutive days with icv APJ antagonist. This experimental approach blocks the potential effect of hypothalamic and peripheral apelin on hypothalamic neurons. Then, we found that icv APJ antagonist-treated mice present a clear amelioration of their diabetic state, including a decrease in insulin

intolerance, fasted hyperglycemia, plasma glucagon, and liver glycogen content associated to an increase in glycogen phosphorylase activity. No significant variation in plasma norepinephrine and epinephrine was observed between the two groups, reinforcing the hypothesis of a possible adrenoceptor down-regulation in specific tissue and/or reduced sympathetic responsiveness as explained next. These data confirm that the decrease in glycogen content and fasted hyperglycemia is the result of an increase in insulin sensitivity provoked by blockade of central apelin. We can speculate that a longer time treatment may modify the activities of others targets such as G6Pase, PEPCK, and glycogen synthase. In fact, we show that in a well-established diabetic models (HFD), central apelin may be a potential target to treat diabetes, with a similar peripheral target to prediabetic mice (mimicked by icv apelin injected mice and apelin expressed lentivirals mice), that is, the liver.

Although the present set of experiments link hypothalamic apelin/ROS with hepatic glucose metabolism, we acknowledge that the exact molecular and cellular mechanisms implicated in the cross-talks observed between these key organs remained to be elucidated.

In conclusion, we identify a hypothalamic apelin/ROS signaling pathway that is implicated in the control of liver glucose metabolism *via* the SNS. Abnormal hypothalamic level of apelin observed in obese/diabetic mice participates in over-activation of SNS, which improves fasted hyperglycemia a characteristic of type 2 diabetes. Thus, we propose that central apelin could be one new target at the core of the regulation of glucose homeostasis and metabolic disorders.

Materials and Methods

Mice

Animals were handled in accordance with the principles and guidelines established by the National Institute of Medical Research (INSERM) and by the local ethical committee. C57Bl6/J mice were obtained from Charles River Laboratory. Mice were housed conventionally at a constant temperature (20°C–22°C) and humidity (50%–60%) animal room and with a 12/12 h light/dark cycle (lights off at 7:00 AM) and free access to food and water through the 24 h period. All injections and experiments were performed in 13–15-week-old males. A group of male mice was subjected to HFD containing 20% protein, 35% carbohydrate, and 45% fat (SAFE). HFD-fed mice were followed at regular intervals with measure of weight and blood parameters (glucose, insulin) until they were obese and insulin resistant corresponding to 3 months of HFD. Experiments were performed on 6 h-fasted mice. During the time of the experiment, mice fed overnight were placed in a new clean cage without food. In all experiments, icv apelin did not modify body weight of mice (11) and general behavior (unpublished data).

Plasmid construction and lentivector production

The lentiviral plasmid pTRIP-DU3-CMV-MCS was derived from the pTRIP-DU3-EF1a-EGFP plasmid by replacing the EF1a promoter and EGFP by the cytomegalovirus (CMV) promoter and a multiple cloning site (MCS), respectively (50). The cDNA encoding the murine apelin gene (EMBL accession number AJ290423), corresponding to the coding region flanked by 100 and 23 nucleotides of 5'- and 3'-untranslated regions, respectively, was subcloned into the lentivectorpTRIP-DU3-

CMV-MCS (43). The lentivectors were produced by tri-transfection of pTRIP-DU3-CMV-apelin and pLvPack and pLvVSVg packaging plasmids (Sigma-Aldrich) in HEK 293FT cells (4).

Surgical procedures

For *in vivo* acute perfusions, an indwelling icv catheter (Alzet Brain Perfusion Kit 3; 1–3 mm (Charles River Laboratory) – 1 mm lateral to the sagittal suture, – 0.2 mm posterior to the bregma and – 1.7 mm below the skull surface) was implanted in anesthetized mice with isoflurane (Abbott).

Acute injections

Apelin. Bolus injection of 2 μ l of [Pyr]apelin-13 (concentration 20 nM corresponding to 40 fmol; Bachem), the most active apelin isoform (10), was injected directly into the icv catheter completed to 2 μ l of artificial cerebrospinal fluid (aCSF) for treated mice, or 4 μ l of aCSF for control mice. Blood glycemia was measured every 30 min from – 30 to 210 min (time 0 corresponding to icv apelin injection). The dose of apelin (2 μ l of 20 nM, *i.e.*, 40 fmol) corresponds approximately to the half quantity of total tissular apelin found in a normal mouse hypothalamus (near to 74 fmol per hypothalamus), and this injection leads approximately to the quantity found in an HFD mouse (near to 111 fmol per hypothalamus).

Antioxidant. Similar experiments were performed with an antioxidant, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox; Sigma), which was dissolved extemporaneously in aCSF, and then infused at a concentration of 1 mM (2 μ l). At this concentration, trolox is known to prevent peripheral hyperinsulinemia by blocking hypothalamic ROS production *in vivo* (24). Trolox infusion was started 30 min before the beginning of the apelin injection.

Inhibitor of NADPH oxidase. Similar experiments were performed with an inhibitor of NADPH oxidase, DPI chloride (Sigma), which was dissolved extemporaneously in aCSF, and then infused at a concentration of 1 mM (2 μ l). At this concentration, DPI inhibits NADPH oxidase in the brain (19). DPI infusion was started 30 min before the beginning of the apelin injection.

APJ antagonist. Similar experiments were performed with an APJ antagonist, F13A (polypeptide) (22), which was dissolved extemporaneously in aCSF, and then infused at a concentration of 2 μ g/mouse (2 μ l). At this concentration, F13A inhibits apelin effects in the brain (26). F13A infusion was started 30 min before the beginning of the apelin injection.

Intraperitoneal injection of antagonist of α 1-adrenergic receptors. 120 min before apelin or aCSF icv injection, prazosin (Prazosin hydrochloride; Sigma) was injected intraperitoneally as previously described (39). Prazosin was dissolved extemporaneously in saline solution, and then infused at a concentration of 0.3 mg/kg. At this concentration, prazosin blocks α 1-adrenergic receptors without perturbation of fasted glycemia (20).

Chronic injections

F13A. Male mice fed a HFD during 3 months received every day during 2 weeks a bolus injection of 2 μ l of F13A

(2 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) that was injected directly into the icv catheter completed to 2 μl of aCSF for treated HFD mice, or 4 μl of aCSF for control HFD mice.

Bilateral lentivector injection in the MBH

Protocol is explained in details in Supplementary Materials and Methods section.

H₂O₂ measurements by fluorometric methods

Amplex Red (10-acetyl-3,7-dihydrophenoxazine) was used as a fluorescent probe for the detection of H₂O₂. Protocol is explained in detail in Supplementary Materials and Methods section.

Real-time amperometric H₂O₂ measurements

Mice were sacrificed after 6 h of fasting conditions. Protocol is explained in details in Supplementary Materials and Methods section. Data are expressed as delta variation of H₂O₂ release from basal as previously used for amperometric nitric oxide (NO) measurement (11, 12).

Tissues

Mice were fasted for 6 h, and blood samples were collected between 15 and 30 min after the acute injection of apelin or aCSF (these times correspond to the period of release of glucose by the liver glycogenolysis), or after the 6 h fasted for mice with lentivirus injection. Plasma was removed and frozen, powdered in liquid nitrogen, and kept at -80°C until catecholamine assays were performed. Mice were also decapitated without anesthesia. After dissection, liver fragments were also rapidly removed, frozen, powdered in liquid nitrogen, and kept at -80°C until glycogen assays were performed.

Liver glycogen determination

Glycogen content was determined as previously described (21) and explained in the Supplementary Materials and Methods section.

Enzymatic activities

Hepatic G6Pase activity was determined as previously described in detail (40). Results are expressed as $\mu\text{moles}/\text{min}$ per gram of wet tissue. Hepatic PEPCK activity was determined with the methods of Pogson and Smith (35). Results are expressed as nmol/min per gram of wet tissue. Hepatic glycogen phosphorylase activity assay was determined as previously described (33). Results are expressed as a percentage of activity. Glycogen Synthase activity was evaluated by the ratio of phosphorylated protein/total protein. Immunoblots were performed as previously described (11). Membranes were incubated overnight at 4°C with a primary polyclonal antibody against total Glycogen Synthase (dilution 1/1000; Cell Signaling Technology) or the phosphorylated active form (Ser641) of Glycogen Synthase (dilution 1/1000; Cell Signaling Technology).

Histological revelation of glycogen or lipid content

Liver lobe was taken along with the tissues for different assays. The samples were included in Carnoy solution for

24 h, then in 20% sucrose solution for 48 h, and then frozen at -80°C in tissue Teck (Polyfreez; Sigma). Ten-micrometer-thin cryostat sections were made from livers. Glycogen was visualized with Periodic Acid-Schiff staining. The quantifying of the staining was performed with the software Adobe® Photoshop®. Lipids were visualized by Oil-Red staining. Hepatic TGs content was determined as described (17).

Plasma assays

Plasma catecholamine concentration was measured after 6 h of fasting in all protocols and after 6 h of fasting and 30 min for acute icv treatment. Catecholamine content of the plasma was determined as previously described in detail using high-performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection after alumina extraction (29). Plasma glucagon content was determined with a commercial available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Glucagon Quantikine; R&D Systems). Plasma ketone bodies content was determined with a commercial kit (Ketone bodies assay kit, Antibodies). Plasma apelin content was determined with a commercial available ELISA kit (Phoenix Pharmaceuticals). Plasma TGs were determined as described (17).

Pyruvate tolerance test

Six-hour-fasted mice were injected with an intraperitoneal pyruvate injection (2 mg/g) after an icv acute injection or unless icv injection (lentivirus). Blood was collected from the tail vein at $-30, 0, 15, 30, 45, 60, 90,$ and 120 min later for determination of glucose levels.

Insulin tolerance test

Six-hour-fasted mice were injected with an intraperitoneal insulin injection (0.5 mU/g for mice with lentivirus, or 1 mU/g for HFD mice with chronic icv F13A treatment), as previously described (52). Blood was collected from the tail vein at $-30, 0, 15, 30, 45, 60, 90,$ and 120 min later for determination of glucose levels.

Real-time PCR

Total RNA from tissues was prepared using the TriPure reagent (Roche) as described (14, 17). Quantization and integrity analysis of total RNA was performed as previously described (17). Protocol is explained in detail in Supplementary Materials and Methods section.

Statistical analysis

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

Acknowledgments

The authors are grateful to Valérie Montel and Edith Renaud for technical assistance and Yannick Delpu and Hélène Le Bras for helpful discussion. P.D.C. is a research associate

from the FRS-FNRS (Fonds de la Recherche Scientifique), Belgium. This work was supported by the Société Française de Nutrition (SFN).

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Agius L. New hepatic targets for glycaemic control in diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 21: 587–605, 2007.
2. Anderson EJ, Lustig ME, Boyle KE, Woodlief TL, Kane DA, Lin CT, Price JW, 3rd, Kang L, Rabinovitch PS, Szeto HH, Houmard JA, Cortright RN, Wasserman DH, and Neuffer PD. Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J Clin Invest* 119: 573–581, 2009.
3. Bao L, Avshalumov MV, Patel JC, Lee CR, Miller EW, Chang CJ, and Rice ME. Mitochondria are the source of hydrogen peroxide for dynamic brain-cell signaling. *J Neurosci* 29: 9002–9010, 2009.
4. Bernard H, Garmy-Susini B, Ainaoui N, Van Den Berghe L, Peurichard A, Javerzat S, Bikfalvi A, Lane DP, Bourdon JC, and Prats AC. The p53 isoform, Delta133p53alpha, stimulates angiogenesis and tumour progression. *Oncogene* 32: 2150–2160, 2012.
5. Burcelin R, Knauf C, and Cani PD. Pancreatic alpha-cell dysfunction in diabetes. *Diabetes Metab* 34 Suppl 2: S49–S55, 2008.
6. Cai D. Neuroinflammation and neurodegeneration in over-nutrition-induced diseases. *Trends Endocrinol Metab* 24: 40–47, 2013.
7. Castan-Laurell I, Dray C, Knauf C, Kunduzova O, and Valet P. Apelin, a promising target for type 2 diabetes treatment? *Trends Endocrinol Metab* 23: 234–241, 2012.
8. Colombani AL, Carneiro L, Benani A, Galinier A, Jaillard T, Duparc T, Offer G, Lorsignol A, Magnan C, Casteilla L, Penicaud L, and Leloup C. Enhanced hypothalamic glucose sensing in obesity: alteration of redox signaling. *Diabetes* 58: 2189–2197, 2009.
9. Consoli A. Role of liver in pathophysiology of NIDDM. *Diabetes Care* 15: 430–441, 1992.
10. Dray C, Knauf C, Daviaud D, Waget A, Boucher J, Buleon M, Cani PD, Attane C, Guigne C, Carpenne C, Burcelin R, Castan-Laurell I, and Valet P. Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 8: 437–445, 2008.
11. Duparc T, Colom A, Cani PD, Massaly N, Rastrelli S, Drougard A, Le Gonidec S, Mouledous L, Frances B, Leclercq I, Llorens-Cortes C, Pospisilik JA, Delzenne NM, Valet P, Castan-Laurell I, and Knauf C. Central apelin controls glucose homeostasis via a nitric oxide-dependent pathway in mice. *Antioxid Redox Signal* 15: 1477–1496, 2011.
12. Duparc T, Naslain D, Colom A, Muccioli GG, Massaly N, Delzenne NM, Valet P, Cani PD, and Knauf C. Jejunum inflammation in obese and diabetic mice impairs enteric glucose detection and modifies nitric oxide release in the hypothalamus. *Antioxid Redox Signal* 14: 415–423, 2011.
13. Erraji-Benchekroun L, Couton D, Postic C, Borde I, Gaston J, Guillet JG, and Andre C. Overexpression of beta2-adrenergic receptors in mouse liver alters the expression of gluconeogenic and glycolytic enzymes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E715–E722, 2005.
14. Everard A, Geurts L, Van Roye M, Delzenne NM, and Cani PD. Tetrahydro iso-alpha acids from hops improve glucose homeostasis and reduce body weight gain and metabolic endotoxemia in high-fat diet-fed mice. *PLoS One* 7: e33858, 2012.
15. Fisher-Wellman KH and Neuffer PD. Linking mitochondrial bioenergetics to insulin resistance via redox biology. *Trends Endocrinol Metab* 23: 142–153, 2012.
16. Foussal C, Lairez O, Calise D, Pathak A, Guilbeau-Frugier C, Valet P, Parini A, and Kunduzova O. Activation of catalase by apelin prevents oxidative stress-linked cardiac hypertrophy. *FEBS Lett* 584: 2363–2370, 2010.
17. Geurts L, Everard A, le Ruyet P, Delzenne NM, and Cani PD. Ripened dairy products differentially affect hepatic lipid content and adipose tissue oxidative stress markers in obese and type 2 diabetic mice. *J Agric Food Chem* 60: 2063–2068, 2012.
18. Greenfield JR and Campbell LV. Role of the autonomic nervous system and neuropeptides in the development of obesity in humans: targets for therapy? *Curr Pharm Des* 14: 1815–1820, 2008.
19. Jaillard T, Roger M, Galinier A, Guillou P, Benani A, Leloup C, Casteilla L, Penicaud L, and Lorsignol A. Hypothalamic reactive oxygen species are required for insulin-induced food intake inhibition: an NADPH oxidase-dependent mechanism. *Diabetes* 58: 1544–1549, 2009.
20. John GW, Doxey JC, Walter DS, and Reid JL. The role of alpha- and beta-adrenoceptor subtypes in mediating the effects of catecholamines on fasting glucose and insulin concentrations in the rat. *Br J Pharmacol* 100: 699–704, 1990.
21. Knauf C, Cani PD, Perrin C, Iglesias MA, Maury JF, Bernard E, Benhamed F, Gremeaux T, Drucker DJ, Kahn CR, Girard J, Tanti JF, Delzenne NM, Postic C, and Burcelin R. Brain glucagon-like peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage. *J Clin Invest* 115: 3554–3563, 2005.
22. Lee DK, Saldivia VR, Nguyen T, Cheng R, George SR, and O'Dowd BF. Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action. *Endocrinology* 146: 231–236, 2005.
23. Leloup C, Casteilla L, Carriere A, Galinier A, Benani A, Carneiro L, and Penicaud L. Balancing mitochondrial redox signaling: a key point in metabolic regulation. *Antioxid Redox Signal* 14: 519–530, 2011.
24. Leloup C, Magnan C, Benani A, Bonnet E, Alquier T, Offer G, Carriere A, Periquet A, Fernandez Y, Ktorza A, Casteilla L, and Penicaud L. Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing. *Diabetes* 55: 2084–2090, 2006.
25. Levin BE, Magnan C, Dunn-Meynell A, and Le Foll C. Metabolic sensing and the brain: who, what, where, and how? *Endocrinology* 152: 2552–2557, 2011.
26. Lv SY, Qin YJ, Wang NB, Yang YJ, and Chen Q. Supraspinal antinociceptive effect of apelin-13 in a mouse visceral pain model. *Peptides* 37: 165–170, 2012.
27. Masaki T, Yasuda T, and Yoshimatsu H. Apelin-13 micro-injection into the paraventricular nucleus increased sympathetic nerve activity innervating brown adipose tissue in rats. *Brain Res Bull* 87: 540–543, 2012.
28. Miyamoto L, Ebihara K, Kusakabe T, Aotani D, Yamamoto-Kataoka S, Sakai T, Aizawa-Abe M, Yamamoto Y, Fujikura J, Hayashi T, Hosoda K, and Nakao K. Leptin activates hepatic 5'-AMP-activated protein kinase through

- sympathetic nervous system and alpha1-adrenergic receptor: a potential mechanism for improvement of fatty liver in lipodystrophy by leptin. *J Biol Chem* 287: 40441–40447, 2012.
29. Molendi-Coste O, Grumolato L, Laborie C, Lesage J, Maubert E, Ghzili H, Vaudry H, Anouar Y, Breton C, and Vieau D. Maternal perinatal undernutrition alters neuronal and neuroendocrine differentiation in the rat adrenal medulla at weaning. *Endocrinology* 147: 3050–3059, 2006.
 30. Moore MC, Connolly CC, and Cherrington AD. Auto-regulation of hepatic glucose production. *Eur J Endocrinol* 138: 240–248, 1998.
 31. Morgan NG, Blackmore PF, and Exton JH. Age-related changes in the control of hepatic cyclic AMP levels by alpha 1- and beta 2-adrenergic receptors in male rats. *J Biol Chem* 258: 5103–5109, 1983.
 32. Murphy MP, Holmgren A, Larsson NG, Halliwell B, Chang CJ, Kalyanaraman B, Rhee SG, Thornalley PJ, Partridge L, Gems D, Nystrom T, Belousov V, Schumacker PT, and Winterbourn CC. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab* 13: 361–366, 2011.
 33. Perez-Maceira JJ, Mancebo MJ, and Aldegunde M. Serotonin-induced brain glycogenolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 215: 2969–2979, 2012.
 34. Pocai A, Morgan K, Buettner C, Gutierrez-Juarez R, Obici S, and Rossetti L. Central leptin acutely reverses diet-induced hepatic insulin resistance. *Diabetes* 54: 3182–3189, 2005.
 35. Pogson CI and Smith SA. The activity of phosphoenolpyruvate carboxykinase in rat tissues. Assay techniques and effects of dietary and hormonal changes. *Biochem J* 152: 401–408, 1975.
 36. Postic C, Dentin R, and Girard J. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab* 30: 398–408, 2004.
 37. Prior LJ, Eikelis N, Armitage JA, Davern PJ, Burke SL, Montani JP, Barzel B, and Head GA. Exposure to a high-fat diet alters leptin sensitivity and elevates renal sympathetic nerve activity and arterial pressure in rabbits. *Hypertension* 55: 862–868, 2010.
 38. Prodi E and Obici S. Minireview: the brain as a molecular target for diabetic therapy. *Endocrinology* 147: 2664–2669, 2006.
 39. Purkayastha S, Zhang H, Zhang G, Ahmed Z, Wang Y, and Cai D. Neural dysregulation of peripheral insulin action and blood pressure by brain endoplasmic reticulum stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 2939–2944, 2011.
 40. Rajas F, Bruni N, Montano S, Zitoun C, and Mithieux G. The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology* 117: 132–139, 1999.
 41. Ramnanan CJ, Edgerton DS, Kraft G, and Cherrington AD. Physiologic action of glucagon on liver glucose metabolism. *Diabetes Obes Metab* 13 Suppl 1: 118–125, 2011.
 42. Reaux-Le Goazigo A, Bodineau L, De Mota N, Jeandel L, Chartrel N, Knauf C, Raad C, Valet P, and Llorens-Cortes C. Apelin and the proopiomelanocortin system: a new regulatory pathway of hypothalamic alpha-MSH release. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301: E955–E966, 2011.
 43. Saint-Geniez M, Masri B, Malecaze F, Knibiehler B, and Audigier Y. Expression of the murine msr/apj receptor and its ligand apelin is upregulated during formation of the retinal vessels. *Mech Dev* 110: 183–186, 2002.
 44. Shimazu T. The effect of electric stimulation of hypothalamus on rabbit liver tryptophan pyrrolase. *Biochim Biophys Acta* 65: 373–375, 1962.
 45. Shimazu T and Fujimoto T. Regulation of glycogen metabolism in liver by the autonomic nervous system. IV. Neural control of glycogen biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 252: 18–27, 1971.
 46. Shimazu T and Fukuda A. Increased activities of glycogenolytic enzymes in liver after splanchnic-nerve stimulation. *Science* 150: 1607–1608, 1965.
 47. Shimazu T. Central nervous system regulation of liver and adipose tissue metabolism. *Diabetologia* Suppl:343–356, 1981.
 48. Shimazu T, Fukuda A, and Ban T. Reciprocal influences of the ventromedial and lateral hypothalamic nuclei on blood glucose level and liver glycogen content. *Nature* 210: 1178–1179, 1966.
 49. Shimazu T and Ogasawara S. Effects of hypothalamic stimulation on gluconeogenesis and glycolysis in rat liver. *Am J Physiol* 228: 1787–1793, 1975.
 50. Sirven A, Ravet E, Charneau P, Zennou V, Coulombel L, Guetard D, Pflumio F, and Dubart-Kupperschmitt A. Enhanced transgene expression in cord blood CD34(+)–derived hematopoietic cells, including developing T cells and NOD/SCID mouse repopulating cells, following transduction with modified trip lentiviral vectors. *Mol Ther* 3: 438–448, 2001.
 51. Thaler JP and Schwartz MW. Minireview: inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. *Endocrinology* 151: 4109–4115, 2010.
 52. Tiraby C, Tavernier G, Capel F, Mairal A, Crampes F, Rami J, Pujol C, Boutin JA, and Langin D. Resistance to high-fat-diet-induced obesity and sexual dimorphism in the metabolic responses of transgenic mice with moderate uncoupling protein 3 overexpression in glycolytic skeletal muscles. *Diabetologia* 50: 2190–2199, 2007.
 53. Veal E and Day A. Hydrogen peroxide as a signaling molecule. *Antioxid Redox Signal* 15: 147–151, 2011.
 54. Villeneuve C, Guilbeau-Frugier C, Sicard P, Lairez O, Ordener C, Duparc T, De Paulis D, Couderc B, Spreux-Varoquaux O, Tortosa F, Garnier A, Knauf C, Valet P, Borch E, Nediani C, Gharib A, Ovize M, Delisle MB, Parini A, and Mialet-Perez J. p53-PGC-1alpha pathway mediates oxidative mitochondrial damage and cardiomyocyte necrosis induced by monoamine oxidase-A upregulation: role in chronic left ventricular dysfunction in mice. *Antioxid Redox Signal* 18: 5–18, 2012.
 55. Wahren J and Ekberg K. Splanchnic regulation of glucose production. *Annu Rev Nutr* 27: 329–345, 2007.
 56. Yamada T and Katagiri H. Avenues of communication between the brain and tissues/organs involved in energy homeostasis. *Endocr J* 54: 497–505, 2007.
 57. Yao F, Modgil A, Zhang Q, Pingili A, Singh N, O'Rourke ST, and Sun C. Pressor effect of apelin-13 in the rostral ventrolateral medulla: role of NAD(P)H oxidase-derived superoxide. *J Pharmacol Exp Ther* 336: 372–380, 2011.
 58. Yu S, Zhang Y, Li MZ, Xu H, Wang Q, Song J, Lin P, Zhang L, Liu Q, Huang QX, Wang K, and Hou WK. Chemerin and apelin are positively correlated with inflammation in obese type 2 diabetic patients. *Chin Med J (Engl)* 125: 3440–3444, 2012.

Address correspondence to:

Dr. Claude Knauf
I2MC, CHU Rangueil
1 Avenue Jean Poulhès, BP 84225
31432 Toulouse Cedex 4
France

E-mail: claud.knauf@inserm.fr

3. Discussion

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence l'acteur hypothalamique impliqué dans les effets hyperglycémisants de l'apeline, ainsi qu'un organe cible périphérique : le foie. Les forts taux d'apeline hypothalamique génèrent une production d'EOs hypothalamiques, activant le SNS, ciblant directement le foie et engendrant une augmentation de la production hépatique de glucose. Dans le contexte physiopathologique et via cette voie de signalisation, l'apeline serait donc impliquée dans la transition entre un état sain vers un état obèse/diabétique.

a. Lien EAOs-Apeline

Dans un premier modèle d'injection icv aigue d'apeline chez des souris saines à jeun depuis 6 heures, nous montrons que l'hyperglycémie générée par l'apeline peut être annulée par un pré-traitement au trolox. Cette expérience permet de révéler un lien direct entre un médiateur hypothalamique de la famille des EAOs et l'hyperglycémie. Dans la littérature, il a été mis en évidence que l'apeline génère une libération d'EOs par des neurones en culture via l'activation de la NADPH Oxydase [383]. Nous avons donc voulu approfondir l'origine de ces EAOs en réalisant un post-traitement au Diphenyleneiodonium (DPI), un inhibiteur des NADPH Oxydases [196]. Le DPI n'inhibe pas l'effet hyperglycémiant de l'apeline suggérant une origine mitochondriale. En effet plus de 80% des EAOs produites par l'organisme sont d'origine mitochondriale (mEOs) [180] et leur présence au niveau hypothalamique est largement impliquée dans le métabolisme glucidique [194, 199]. De plus, il a été montré au niveau musculaire que l'apeline pouvait cibler les mitochondries en augmentant leur activité oxydative et donc la chaîne respiratoire mitochondriale génératrice d'EOs [368].

Concernant l'EOs impliquée dans ces effets hyperglycémisants de l'apeline, nous nous sommes intéressés à l' H_2O_2 . L' H_2O_2 est la plus stable des EAOs, lui conférant ainsi un pouvoir signalisant plus important, mais c'est également celle qui médie le plus grand nombre de voies de signalisation cérébrales [387]. Nous avons ainsi mesuré en *ex vivo* la libération d' H_2O_2 , tout d'abord par un dosage à l'Amplex Red, une méthode indirecte, puis par mesure en temps réel par ampérométrie. Cette dernière technique a révélé une libération quasi-

immédiate (dès 2 minutes d'incubation) et en continu durant les 20 minutes de mesure. Bien que nous ayons observé spécifiquement, via la sonde ampérométrique, une libération d' H_2O_2 , nous ne pouvons pas exclure l'implication d'autres EAOs tels que $\text{O}_2^{\cdot-}$. En effet, $\text{O}_2^{\cdot-}$ est un médiateur cellulaire hypothalamique [388] au même titre que H_2O_2 . Il est libéré par les mêmes acteurs moléculaires (mitochondrie et NOX) et impliqué, via sa libération hypothalamique, dans des modulations périphériques sur la sphère cardiaque et vasculaire [389] via le SNS. Enfin, cette EAO pourrait être impliquée dans cette voie de signalisation apeline hypothalamique- H_2O_2 en étant sécrétée par les neurones puis transformée en H_2O_2 par l'enzyme antioxydant SOD. Afin de mettre en évidence une implication de $\text{O}_2^{\cdot-}$ dans la voie de signalisation de l'apeline, nous pourrions injecter dans l'hypothalamus une molécule anti-oxydante spécifique de H_2O_2 comme la catalase en pré-traitement avant l'injection icv d'apeline. Si les animaux présentent toujours une hyperglycémie à jeun, $\text{O}_2^{\cdot-}$ serait donc impliqué, en plus de H_2O_2 , comme acteur moléculaire hypothalamique contribuant aux effets de l'apeline.

b. Lien EAOs-SNS

Nous avons montré que les forts taux hypothalamiques d'apeline génèrent une libération d' H_2O_2 engendrant en périphérie une hyperglycémie à jeun. Dans la littérature, cette production d' H_2O_2 hypothalamique est associée, à des augmentations de l'activité du SNA et plus précisément du SNS [390]. L'apeline va également activer le SNS lors de son injection dans le PVN [382]. Nos résultats sont en accord avec ces données de la littérature car nous montrons une augmentation des taux plasmatiques de noradrénaline, neurotransmetteur du SNS. Cette spécificité du SNS est appuyée par le fait que les taux plasmatiques d'adrénaline ne varient pas, cette molécule révélant une implication de la médullo-surénale. De surcroît, une injection ip de prazosine, un antagoniste des récepteurs α_1 -adrénergiques, en amont de l'injection icv d'apeline, inhibe l'hyperglycémie à jeun. Il est prouvé dans la littérature que la noradrénaline, médiateur principal du SNS, exerce ses effets sur le foie via le récepteur α_1 -adrénergiques [391], ainsi un blocage au niveau du foie de ces récepteurs empêche l'action hyperglycémiant de l'apeline centrale et permet de révéler une implication du SNS. Cette augmentation du SNS est également mise en lumière par une augmentation des taux plasmatiques de glucagon en réponse à l'apeline injectée en icv. Une

action directe du glucagon sur l'effet hyperglycémiant de l'apeline n'est donc pas à exclure mais elle n'est pas majoritaire, comme le révèlent les résultats obtenus sur notre modèle de souris surexprimant l'apeline de façon chronique dans le VMN. En effet, ces animaux présentent également une augmentation des taux plasmatiques de noradrénaline après 6 heures de jeûne suggérant une augmentation du tonus basal du SNS et donc un dysfonctionnement du SNA caractéristique d'un diabète de type 2 [17]. Les taux sanguins de glucagon sont par contre similaires aux contrôles. Ces résultats renforcent le rôle direct du SNS sur la production hépatique de glucose et suggèrent un épuisement des cellules α productrices de glucagon dans ce modèle de surexpression chronique d'apeline dans le VMN. Concernant le modèle d'animaux recevant en aigu l'injection icv d'apeline, ces effets de l'apeline centrale, aussi bien sur les taux plasmatiques de noradrénaline mais également sur la glucagonémie, sont abolis lors d'un pré-traitement au trolox, renforçant le rôle de l' H_2O_2 comme médiateur des effets de l'apeline. Nous n'avons pas évalué l'activité du SNP dans notre modèle dont l'activité pourrait également être augmentée en réponse à l'apeline injectée en icv, injection qui peut médier ses effets via plusieurs noyaux hypothalamiques. Par exemple, la production d'insuline par le pancréas est sous la dépendance du SNP [254] et ce système pourrait être activé, de façon synchrone avec le SNS et ainsi expliquer l'hyperinsulinémie à jeun retrouvée dans notre modèle d'injection icv aigu [381].

c. Contrôle du foie

Dans l'analyse du modèle d'injection aigu, nous avons voulu déterminer l'organe cible dans les effets centraux de l'apeline. Via le recrutement du SNS, il est évident que plusieurs organes sont touchés. En effet, comme le révèle l'augmentation des taux sanguins de glucagon, le pancréas est stimulé par le SNS en réponse à l'apeline centrale. Mais nous sommes également intéressés au foie, organe capable de libérer d'importantes quantités de glucose dans les situations de jeûne. Dans un premier temps, le foie va lyser ses stocks de glycogène par glycolyse puis il va produire du glucose à partir de substrats non glucidiques via la néoglucogenèse. L'étude de la cinétique d'hyperglycémie de nos animaux en réponse à l'injection icv d'apeline révèle une hyperglycémie maintenue pendant près de 4 heures, suggérant une implication de ces deux voies métaboliques productrices de glucose sanguin. En effet, en réponse à une injection icv d'apeline, nous montrons une diminution de

ces stocks de glycogènes intra-hépatiques par dosage biochimique mais également sur des coupes histochimiques colorées à l'Acide Périodique-Schiff. La voie néoglucogénique est également augmentée, ce que nous avons mis en évidence par un test de tolérance au pyruvate suggérant une augmentation globale de cette activité néoglucogénique en réponse à l'injection icv d'apeline. La production hépatique de glucose globale est augmentée, ce qui est démontré via le dosage de la glucose-6-phosphatase hépatique, enzyme terminale de la sortie de glucose du foie via glycogenolyse et néoglucogénèse, dont l'activité est augmentée. Ces effets sur ces deux voies de production de glucose sont abolis lors d'un pré-traitement au trolox. Nous avons clairement démontré un rôle de l'apeline hypothalamique, en tant que neurotransmetteur, dans le contrôle de la production hépatique de glucose. Cette action est comparable à celle d'autres neurotransmetteurs hypothalamiques, tels que les orexines [69] ou le pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP) [392] qui vont activer la production hépatique de glucose via le SNS, avec pour l'orexine-A une action globale sur les deux voies hépatiques productrices de glucose, tandis que le neurotransmetteur PACAP n'agirait que sur la voie glycolytique. L'apeline est un neurotransmetteur particulier puisqu'elle est également libérée par le tissu adipeux ce qui lui confère le titre d'adipokine [348]. Parmi la grande famille des adipokines, certaines vont également avoir une action hypothalamique contrôlant la production hépatique de glucose. Par exemple, celle-ci va être inhibée par l'injection en icv de leptine ou d'adiponectine [346, 393]. Nous mettons ainsi en évidence un nouveau peptide ayant le rôle de neurotransmetteur et d'adipokine et pouvant contrôler le foie via le SNS et générant ainsi une production hépatique de glucose.

Ces résultats obtenus sur ce modèle d'injection aigue d'apeline en icv nous ont permis de caractériser la voie « H₂O₂-SNS-foie » mise en place en réponse à des forts taux hypothalamique d'apeline (**Figure 21**). Nous avons ainsi engendré un diabète transitoire chez nos animaux, caractérisé par une hyperglycémie à jeun mais également une hyperinsulinémie à jeun, une intolérance au glucose et une insensibilité à l'insuline précédemment démontrées par le laboratoire [381].

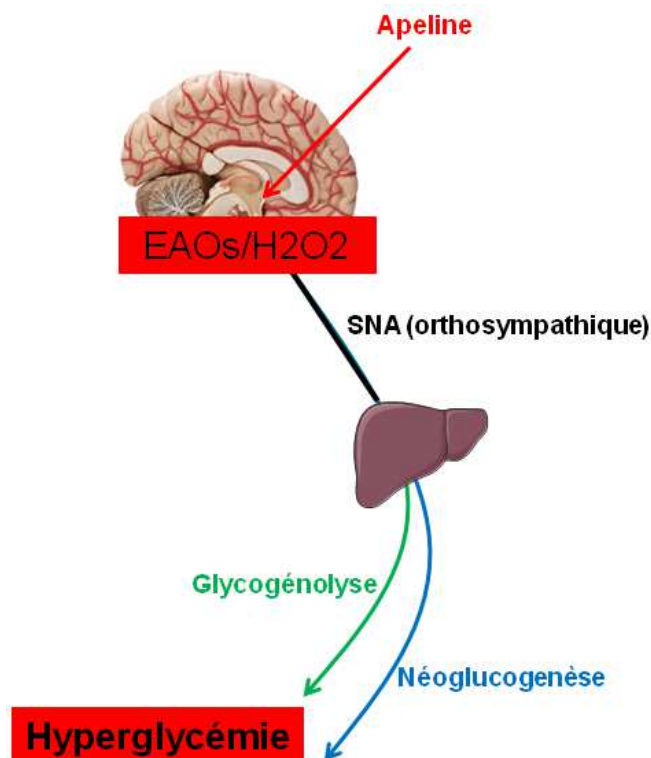


Figure 21 : Schéma intégré de la voie de signalisation «H₂O₂-SNA-Foie » générée par les forts taux d'apeline icv

L'injection de forts taux d'apeline en icv génère une libération d'H₂O₂ hypothalamique, augmentant l'activité du SNS qui va cibler le foie et générer une production hépatique de glucose par glycolyse et néoglucogenèse contribuant à l'effet hyperglycémiant à jeun.

d. Région hypothalamique impliquée

Au sein du laboratoire, il a été mis en évidence un marquage c-Fos dans le VMN d'animaux ayant reçu une injection icv de forts taux d'apeline. Le VMN est un noyau hypothalamique recevant des projections des neurones POMC ce qui est en accord avec la littérature indiquant que les neurones apelinergiques sont des POMC [351]. Nous avons donc surexprimé l'apeline par lentivirus dans le VMN d'animaux sains afin d'évaluer si cette seule région hypothalamique pouvait engendrer des caractéristiques précédemment mise en évidence dans le modèle aigu d'injection icv d'apeline. Ce modèle chronique présente une augmentation de l'expression de l'apeline dans l'hypothalamus mais également une augmentation de l'expression de marqueurs proinflammatoires tels que TNF α et IL1 β . Ces marqueurs proinflammatoires dans l'hypothalamus sont présents dans le cadre d'un diabète de type 2 [385] et leur inhibition par des anticorps permet le rétablissement de la fonction hépatique [394]. Cette inflammation est spécifiquement localisée dans l'hypothalamus car l'expression de ces marqueurs n'est pas modifiée dans le foie et les tissus adipeux. Cette inflammation hypothalamique serait donc responsable des deux caractéristiques d'un diabète de type 2 que présentent ces souris, à savoir une intolérance à l'insuline et une hyperglycémie à jeun, validant ainsi notre modèle.

Ces animaux présentent également une augmentation de la libération de noradrénaline ainsi qu'une production hépatique de glucose exacerbée, en lien avec cette augmentation de l'activité sympathique et expliquant l'hyperglycémie à jeun. La glycogénolyse est augmentée comme le montre les taux intra-hépatiques de glycogène qui sont diminués, et la néoglucogenèse est également augmentée comme le révèle le test de tolérance au pyruvate. En parallèle, l'activité de la glucose-6-phosphatase est augmentée corroborant nos résultats sur la production hépatique de glucose dans ce modèle.

Ce modèle de souris surexprimant l'apeline dans le VMN nous a permis de mettre en évidence l'implication de ce noyau hypothalamique dans les effets délétères engendrés par de forts taux d'apeline. Par contre, l'implication d'autres régions hypothalamiques n'est pas à exclure. En effet, en fonction de la dose utilisée, il a été montré que l'apeline pouvait agir sur le DMN et l'ARC [381]. Les neurones du VMN pourraient également se projeter dans des régions mésencéphaliques et du bulbe rachidien, régions qui contrôlent l'activité du SNA et exprimant également l'ARNm de l'apeline et de son récepteur APJ [350].

e. Amplification de la voie H_2O_2 hypothalamiques-SNS-foie chez un modèle de souris obèses/diabétiques

Après avoir mis au point deux modèles mettant en évidence une implication de forts taux d'apeline hypothalamique dans la mise en place de caractéristiques d'un diabète de type 2 via une voie « H_2O_2 -SNS-foie », nous avons voulu vérifier si cette voie était toujours effective dans un modèle d'animaux obèses/diabétiques. Nous avons donc utilisé un modèle d'animaux rendus obèses/diabétiques par un régime hyperlipidique pendant 3 mois. Ces animaux présentent une hyperinsulinémie et une hyperglycémie à jeun, une intolérance au glucose et une insensibilité à l'insuline. Une injection icv d'apeline chez ces animaux amplifie l'effet hyperglycémiant à jeun mais durant une cinétique plus courte que le modèle d'injection icv d'apeline sur animaux sains. En effet, chez les animaux sains, l'injection d'apeline génère une hyperglycémie commençant 15 minutes après l'injection et se prolongeant jusqu'à 210 minutes. Chez des animaux obèses/diabétiques, cette cinétique se stoppe à 60 minutes suggérant un effet de l'injection d'apeline sur la glycogénolyse mais pas sur la néoglucogenèse. Un pré-traitement au trolox chez ces animaux inhibe l'effet hyperglycémiant à jeun, impliquant toujours l' H_2O_2 hypothalamique dans ces effets

délétères. En effet, la mesure par ampérométrie de la libération d' H_2O_2 *ex vivo* sur des Hypothalami en survie, révèle une libération d' H_2O_2 qui est amplifiée par ajout d'apeline. L'apeline dans les hypothalami d'animaux obèses/diabétiques amplifie la libération d' H_2O_2 , qui disparaît en présence de trolox dans le milieu d'incubation.

Ainsi, chez des animaux obèses/diabétiques, des forts taux d'apeline hypothalamique amplifient la libération d' H_2O_2 hypothalamique ce qui génère une hyperglycémie à jeun exacerbée par rapport à des animaux contrôles. Cette production hépatique de glucose est due à une augmentation de la glycogénolyse comme le démontre la diminution des stocks de glycogène intra-hépatique et l'augmentation de l'activité de la glucose-6-phosphatase. Par contre on n'observe aucune augmentation de la néoglucogenèse via le test de tolérance au pyruvate, ni d'augmentation de la noradrénaline sanguine ou du glucagon. Il faut noter que la néoglucogenèse et l'activité du SNS sont déjà augmentés dans le cadre d'un diabète de type 2 [17, 395], contrairement à la glycogénolyse qui est largement diminuée [396]. Le modèle que nous mettons en évidence via ces injections icv d'apeline dans l'hypothalamus de ces animaux obèses/diabétiques amplifie donc leur diabète en activant la voie métabolique glycogénolytique ce qui exacerbe l'hyperglycémie à jeun. Par contre, dans ce modèle physiopathologique, et donc ayant déjà subi des altérations du métabolisme, ces deux paramètres que sont l'activité du SNS et de la néoglucogenèse ne pourraient donc pas être plus amplifiés que ce qu'ils sont déjà. Les expériences de pré-traitement au trolox vont dans ce sens puisqu'elles inhibent la lyse des stocks de glycogènes intra-hépatiques mais n'ont aucun effet sur l'activité néoglucogénique (test de tolérance au pyruvate) et l'activité du SNS (dosages plasmatiques).

Considérant que ces forts taux d'apeline hypothalamiques sont responsables de la mise en place de cette voie « H_2O_2 -SNS-foie », nous avons décidé d'administrer du F13A (le bloqueur du récepteur à l'apeline APJ) en icv pendant deux semaines à des animaux obèses/diabétiques. Ces animaux présentent toujours une hyperglycémie à jeun, mais moins importante que des animaux obèses/diabétiques contrôles, ainsi qu'une meilleure tolérance à l'insuline. La littérature met en évidence que durant un diabète de type 2, la part de la glycogénolyse est diminuée dans la production hépatique de glucose et que la néoglucogenèse augmente [396]. Ainsi, chez des animaux obèses/diabétiques, les taux hépatiques de glycogène sont importants durant le jeûne tandis que chez ces animaux traités au F13A, ces taux à jeun correspondent à des taux d'animaux sains suggérant une

amélioration du métabolisme glucidique. Ces résultats sont corrélés à une augmentation de l'activité de la glycogène-phosphorylase, enzyme impliquée dans la phase commensale de la lyse du glycogène intra-hépatique. En parallèle, les taux sanguins de glucagon sont également diminués par rapport à l'hyperglucagonémie des animaux obèses/diabétiques. Par contre, la néoglucogenèse ne semble pas améliorée ni les taux sanguins de noradrénaline, suggérant la nécessité d'un traitement plus long.

L'ensemble de ces expériences tendent à démontrer un rôle clef de l'apeline hypothalamique dans la mise en place d'effets délétères du diabète de type 2 en générant une inflammation hypothalamique et la mise en place d'une voie H_2O_2 ergique. Cette voie de signalisation hypothalamique génère une hyperactivation du SNA contribuant à la mise en place d'une hyperglycémie à jeun due à une amplification de la production hépatique de glucose. L'apeline hypothalamique va ainsi être impliquée de façon globale dans cette transition statut « sain » - statut « diabétique ». Ce travail nous a ainsi amené à nous interroger sur d'autres mécanismes et effets de cette apeline centrale que nous aborderons dans le prochain chapitre.

4. Perspectives et conclusion

Nous avons pu mettre en évidence durant ce travail de thèse que des forts taux d'apeline dans l'hypothalamus sont impliqués dans la transition d'un état sain à un état diabétique. Ces forts taux centraux d'apeline vont générer une libération d' H_2O_2 hypothalamique ciblant le foie via le SNS et générant une production hépatique de glucose par glycogénolyse et néoglucogenèse. Nous avons voulu élargir notre étude concernant les conséquences engendrées sur d'autres organes périphériques en réponse à ces forts taux d'apeline. Pour cela nous avons utilisé un autre modèle d'animaux recevant de façon chronique des forts taux d'apeline par un système de mini-pompes osmotiques (**Figure 22 A.**). Ce modèle a déjà été validé au sein du laboratoire et présente une intolérance à l'insuline, ainsi qu'une hyperglycémie et une hyperinsulinémie à jeun [381]. Nous avons pu mettre en évidence chez ces animaux une inflammation hypothalamique (**Figure 22 C.**) démontrées dans nos précédents travaux dans le modèle de souris surexprimant l'apeline dans le VMN via une

injection intra-structurale de lentivirus. Nous avons également pu attribuer l'hyperglycémie à jeun de ce modèle de souris équipées par une mini-pompe osmotique à une augmentation de la production hépatique de glucose par augmentation de l'activité de la glucose-6-phosphatase (**Figure 22 B.**). Ainsi, ce modèle de souris moins compliqué à générer que des animaux injectés par un lentivirus en intra-structurale présente des caractéristiques similaires et correspond à un bon modèle de souris diabétiques.

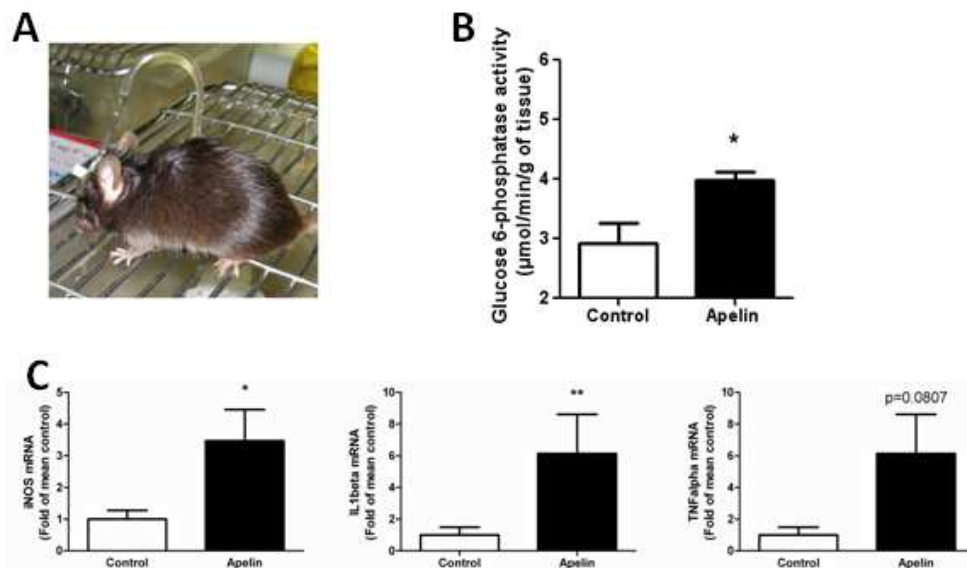


Figure 22 : Validation du modèle d'administration chronique d'apeline centrale : le modèle mini-pompe osmotiques

A. Photo d'une souris opérée avec un cathéter icv implanté dans le ventricule latéral droit et relié à une mini-pompe osmotique placée en sous-cutanée. **B.** Augmentation de l'activité de la glucose-6-phosphatase en réponse au traitement chronique à l'apeline. **C.** Augmentation des marqueurs proinflammatoires iNOS, IL1 β et TNF α en réponse au traitement chronique à l'apeline

a) Action moléculaire hypothalamique

Nous avons pu montrer durant ce travail de thèse que l'apeline injectée en icv de façon aiguë génère une production d'H₂O₂ hypothalamique. Ce ne sont pas les NADPH oxydases hypothalamiques qui sont responsables de cette production d'H₂O₂ car une inhibition de celle-ci par le DPI n'inhibe pas l'effet hyperglycémiant à jeun. Nous nous sommes donc focalisés sur les mitochondries, producteur majoritaire des EAOs hypothalamiques [180]. Des résultats préliminaires d'injection *ex vivo* sur des Hypothalami maintenus en survie, révèlent effectivement une modification de l'activité du complexe I, producteur d'EAOs au sein de la chaîne respiratoire. La production d'H₂O₂ est très rapide (dès 2 minutes après l'injection d'apeline) et due à une injection aiguë d'apeline ce qui exclut l'action connue de l'apeline sur l'augmentation de la biogénèse mitochondriale mais dont la cinétique de temps

ne coïncide pas avec nos effets très rapides [368]. Par contre, notre cinétique d'apparition des effets de l'apeline sur les mitochondries correspondrait à un effet sur la dynamique mitochondriale. En effet, les mitochondries vont adopter une morphologie particulièrement en se fragmentant dans des conditions d'hyperglycémie et générer ainsi une production d'EAOs [225]. Ainsi il faudrait analyser la forme des mitochondries hypothalamiques en réponse à cette injection d'apeline mais également étudier les différentes protéines de la dynamique mitochondriale comme DRP1 impliqué dans la fission ainsi que OPA1 et les mitofusines impliquées dans la fusion [228]. Nous pourrions étudier la production d'H₂O₂ hypothalamique en réponse à l'apeline chez des animaux ayant reçu un siRNA dirigé contre la protéine DRP1 ou chez des animaux knock-out pour les mitofusines hypothalamiques. Il a récemment été mis en évidence qu'un défaut de contact entre le RE et les mitochondries dans les neurones à POMC médiaient l'apparition d'un stress du RE hypothalamique impliqué dans la résistance cérébrale à la leptine et dans des défauts métaboliques [229]. L'apeline étant libérée par des neurones POMC [351], l'étude de cette interaction RE-mitochondrie contribuerait à mettre en évidence une action originale de l'apeline sur les organelles neuronales.

b) Action hypothalamique de l'apeline sur des tissus périphériques

Le modèle d'animaux présentant une augmentation de l'apeline hypothalamique par pose d'une mini-pompe osmotique ne présente pas de variation de poids corporel ni de modification de la prise alimentaire. Par contre, il présente des défauts de l'homéostasie glucidique tels que l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie à jeun [381]. Nous nous sommes donc intéressés à la dépense énergétique de ces animaux, étant donné que son altération contribue à l'apparition d'un diabète de type 2. De plus, la littérature montre une action de l'apeline centrale sur le BAT [382], un organe clef de la dépense énergétique impliqué dans le contrôle de la thermogénèse. Nous avons pu mettre en évidence que la dépense énergétique était diminuée chez nos animaux traités durant les phases nocturnes, périodes d'activité et d'alimentation de nos animaux (**Figure 23**). Ces résultats vont de pair avec les taux circulants d'apeline qui augmentent également durant cette période et suggèrent une possible action au niveau de l'éminence médiane de cette apeline circulante sur les taux hypothalamiques [381].

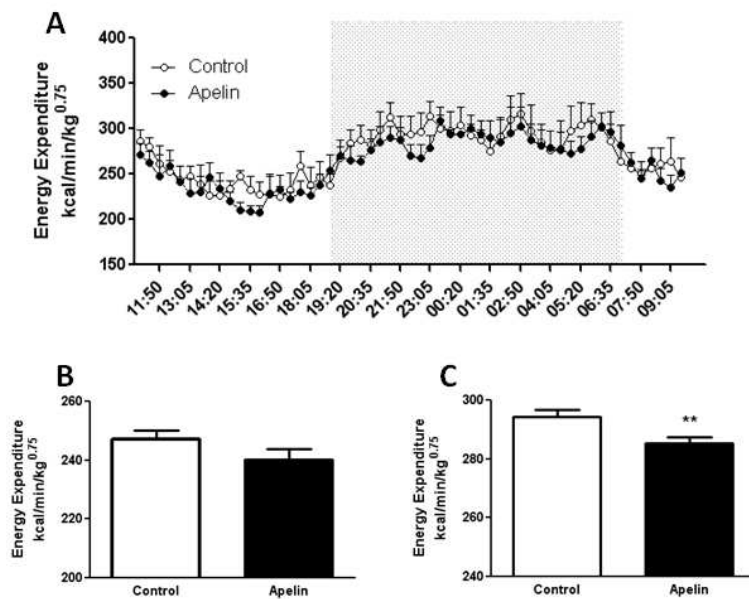


Figure 23 : Dépense énergétique chez le modèle de souris recevant de forts taux d'apeline centrale via la pose de mini-pompes osmotiques

A.Dépense énergétique des animaux placés dans des cages calorimétriques pendant 24 heures. **B.**Dépense énergétique inchangée des animaux en phase diurne. **C.**Diminution de la dépense énergétique en phase nocturne (d'activité et d'alimentation des animaux) en réponse au traitement chronique à l'apeline

En lien avec cette diminution de la dépense énergétique, et étant donné que l'activité locomotrice de nos animaux n'est pas modifiée, nous nous sommes intéressés à la thermogénèse de nos animaux qui tendrait à être diminuée dans le cas d'une diminution de la dépense énergétique. Bien qu'il n'y ait aucune différence entre la température corporelle sur 24 heures de nos animaux subissant un traitement chronique à l'apeline par mini-pompe par rapport à des animaux contrôles, nous ne pouvons pas exclure une action de l'apeline centrale sur le BAT. Nous avons donc étudié précisément les tissus adipeux de nos animaux afin de mettre en lumière des acteurs moléculaires impliqués dans la dépense énergétique au sein de ces tissus. La particularité du BAT est de générer de la chaleur grâce à son grand nombre de mitochondries. Cette production de chaleur est réalisée notamment par PGC1 α , un facteur de thermogénèse permettant l'oxydation des acides gras dans la mitochondrie [397]. Dans notre modèle, nous observons une diminution des ARNm codant pour PGC1 α , mais également pour PRDM16, un facteur de transcription clef impliqué dans la brunisation des tissus adipeux [311]. En parallèle, le facteur de brunisation PRDM16 est également diminué dans le WAT (nous avons pris comme WAT le tissu adipeux sous-cutané) (**Figure 24**). Il a récemment été mis en évidence que sa délétion génèrait de sévères résistances à l'insuline contribuant ainsi à l'apparition d'un diabète de type 2 [398]. Ainsi, l'activité du BAT et la brunisation du WAT sont diminuées dans notre modèle contribuant à la diminution de la dépense énergétique. Ces résultats révèlent une action délétère de ces forts taux

d'apeline sur un autre organe que le foie contribuant globalement à une détérioration du métabolisme. L'étude de ce modèle chronique devraient être prolongée en l'exposant plus de 14 jours à l'apeline afin d'évaluer la température corporelle ainsi que la résistance au froid. Nos résultats sont en désaccord avec Masaki *et al.* qui montrent une augmentation de la température du BAT en réponse à une injection d'apeline dans le PVN [382]. Mais nous ne réalisons pas les expériences sur le même modèle animal (l'injection dans le PVN était réalisée chez des rats), à la même dose et dans la même région soulignant d'autant plus cette duplicité d'effet de l'apeline [381].

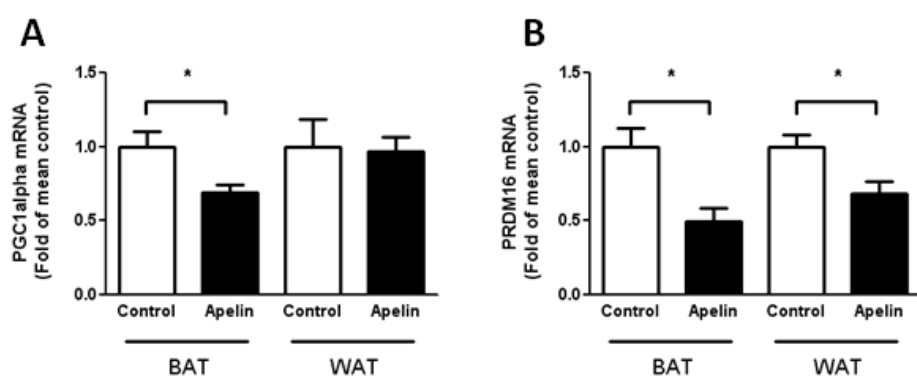


Figure 24 : Activité des tissus adipeux chez le modèle de souris recevant de forts taux d'apeline centrale via la pose de mini-pompes osmotiques.

A. Diminution des transcrits ARNm codant pour PGC1- α dans le BAT en réponse au traitement chronique à l'apeline.
B. Diminution des transcrits ARNm codant pour PRDM16 dans le BAT et le WAT (en prenant le tissu adipeux sous-cutané comme du WAT) en réponse au traitement chronique à l'apeline.

La littérature révèle également une action de l'apeline centrale sur la sphère cardiaque. En effet, une injection d'apeline icv va augmenter la pression artérielle et le rythme cardiaque [399]. Le cœur est largement contrôlé par le SNA via les composantes parasympathiques et sympathiques tandis que des données de la littérature indiquent qu'une hyperactivation du SNS pourrait contribuer aux pathologies cardiovasculaires retrouvées chez des rats Goto-Kakizati (présentant un diabète de type 2 non associé à une obésité) [400]. En effet, chez ces animaux, le TRH central est impliqué dans les dysfonctions cardiaques observées puisqu'une injection intrathécale d'un analogue du TRH induit une inflammation cardiaque. Les neurones à TRH, présents dans l'hypothalamus, vont se projeter sur les régions contrôlant le SNA suggérant une activation de celui-ci. Cet axe cerveau-cœur a déjà été mis en évidence via des injections icv chroniques de ghréline qui génèrent une augmentation des marqueurs pro-inflammatoires TNF α , iNOS et IL1 β dans le cœur chez la souris saine [401]. Nous nous

sommes donc intéressés à ces marqueurs proinflammatoires au sein du cœur. En effet, l'apeline injectée en ip améliore l'hypertrophie cardiaque et les marqueurs de stress oxydatifs en réponse à une ischémie [360]. Lors d'un contrôle du cœur par une forte dose d'apeline centrale, nous montrons un effet opposé puisque le marqueur pro-inflammatoire TNF α est augmenté chez les souris traitées (**Figure 25**). Ainsi, ces forts taux d'apeline engendreraient des caractéristiques de la pathologie diabétique, mais également des effets délétères sur des organes périphériques comme les tissus adipeux et le cœur participant à l'établissement du diabète de type 2 et aux pathologies associées comme les dysfonctions cardiovasculaires. L'inflammation dans le cœur est majoritairement proportionnelle à l'altération de la fonction cardiaque [402]. Afin d'explorer les altérations de la sphère cardiaque, nous analyserons par échographie si la contractilité du cœur est altérée, en lien avec l'inflammation mise en évidence dans nos résultats.

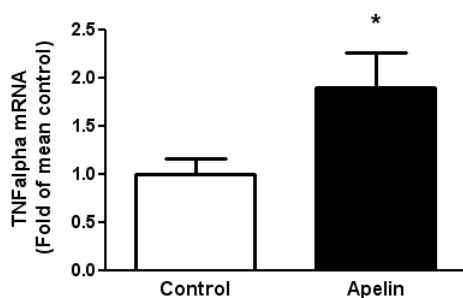


Figure 25 : Etude l'inflammation cardiaque chez le modèle de souris recevant de forts taux d'apeline centrale via la pose de mini-pompes osmotiques.

Le marqueur proinflammatoire TNF α est augmenté en réponse au traitement chronique icv à l'apeline.

Parmi les organes impliqués dans le métabolisme glucidique, les muscles, tissus importants dans la captation du glucose, devraient également être étudiés notamment à travers la signalisation insulinémique. En effet, il a été montré au sein de l'équipe une diminution de la captation du glucose durant un clamp en réponse à l'injection icv aigue d'apeline. La résistance à l'insuline transitoire générée par cette injection icv aigue pourrait être retrouvée sur ce modèle chronique et serait une piste intéressante dans la convergence d'effet amenant au diabète de type 2 [381].

c) Origine de l'apeline délétère, périphérie versus hypothalamique

Le dernier point qu'il serait judicieux de développer dans la continuité de ces travaux de thèse serait de faire la part entre l'apeline adipocytaire et l'apeline hypothalamique dans ces effets délétères de l'apeline centrale. En effet dans le cadre d'un diabète de type 2, les taux périphériques d'apeline mais également les taux hypothalamiques sont augmentés.

L'hypothalamus étant une structure neurohémale, les molécules de la circulation sanguine peuvent atteindre cette structure cérébrale. L'apeline périphérique augmenterait en réponse aux prémices d'une détérioration du métabolisme glucidique afin d'agir directement sur la périphérie et d'améliorer la captation du glucose [365], mais ces forts taux atteignant le cerveau pourrait agir au niveau des neurones apelinergiques et générer une libération d'apeline hypothalamique importante responsable de la mise en place d'un diabète de type 2. Des données préliminaires du laboratoire montre une présence d'apeline dans l'hypothalamus 10 minutes après une injection d'apeline en veine fémorale chez des animaux knock-out pour l'apeline. Ainsi, l'apeline périphérique pourrait atteindre l'hypothalamus via la circulation sanguine. En parallèle, il a été mis en évidence au sein du laboratoire, une cyclicité des taux périphériques d'apeline avec des taux augmentés durant la période nocturne qui correspond à la période d'alimentation des animaux [381]. Cette cyclicité pourrait agir au niveau hypothalamique contribuant par exemple à la modulation de la prise alimentaire.

Pour faire la part de l'apeline libérée par les neurones et de l'apeline périphérique atteignant l'hypothalamus, dans la genèse d'un diabète de type 2, nous avons généré au sein du laboratoire un modèle d'animaux knock out pour l'apeline hypothalamique. Ces souris sont des modèles cre-lox générés par un croisement entre des animaux apeline-lox et des animaux possédant la cre recombinase sous le contrôle du promoteur nkx2.1, exprimé dans l'hypothalamus [403]. Cette construction a déjà été utilisée dans la littérature permettant la génération d'animaux délétés pour le récepteur à la leptine uniquement dans l'hypothalamus [321]. Des résultats préliminaires dans l'étude de ces animaux knock-out pour l'apeline hypothalamique a permis de mettre en évidence une augmentation du poids corporel dès 9 semaines de vie corrélé à une augmentation de la prise alimentaire (**Figure 26 A et B**). Ces résultats suggèrent une action satiétogène de l'apeline en accord avec sa localisation dans les neurones à POMC. En parallèle, ces animaux présentent également une intolérance au glucose (**Figure 26 C**).

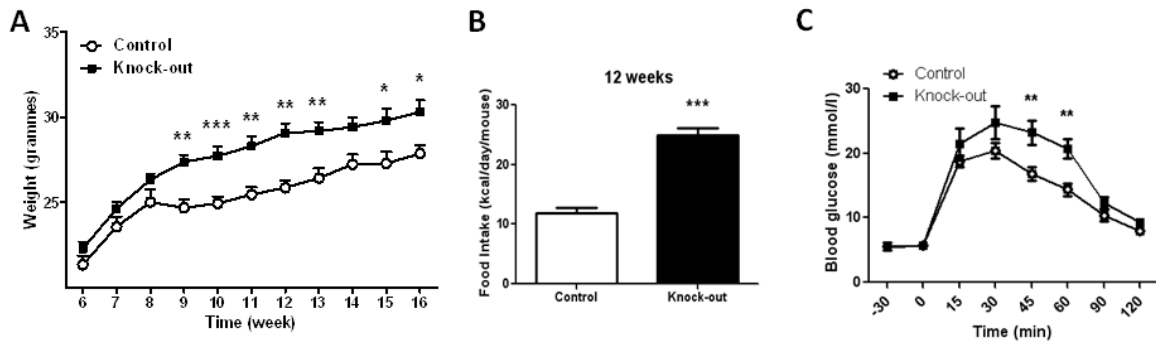


Figure 26 : Résultats préliminaires des animaux knock-out pour l'apeline dans l'hypothalamus

A. Augmentation du poids corporel chez des animaux délétés pour l'apeline par rapport aux contrôles. B. Augmentation de la prise alimentaire à 12 semaines chez des animaux délétés pour l'apeline par rapport aux contrôles. C. Intolérance au glucose à 12 semaines chez des animaux délétés pour l'apeline par rapport aux contrôles.

A la vue de ces résultats préliminaires, l'apeline hypothalamique est indispensable au maintien de l'homéostasie glucidique. En effet, les faibles taux permettent d'améliorer la captation du glucose [381] et probablement d'engendrer un effet statiétogène via une action sur les POMC. Au niveau de ces neurones, il nous faut étudier la de libération d'EOs indispensable au bon fonctionnement de leur sensibilité au glucose car la littérature indique qu'un défaut de cette libération d'EOs dans ces neurones POMC glucosensibles génère un diabète de type 2 [259]. En parallèle, l'étude des protéines de la dynamique mitochondriale au sein de ces mêmes neurones permettrait de mettre en lumière des acteurs impliqués dans la libération d'EOs tels que DRP1 ou les mitofusines.

Nous n'avons pas observé de modification de la prise alimentaire après le jeûne dans notre modèle d'injection aiguë d'apeline en icv chez des animaux sains. Par contre, des résultats préliminaires montrent que nos animaux surexprimant l'apeline dans le VMN présentent une diminution de la prise alimentaire. Ces animaux présentent également des caractéristiques d'un diabète de type 2, suggérant que les effets de l'apeline sur la prise alimentaire et sur le métabolisme glucidique sont distincts. Nous devrions donc étudier chez nos animaux knock-out pour l'apeline hypothalamique, la signalisation à la leptine ainsi que d'autres acteurs hypothalamiques du métabolisme glucidique tels que mTOR et l'AMPK.

En parallèle, l'étude de la fonction d'organes périphériques tels que la brunisation des tissus adipeux, la production hépatique de glucose, l'inflammation cardiaque et l'activité du SNA devraient être réalisées. Ces animaux vont également être mis sous régime HFD afin d'évaluer si le régime amplifie ce phénotype diabétique et hyperphage. Enfin, l'ensemble de ces expériences seront réalisées chez des animaux knock-out pour l'apeline adipocytaire afin

de clairement discriminer la contribution de l'apeline périphérique à ces effets centraux délétères.

Suite à la mise en évidence de l'action bénéfique de l'apeline sur le métabolisme glucidique lors d'une injection en iv, une étude clinique humaine a été mise au point. L'apeline semble une molécule prometteuse dans le traitement du diabète de type 2 en agissant via la voie de l'AMPK, voie différente de celle de l'insuline, court-circuitant ainsi la résistance à l'insuline établit dans cette pathologie. Mes travaux de thèse et les travaux évoqués en perspectives permettent 1) d'indiquer une contribution certaine de l'apeline hypothalamique à l'établissement d'un diabète de type 2 ; permettant ainsi 2) d'encadrer les doses administrées en thérapeutique qui pourraient engendrer les effets inverses de ceux voulu en agissant directement sur l'hypothalamus.

Ces travaux renforcent le rôle clef du cerveau et plus précisément de l'hypothalamus dans la mise au point de thérapeutiques ayant pour but de contrer la mise en place d'un diabète de type 2. En effet, de nombreuses molécules vont avoir des effets complètement opposés entre la périphérie et le cerveau, l'étude de leurs conséquences hypothalamiques est donc primordiale dans la mise au point de traitements thérapeutiques.

Annexes

Durant mes trois années de these, j'ai eu l'opportunité de participer à des travaux portant sur l'apeline, le métabolisme glucidique et/ou le cerveau, ainsi que de prendre part à l'écriture de deux revues portant sur ma thématique de thèse. Les publications issues de ces collaborations sont donc présentées dans cette partie.

Le premier article a été publié en 2011 dans la revue *Antioxydant Redox Signaling* par Thibaut Duparc. Les travaux réalisés impliquent l'apeline hypothalamique dans le contrôle de l'homéostasie glucidique.

Le deuxième article a été publié en 2013 dans la revue *Peptides* par Laura Butruille. Les travaux réalisés mettent en évidence les variations d'apeline et d'APJ au sein de différents tissus chez des souris femelles en réponse à un régime rendant les animaux obèses/diabétiques par une alimentation riche en gras.

Le troisième article a été publié en 2014 dans la revue *Plos One* par Dina. N Arvanitis. Les travaux réalisés avancent le rôle clef de la protéine d'adhérence éphrine B1 dans la maturation corticale et le développement de la mémoire non-spatiale.

Les deux derniers articles sont des revues publiées en 2013 dans *Hormone and Metabolic Research* pour la première et *Obésité* pour la seconde. La première revue est publiée par Claude Knauf et aborde le rôle de l'apeline dans l'homéostasie glucidique tandis que la seconde récapitule comment les dialogues inter-organes (entre le tissu adipeux l'intestin et l'hypothalamus) vont influencer la mise en place d'une obésité et d'un diabète de type 2.

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

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

Abstract

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

Introduction

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

Innovation

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

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

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

³Louvain Drug Research Institute, LDRI, Metabolism and Nutrition Research Group, and ⁶Laboratory of Hepato-gastroenterology, Institut de Recherche Expérimentale et Clinique, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium.

⁴Centre de Recherches sur la Cognition Animale, Université de Toulouse, Toulouse, France.

⁵Unité Mécanismes D'action des Substances Opioides, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Centre National de la Recherche Scientifique Toulouse Cedex 04, France.

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

⁸Max Planck Institute for Immunobiology, Freiburg, Germany.

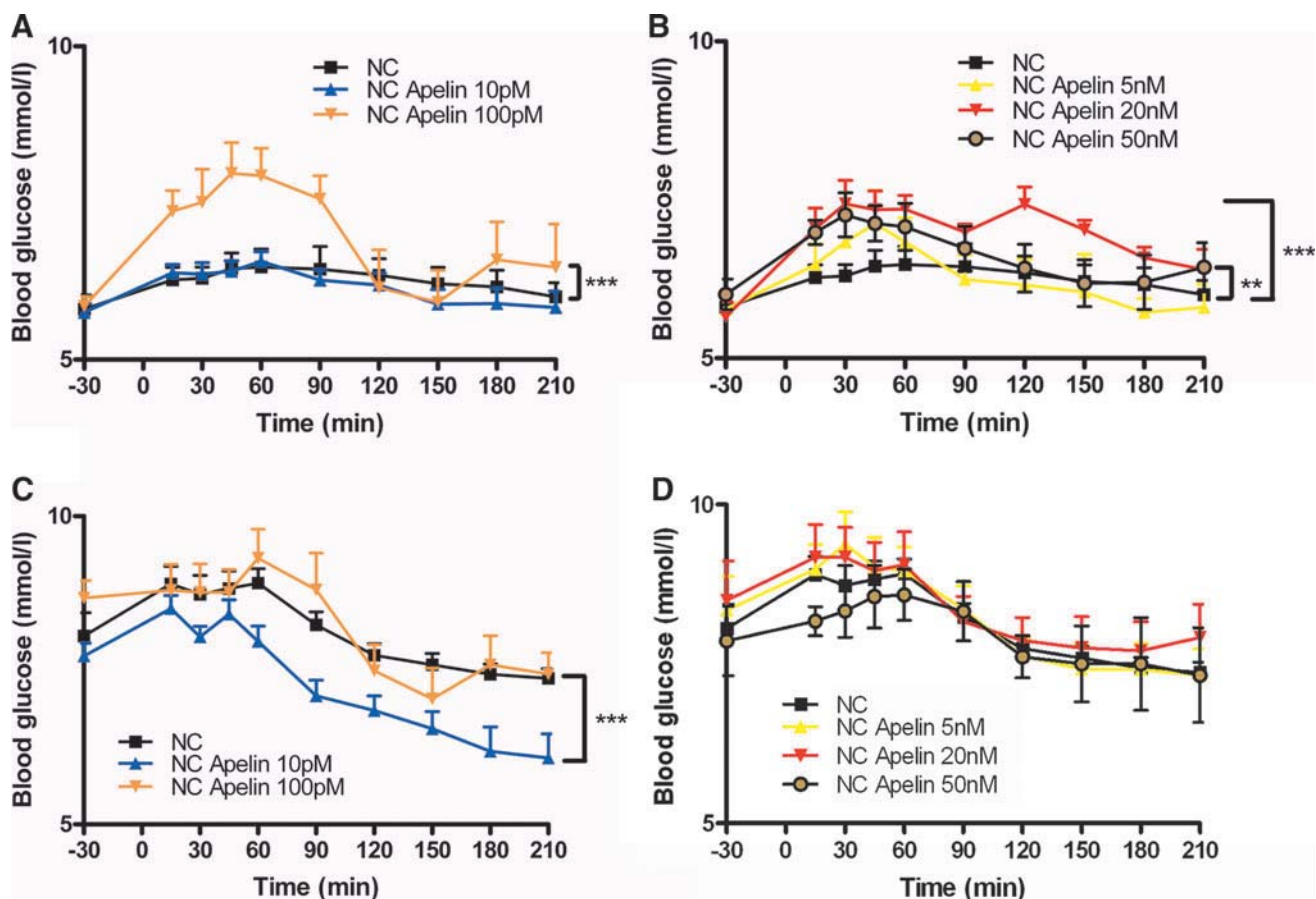
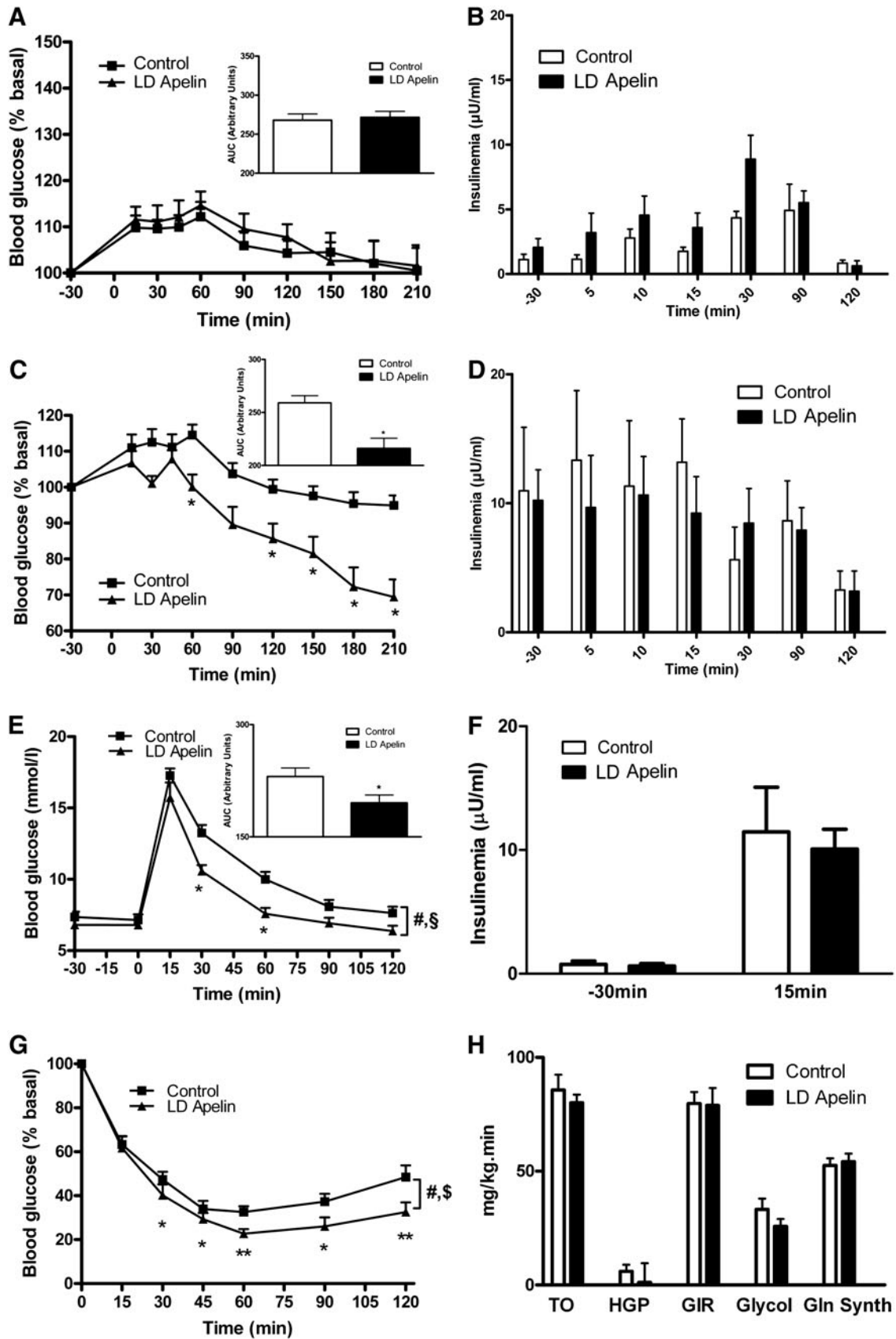


FIG. 1. Dose response of acute i.c.v. apelin injection on peripheral glycemia in fasted and fed state. (A) Effects of 10 pM and 100 pM apelin i.c.v. injected ($n=17$ and 6 , respectively) on blood glucose in fasted normal chow (NC) WT mice compared to aCSF injected fasted NC WT mice (NC; $n=18$); $***p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

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

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

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



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

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

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

Results

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

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

1C). Two doses (2 μ l of 10 pM corresponding to 20.10⁻³ fmol, or 2 μ l of 20 nM corresponding to 40 fmol) were selected for this study in respect to their effects on glycemia (Fig. 1). The first one (called "low-dose (LD)" in the text) was selected for its effect on fed glycemia, whereas the second one (called "high-dose (HD)") for its fasted hyperglycemic effect. The high dose (HD) of apelin (2 μ l of 20 nM) corresponds approximately to half the quantity of total tissue apelin found in C57bl6 mouse hypothalamus (74 \pm 4 fmoles per hypothalamus). These doses of apelin-13 injected iv did not modify blood glucose or insulin concentration (unpublished personal data).

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

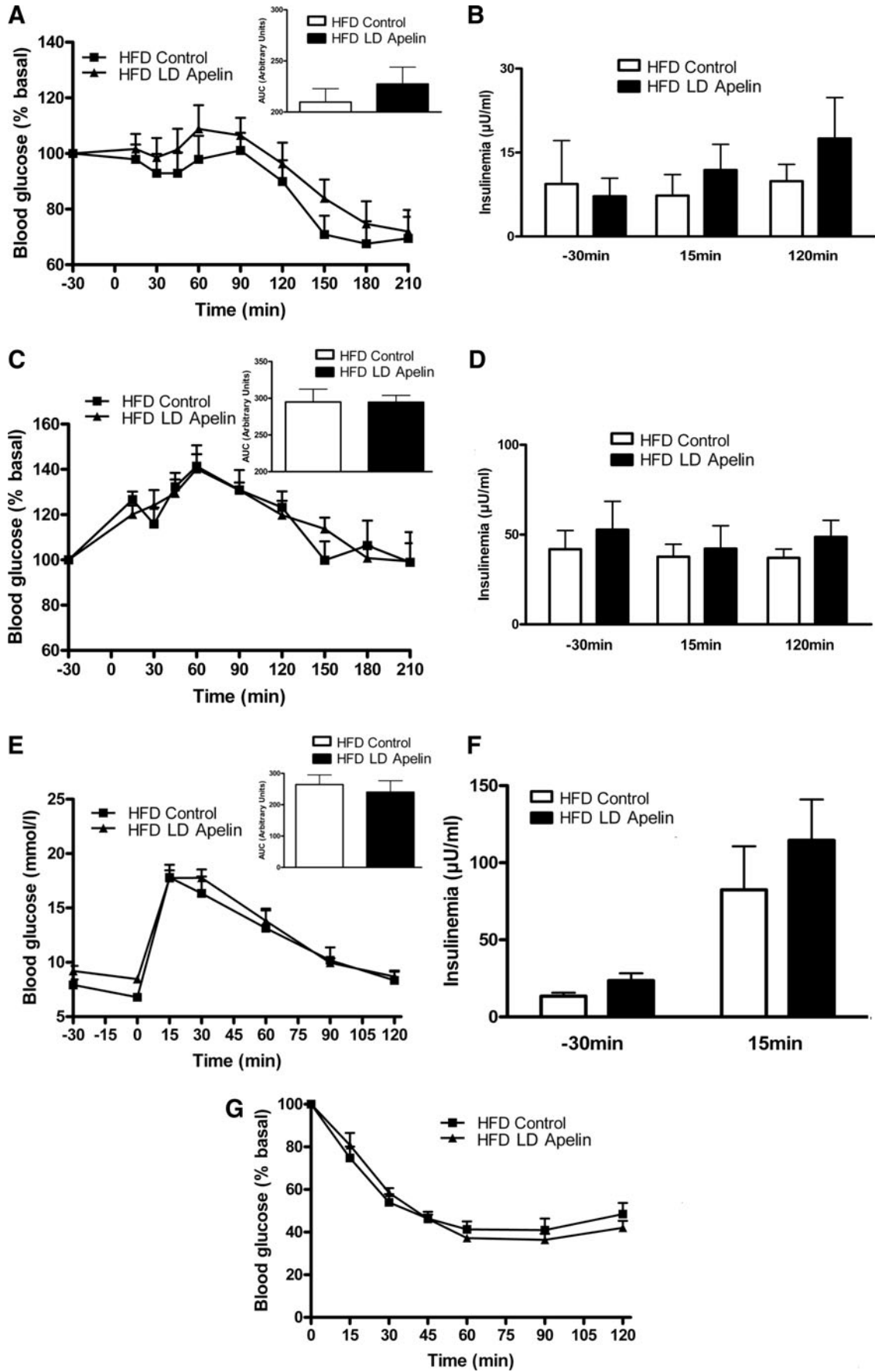
In the fasted state, i.c.v. LD apelin injection did not significantly affect glycemia (Fig. 2A) and insulinemia (Fig. 2B). In the fed state, i.c.v. LD apelin induced a significant decrease in glycemia from 60 to 210 min (Fig. 2C), without altering insulin profiles (Fig. 2D). Further, LD apelin treatment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

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

Circadian variations of plasma apelin levels in NC and HFD mice

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

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



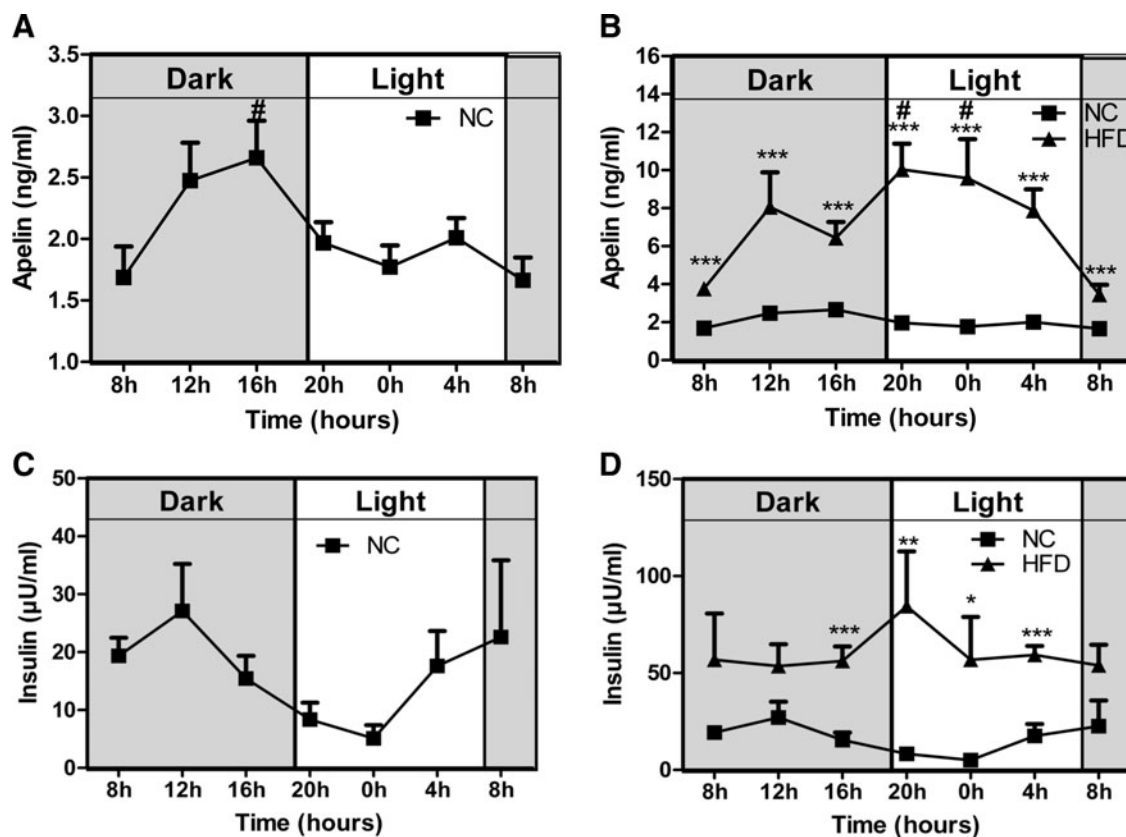


FIG. 4. Circadian plasma apelin variations are altered in HFD mice. **(A)** Circadian plasma apelin variations in NC WT mice ($n=5$). All data were compared to 8 hour. $\#p < 0.05$ vs. 8 hour following one-way ANOVA analysis followed by Dunnett's *post-hoc* test. **(B)** Circadian plasma apelin variations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

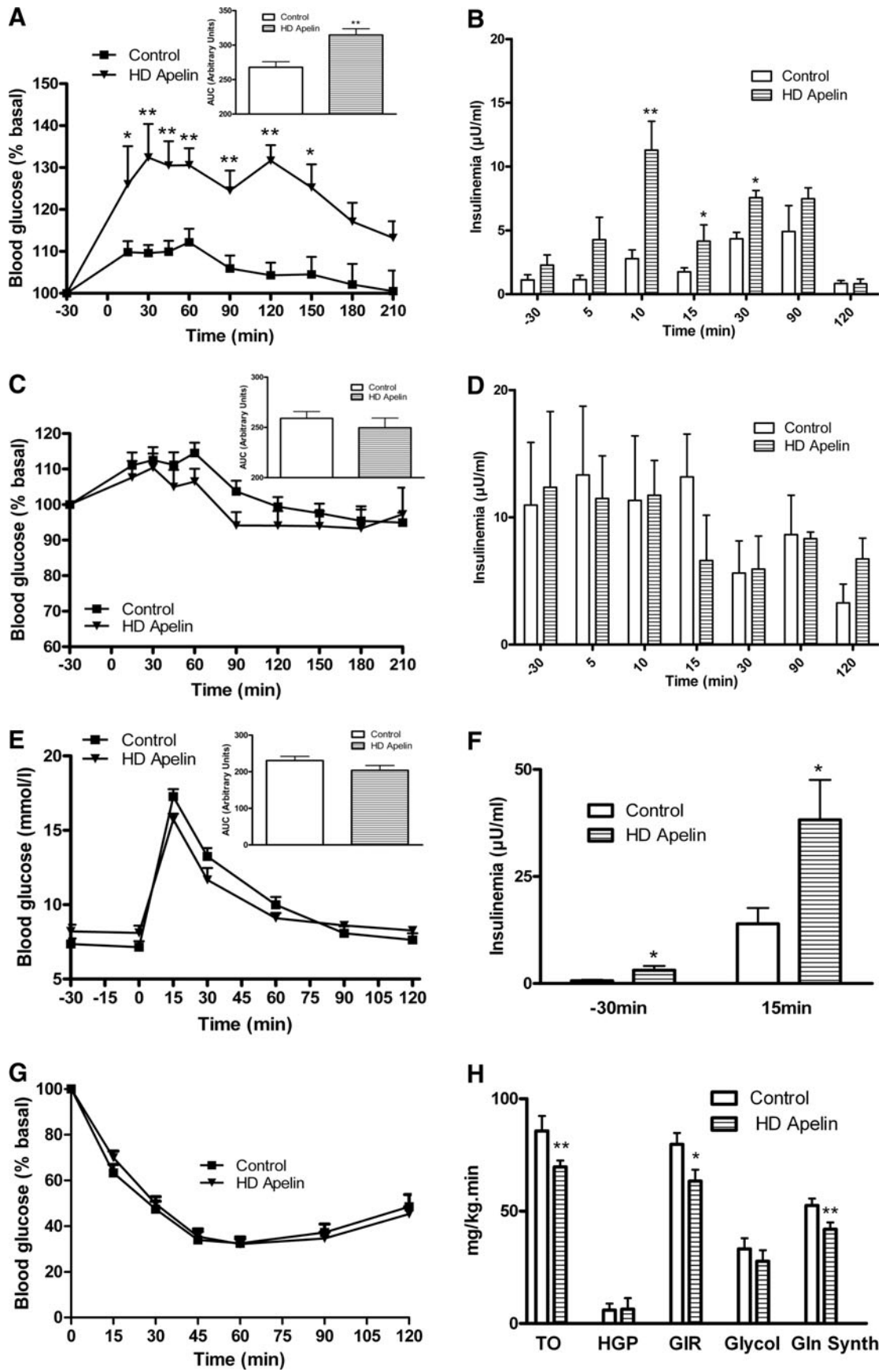
tricular structure where the blood-brain barrier displays physiological modifications (35), may be differentially stimulated by circulating apelin. In accordance with this hypothesis, we measured circadian variations of plasma apelin levels in physiological and physiopathological states. Plasma apelin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

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

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

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

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



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

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

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

Hypothalamic NO as a potential target to brain LD apelin

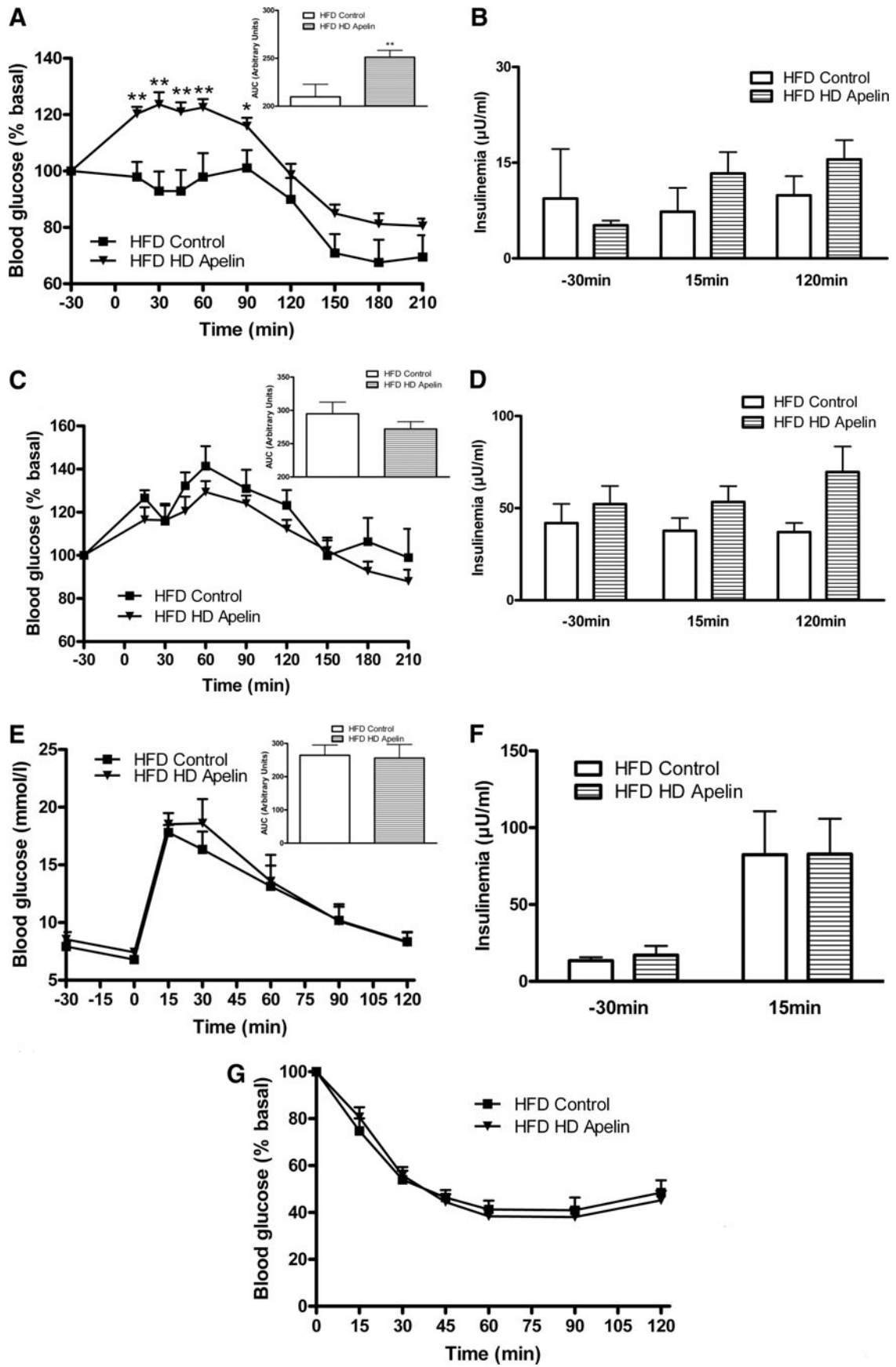
Given that hypothalamic NO is implicated in the control of glucose homeostasis (36) and NO is a major effector of apelin signaling in the periphery (12), we measured real-time NO release *ex vivo* in the hypothalamus in response to LD apelin. No significant variation on NO release was observed in hypothalamic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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

Discussion

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

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

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

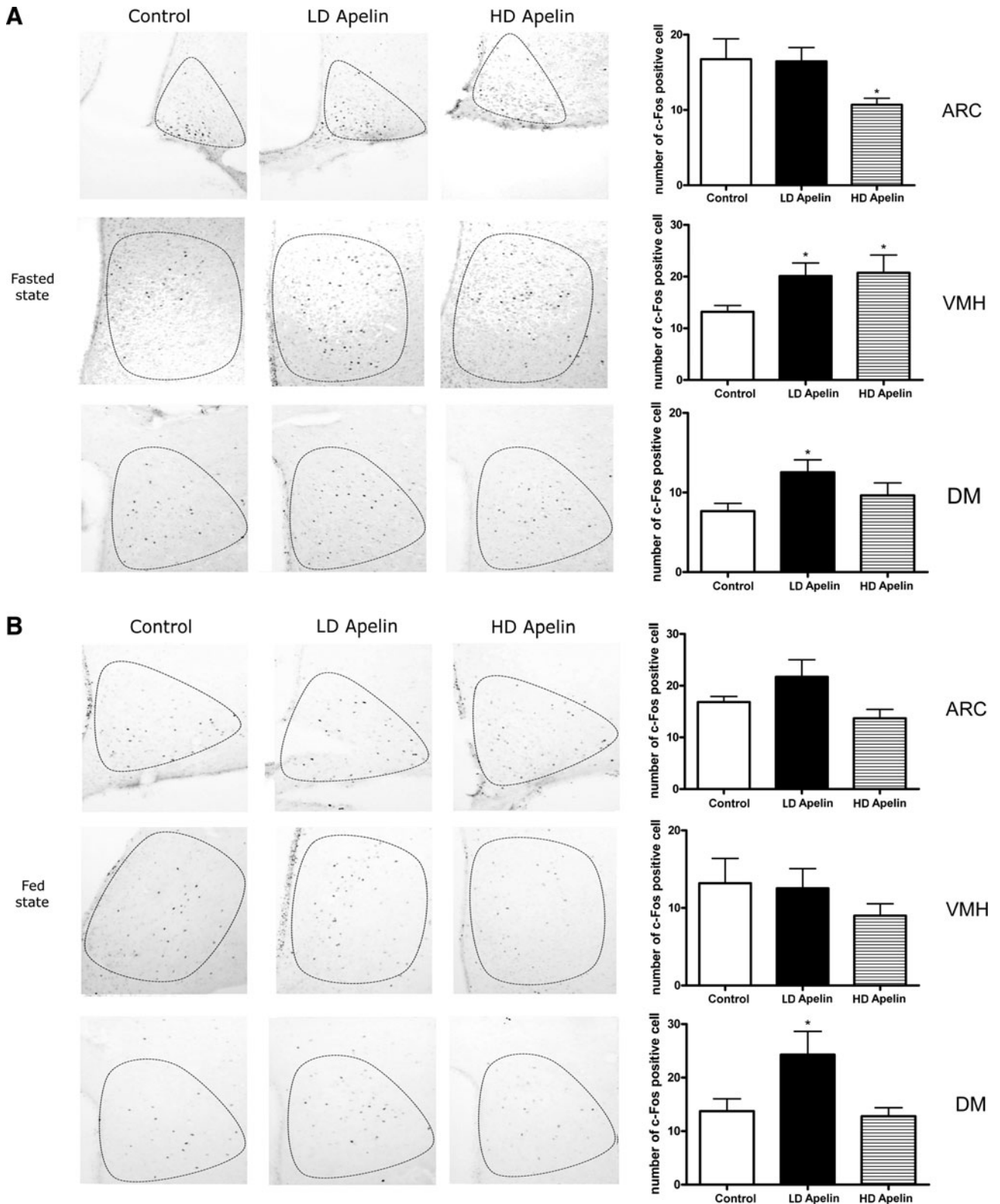
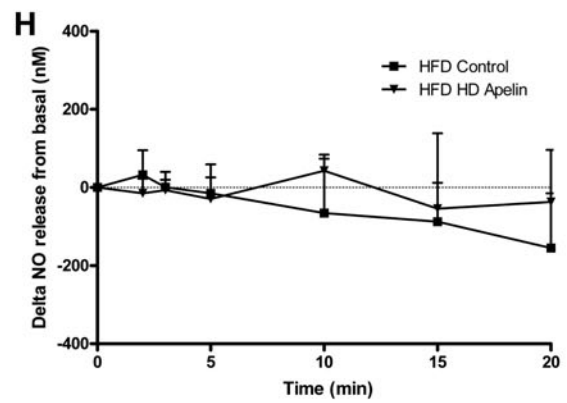
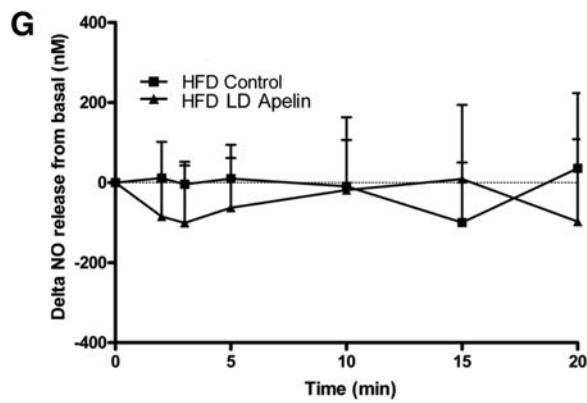
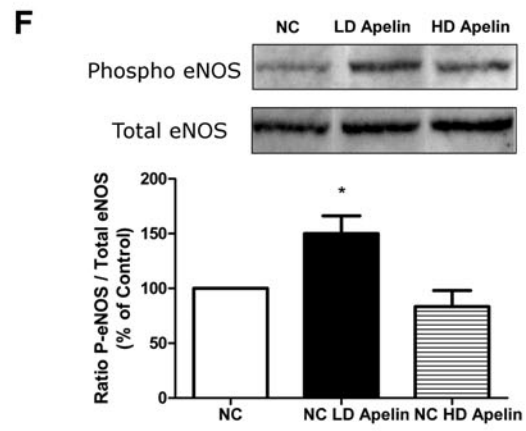
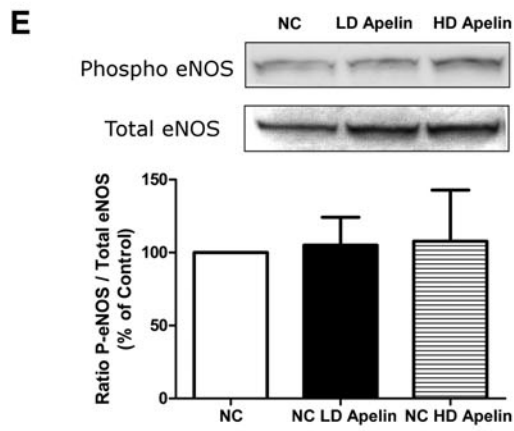
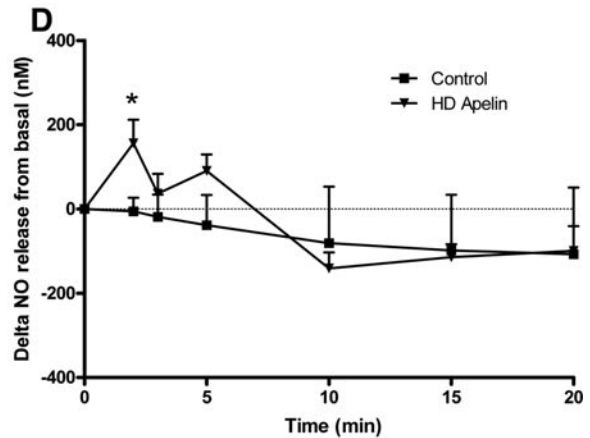
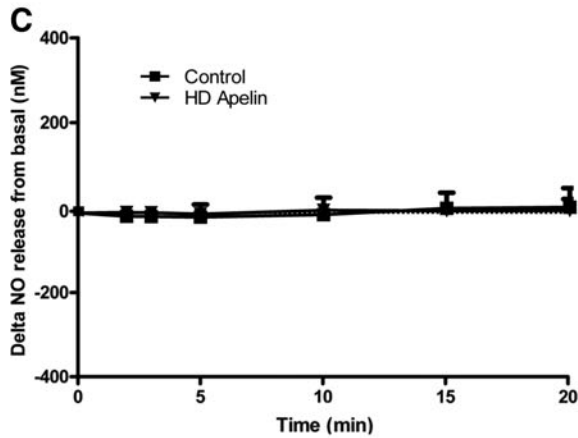
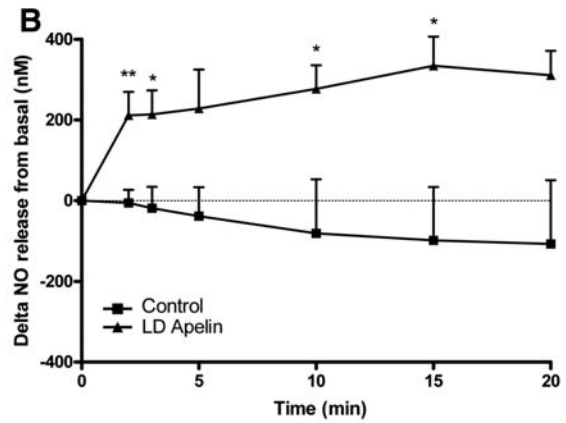
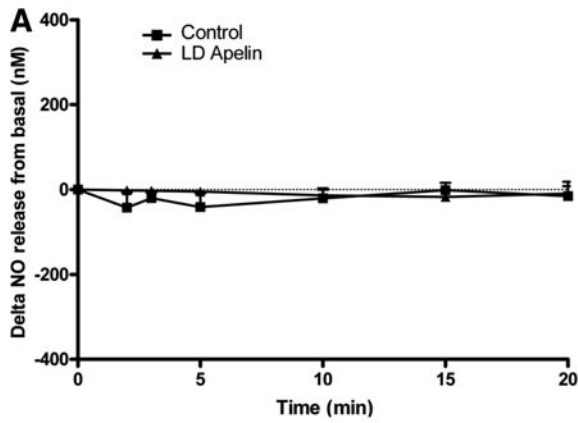


FIG. 7. Differential c-Fos activation by i.c.v. LD or HD apelin in the hypothalamus. (A) Representative staining of c-Fos-expressing cells in the ARC, VMH, and DM nuclei after i.c.v. injection of LD apelin ($n=4$), HD apelin ($n=4$), or aCSF ($n=4$) in fasted NC WT mice. Means \pm SEM are represented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



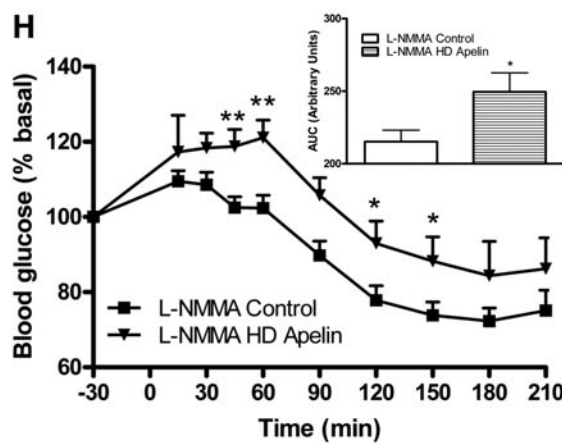
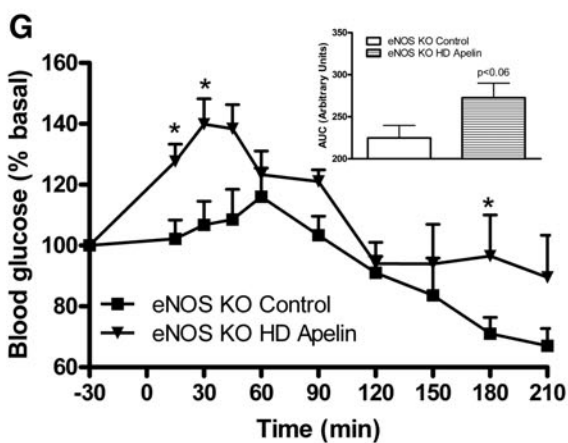
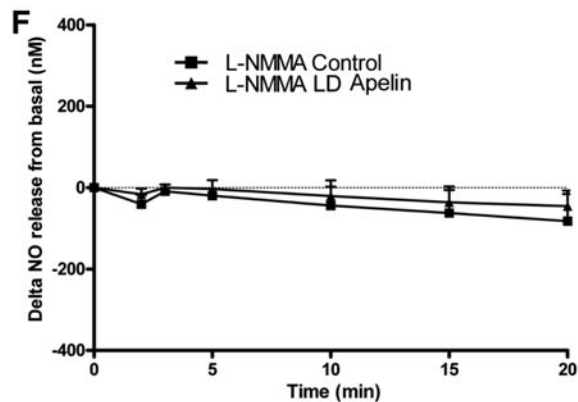
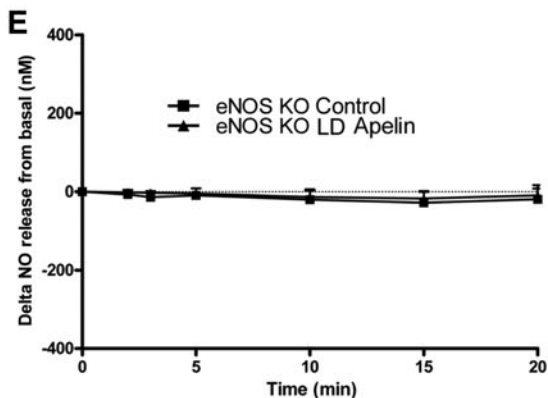
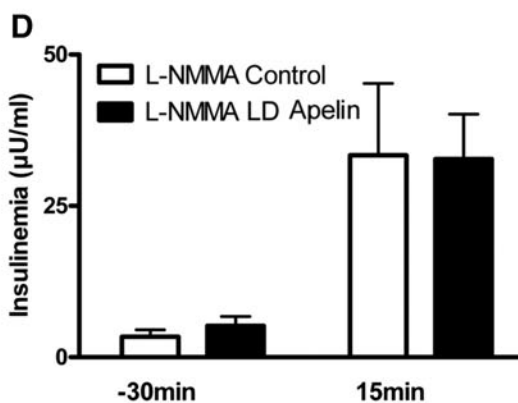
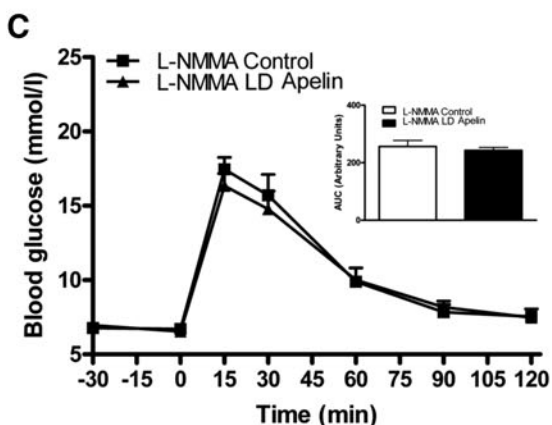
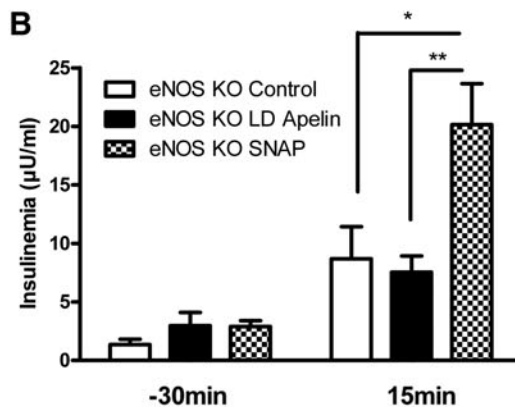
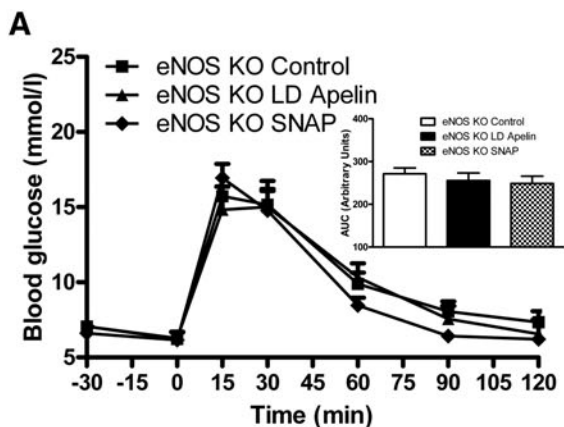
treated with HD apelin did not exhibit increased NO release throughout the 20 minutes of exposure, suggesting that HD apelin activates inhibitory signals for NO. In contrast to LD apelin, we hypothesize that HD apelin may decrease NO release in hypothalamic explants, as observed with leptin on pituitary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

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

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

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

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



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

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

Materials and Methods

Mice

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

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

Surgical procedures

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

Acute injections

Apelin. Bolus injection of 2 μ l of [Pyr]apelin-13 (concentration from 10 pM to 50 nM corresponding to 20.10⁻³ fmol to 50 fmol, Bachem, UK), the most active apelin isoform (12), was injected directly to the i.c.v. catheter completed to 2 μ l of artificial cerebrospinal fluid (aCSF) for treated mice, or 4 μ l of aCSF for control mice. Blood glycemia was measured every 30 min from -30 to 210 min (time 0 corresponding to i.c.v. apelin injection). To limit stress due to accumulation of tail blood samples, insulinemia was measured at different time intervals from -30 to 120 min in another set of mice.

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

Chronic perfusion of apelin

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

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

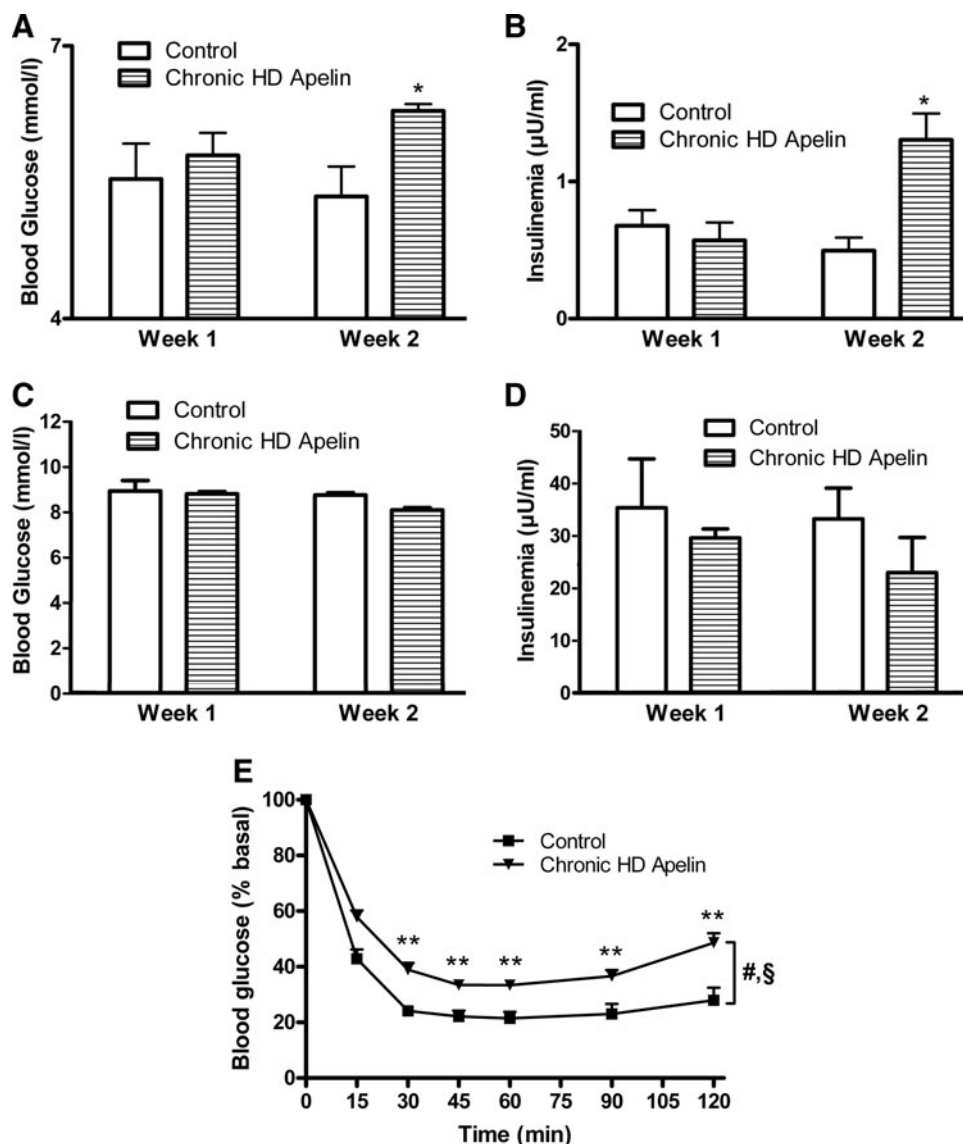


FIG. 10. Chronic i.c.v. HD apelin perfusion alters glucose metabolism in NC mice. (A) 2 weeks time-course blood glucose in fasted NC WT mice with chronic i.c.v. perfusion of HD apelin (*hatched*, $n=7$) or aCSF (*white*, $n=6$); $*p<0.05$. (B) 2 weeks time-course insulinemia evolution in fasted NC WT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

Real-time amperometric NO measurements

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

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

Oral glucose tolerance test

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

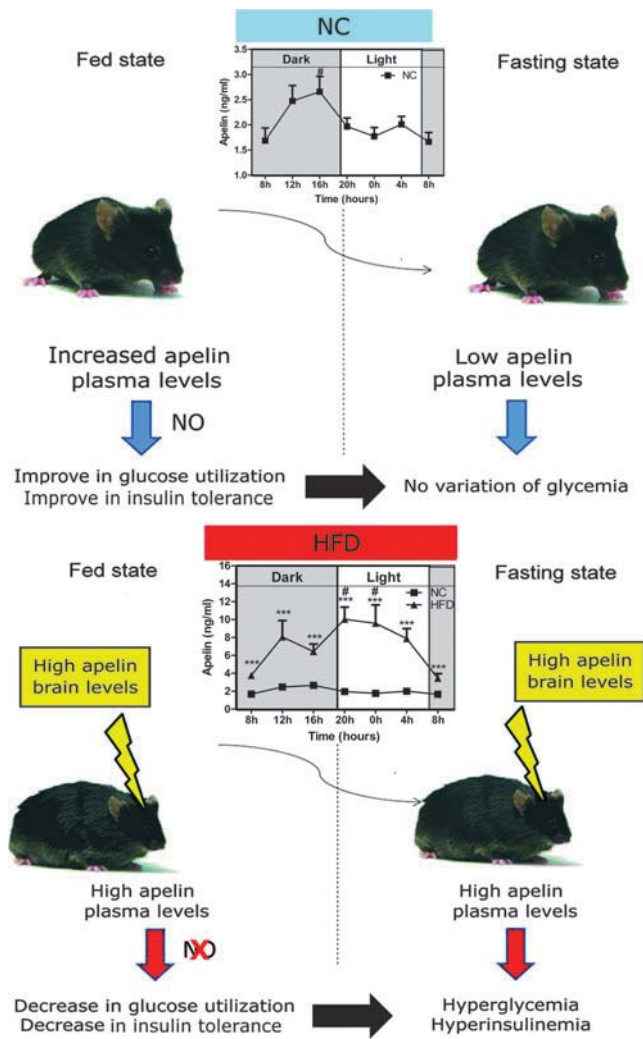


FIG. 11. Apelin mediates the transition from normal to the diabetic state. In the physiological fed state, the increase in plasma apelin levels exerts beneficial effects on peripheral glycemia. In the physiopathological state, the high plasma apelin levels may exert deleterious effects in the brain,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

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

ITT

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

Euglycemic hyperinsulinemic clamp

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

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

Insulin assays

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

Variations of plasma apelin levels

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

Quantification of c-Fos expression in the hypothalamus

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

Western blot analysis

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

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

Statistical analysis

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

Acknowledgments

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

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

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

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

Address correspondence to:

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

E-mail: claud.knauf@inserm.fr

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

Abbreviations Used

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



The apelinergic system: Sexual dimorphism and tissue-specific modulations by obesity and insulin resistance in female mice



Laura Butruille^a, Anne Drougard^b, Claude Knauf^b, Emmanuelle Moitrot^a, Philippe Valet^b, Laurent Storme^a, Philippe Deruelle^a, Jean Lesage^{a,*}

^a Université Lille Nord de France, Unité Environnement Périnatal et Croissance, EA 4489, Faculté de Médecine, Pôle Recherche, IFR 114, 59045 Lille, France

^b Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Team 3, INSERM U1048, 31432 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 February 2013

Received in revised form 28 May 2013

Accepted 28 May 2013

Available online 5 June 2013

Keywords:

Apelin/APJ

Sexual dimorphism

Mouse

Obesity

Diabetes

ABSTRACT

It has been proposed that the apelinergic system (apelin and its receptor APJ) may be a promising therapeutic target in obesity-associated insulin resistance syndrome. However, due to the extended tissue-distribution of this system, the therapeutic use of specific ligands for APJ may target numerous tissues resulting putatively to collateral deleterious effects. To unravel specific tissular dysfunctions of this system under obesity and insulin-resistance conditions, we measured the apelinemia and gene-expression level of both apelin (APL) and APJ in 12-selected tissues of insulin-resistant obese female mice fed with a high fat (HF) diet. In a preliminary study, we compared between adult male and female mice, the circadian plasma apelin variation and the effect of fasting on apelinemia. No significant differences were found for these parameters suggesting that the apelinemia is not affected by the sex. Moreover, plasma apelin level was not modulated during the four days of the estrous cycle in females. In obese and insulin-resistant HF female mice, plasma apelin concentration after fasting was not modified but, the gene-expression level of the APL/APJ system was augmented in the white adipose tissue (WAT) and reduced in the brown adipose tissue (BAT), the liver and in kidneys. BAT apelin content was reduced in HF female mice. Our data suggest that the apelinergic system may be implicated into specific dysfunctions of these tissues under obesity and diabetes and that, pharmacologic modulations of this system may be of interest particularly in the treatment of adipose, liver and renal dysfunctions that occur during these pathologies.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Apelin (APL) is derived from a 77-amino acid precursor, which undergoes proteolytic maturation generating shorter active apelin peptides, e.g. apelin-36, apelin-17, apelin-13 and its pyroglutamyl isoform (Pyr1)-apelin-13 and apelin-12 [5]. Apelin exerts paracrine functions by binding and activating the apelin receptor (APJ) [5,19]. However, as apelin is also a circulating peptide, it exerts in addition physiological actions in the periphery through its transport in blood. At a cellular level, the activation of the APJ receptor initiates the downstream phosphoinositide 3-kinase (PI3K), which subsequently stimulates protein kinase B (PKB/AKT) and extracellular signal-regulated kinases (ERKs) pathways [3,19,27].

* Corresponding author at: Unité Environnement Périnatal et Croissance (EA4489), Université Lille-Nord de France, Equipe Dénutrition Maternelles Périnatales, Université de Lille 1, Bâtiment SN4, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France. Tel.: +33 0320 33 77 22; fax: +33 0320 33 63 49.

E-mail address: jean.lesage@univ-lille1.fr (J. Lesage).

Apelin and APJ are widely distributed in rodent and human organs such as the brain, kidneys, heart, lungs, liver, adrenals, adipose tissue, mammary glands, gastrointestinal tract, retina, the vascular endothelium and muscle [5,24,25]. Increasing evidence suggest that apelin regulates multiple physiological functions including body fluid homeostasis, food intake, cell proliferation, blood pressure regulation, angiogenesis and glucose utilization [5,24,25]. Therefore, the apelinergic system may interfere in the etiology and/or in physiopathological consequences of several metabolic diseases such as diabetes, obesity, hypertension or cardiovascular diseases.

In the cardiovascular system, apelin was demonstrated to have multiple effects of interest. It has been shown to increase heart contractility [1], myocardial glucose uptake [45] and to be angiogenic [11]. Moreover, apelin is a potent vasodilator for both arteries and veins [22]. Its effects are endothelium-dependent and predominantly mediated through nitric oxide (NO)-dependent pathways [41]. An emerging feature is the close functional interaction between the APL/APJ system and the renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. APJ is able to form

heterodimers with the angiotensin-II receptor type 1 (AT₁) resulting to its inactivation [38]. Moreover, the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) is also implicated in both apelin-13 and apelin-36 inactivations [15]. Under pathological conditions, plasma apelin level has been reported as a marker of cardiopulmonary diseases in rat and in human [15].

In the brain, the APL/APJ system is highly expressed in the hypothalamus and it was proposed that it may regulate energy homeostasis. However, reported findings are complex and sometimes contradictory. For example, intracerebroventricular apelin administration was shown to decrease food intake in fed and fasted rats [40] during nocturnally injection whereas, during daytime, apelin was found to stimulate feeding [31]. In mice, this central administration of apelin increases food intake and locomotor activity during the nocturnal period but increases only body temperature during the period of activity of animals [43]. Finally, apelin induces a down-regulation of central APJ in high-fat (HF) diet fed rats [10] suggesting that a decreased central response to APL may appear during obesity. In line with these findings, an increase plasma apelin level was reported in morbidly obese subjects [17]. Moreover, apelin plasma level was found to be higher in obese diabetic patients compared to non-diabetic obese subjects [39]. Accordingly, growing evidence suggest that the APL/APJ system plays important roles in glucose metabolism and insulin sensitivity regulations. For examples, apelin was shown to inhibit insulin secretion [26] and to exert beneficial effects in HF-obese and insulin-resistant mice, improving both glucose utilization and glucose tolerance [13,14].

Considering all these physiological actions, we can speculate that the APL/APJ system may exert critical effects in the initiation and/or in physiopathological consequences of obesity and diabetes. Recently, it has been proposed that this system may be a promising therapeutic target in obesity-associated insulin resistance syndrome [6]. However, due to the extended tissue-distribution of the APL/APJ system, the therapeutic use of specific ligands for APJ may target numerous tissues resulting putatively to collateral deleterious effects of these treatments. To unravel specific tissular dysfunctions of the apelinergic system under obesity and insulin-resistance states, we measured in the present study, the circulating apelin plasma level and the gene-expression level of both APL and APJ in 12-selected tissues of insulin-resistant obese female mice fed with a HF diet. In addition, as no comparative data between males and females on circulating apelin levels are available in rodents; in the first part of this study, we measured in 3-month-old male and female mice, the circadian plasma apelin variation and the effect of fasting on apelinemia. Finally, in females, plasma apelin concentration at rest was also investigated during four

consecutive days to evaluate the putative influence of the estrous cycle.

2. Materials and methods

2.1. Animal model and experimental design

Experiments were conducted in accordance with the European Communities Council Directive of 1986 (86/609/EEC). Two months old C57BL/6J female mice (Janvier, Le Genest St Isle, France) were maintained under temperature, light and hygrometry standards conditions and had free access to food. A first experiment was performed using C57BL/6J female and male mice ($n = 10/\text{group}$) in order to determine putative sexual differences of plasma apelin concentrations in the mouse. At 12 weeks of age, tail blood samples were collected every 8 h during a 24 h period (08.00, 16.00, 00.00 and 08.00 h). Then, 4 days later, tail blood samples were collected after 6 h of fasting to study the effect of fasting on plasma apelin level in both sexes. Finally, in females fed *ad libitum*, four blood samples were collected from the tail vein during 4 consecutive days at 08.00 h to evaluate the effect of the estrous cycle. In a second experiment, control mice (C group; $n = 6$) were fed by a standard diet (SAFE A04, containing 3% fat, 16% protein, 60% carbohydrate; 2.9 kcal/g) and the second experimental group (HF group; $n = 7$) was exposed to an high-fat diet (Special Diets Service, containing 22% fat, 18% protein, 50% carbohydrate; 4.63 kcal/g) from 8 to 36 weeks of age.

2.2. Growth and metabolic parameters measurements

Control mice and HF mice were weighed weekly and glucose tolerance studies were made at 35 weeks of age. An oral glucose tolerance test (OGTT) was realized after 6 h of diurnal fasting. Mice received orally a solution containing 3 g/kg of body weight and blood glucose level was determined using a glucometer (Accu-Chek® Performa, Roche, France) 30 min before and 0, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min post-gavage. An insulin tolerance test (ITT) was performed two days later after 6 h of fasting. Mice received 1 mU/g of body weight of insulin injected intraperitoneally, thereafter blood glucose levels were measured at the same time than during the OGTT analysis.

2.3. Plasma and tissue collections and ELISA

Female mice were decapitated at the age of 36 weeks after 6 h of fasting. Blood glucose was measured using a glucometer and blood samples were collected in tubes pre-rinsed with 5% EDTA and

Table 1
Primers used for RT-qPCR analysis.

Target	NCBI detected transcript number	Sequence	Length of amplicon
Apelin			
Forward	NM.013912.3	TGTGGAGTGCCACTGATGTTGCC	142 pb
Reverse		GGGGCCGCTGTCTGCGAAAT	
APJ			
Forward	NM.011784.3	GGCTAAGGCTGCGAGTCA	100 pb
Reverse		CGCTCTGTGGAACGGAAC	
β-Actin			
Forward	NM.007393.3	ACCCGCCACCAAGTTCGCCAT	72 pb
Reverse		TTTGACATGCCGGAGCCGT	
GAPDH			
Forward	NM.008084.2	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	70 pb
Reverse		CACCACCTTCTTGATGTCATCATAC	

List of targets with accession numbers, primer positions, and size of PCR products. Accession numbers correspond to the mRNA sequences.

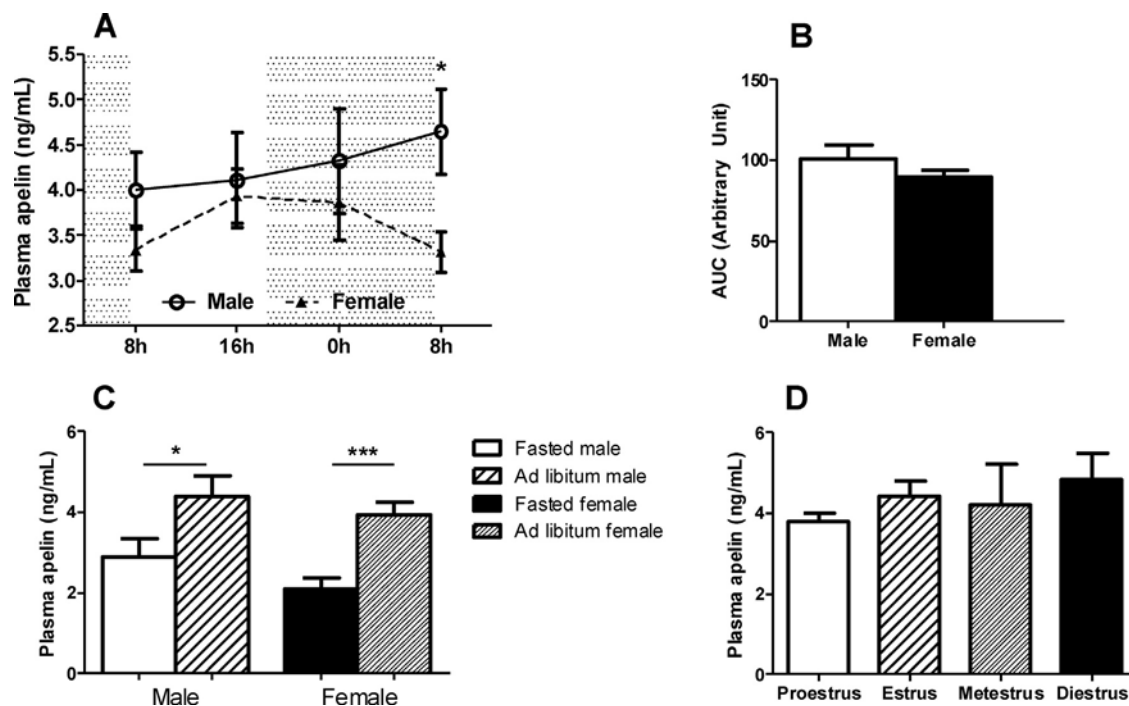


Fig. 1. Circadian plasma apelin variations (A) in 12-week-old male and female mice ($n = 10$ animals/group). $*P < 0.05$ male vs female. The adjacent bar graph represents the average AUC (B). Plasma apelin concentrations (C) in fed (*ad libitum*) and 6-h-fasted mice ($n = 10$ /group). $*P < 0.05$; $***P < 0.001$ fed vs fasted condition. (D) Plasma apelin concentration at 08.00 h in 12-week-old female mice ($n = 10$) during the four days of the estrus cycle.

centrifuged at $4000 \times g$ during 10 min at 4°C . Aliquots of the supernatant were kept at -20°C . Plasma apelin levels were determined by the non-selective apelin-12 EIA kit (Phoenix Pharmaceutical). In each mouse, hypothalamus, pituitary gland, perirenal and perigonadal fat deposits, brown adipose tissue (BAT), lungs, liver, kidneys, quadriceps muscles, ovaries, heart and adrenal glands were removed and weighed before to be frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . For tissular apelin assay, 15 mg of frozen BAT and kidney samples were used for apelin content determination using the non-selective apelin-12 EIA kit (Phoenix Pharmaceutical). The protocol for peptide extraction and assay characteristics has been previously described [35]. Results were expressed in ng/mg tissue.

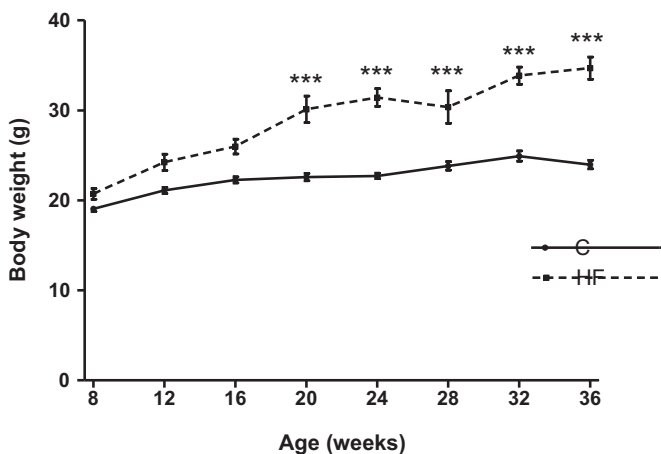


Fig. 2. Body weight curves of female mice from the age of 8 weeks to 36. Female mice were fed with a control (C) or a high-fat (HF) diet beginning at the age of 8 weeks. Values are means \pm S.E.M. ($n = 6-7$ animals/group). $***P < 0.001$ HF vs C group.

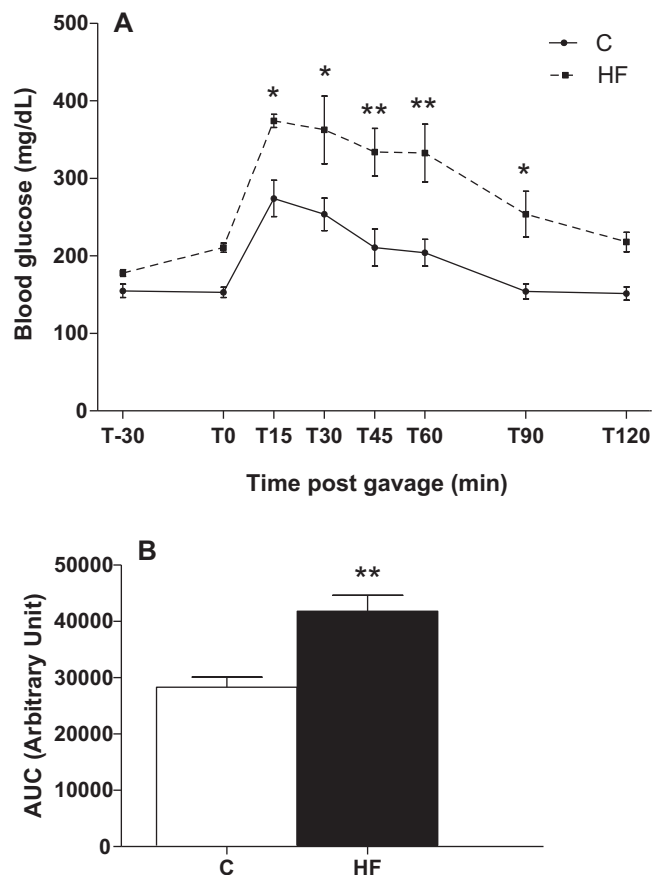


Fig. 3. Oral glucose tolerance test in 35-week-old female mice fed with a control (C) or a high-fat (HF) diet. Time course of plasma glucose (A) during OGTT with corresponding index (B) of area under curve (AUC), expressed in AU. Values are means \pm S.E.M. ($n = 6-7$ animals/group). $*P < 0.05$; $**P < 0.01$ HF vs C group.

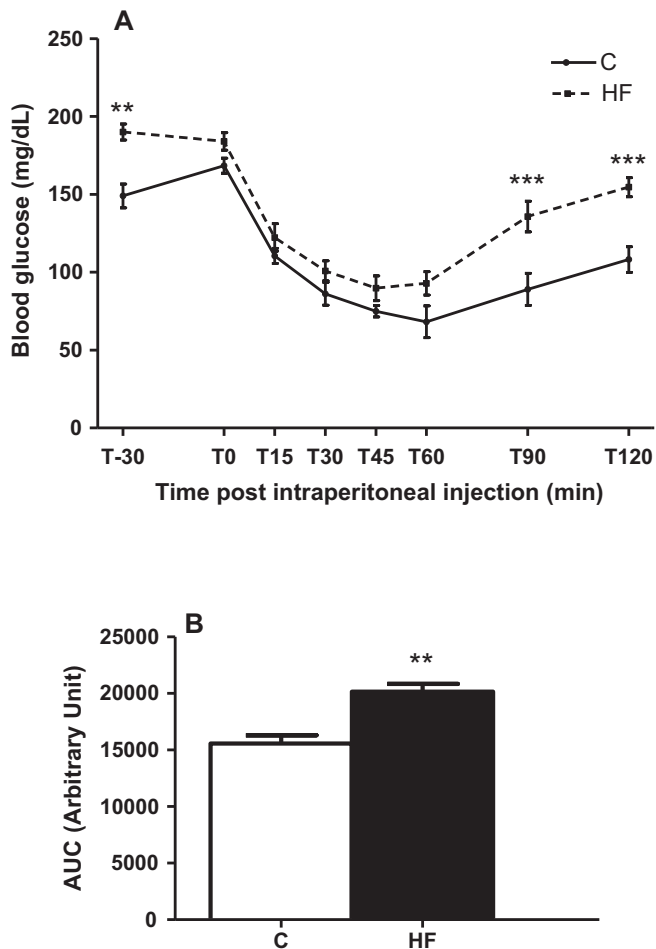


Fig. 4. Insulin tolerance test in 35-week-old female mice fed with a control (C) or a high-fat (HF) diet. Time course of plasma glucose (A) during ITT with corresponding index (B) of area under curve (AUC), expressed in AU. Values are means \pm S.E.M. ($n=6-7$ animals/group). ** $P<0.01$; *** $P<.001$ HF vs C group.

2.4. Quantitative RT-PCR

Gene expression level of both apelin and its APJ receptor in the 12-selected tissues were determined in control and HF mice using RT-qPCR on a Roche Lightcycler 480 as previously described [21]. RNA was extracted using TRIzol[®] reagent (Invitrogen, Life Technologies, France) according to the manufacturer's recommendations. The quality and quantity of RNA was measured using the spectrophotometer NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Illkrich, France). All RNA used presented a 260/280 and 260/230 absorbance ratio higher or equal to 2.0. An equal amount of total RNA (1 μ g) from each sample was used for cDNA synthesis (Thermoscript[™], Invitrogen, Life Technologies, France). Relative expression levels of RNA per sample were quantified by Roche[®] assay. For each sample, PCR was performed in duplicates with 10 μ L reaction volumes of 1 μ L of cDNA, 8 μ L of mix, and 1 μ L of each primer set. PCR was conducted using the following cycle parameters: 15 min at 95 $^{\circ}$ C and 50 three steps cycles of 10 s at 95 $^{\circ}$ C, 15 s at 60 $^{\circ}$ C and 15 s at 72 $^{\circ}$ C. The assay was performed following the manufacturer's recommendations except that the reaction volume was reduced to 10 μ L. All cDNA samples were applied in dilution of 1:20 to obtain results within the range of the standard. Analysis of transcript level was carried out using first the determination of the threshold cycle Ct for each. The amount of target relative to a calibrator was computed by $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Primer sequences are detailed in the Table 1. Two house-keeping genes (GAPDH and β -actin) were used for normalization.

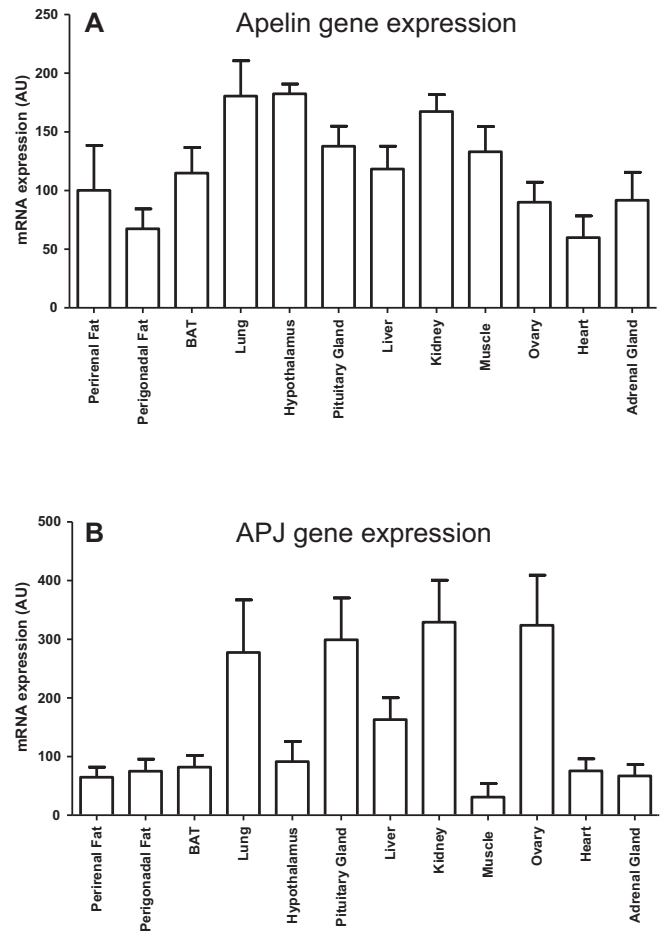


Fig. 5. Relative quantification by RT-qPCR analyses of apelin (A) and APJ (B) gene-expression level in 12-selected tissues of adult control mice. Values are means \pm S.E.M. ($n=6$ animals/group).

2.5. Statistical analysis

All data are presented as mean \pm S.E.M. Results were analyzed by Student's *t*-tests and two-way ANOVA followed by Newman-Keuls *post hoc* test with GraphPad Prism 5.03 software.

3. Results

3.1. Evaluation of sexual dimorphism of apelinemia in mice

Circadian plasma apelin variations were investigated in 12-week-old male and female mice (Fig. 1A). Only a significant increase ($P<0.05$) of plasma apelin concentration was observed in females at 08.00 h (at day 2 of the experiment). However, the calculated AUC for this study did not show any significant difference between males and females (Fig. 1B). Plasma apelin concentration was similarly reduced after 6 h of fasting in both male ($P<0.05$) and female ($P<0.001$) mice (Fig. 1C). Finally, plasma apelin level at 08.00 h was not significantly modulated during the four days of the estrus cycle in adult female mice (Fig. 1D).

3.2. Evolution of the body weight, OGTT and ITT tests

From 8 to 36 weeks of age, female mice exposed to the high-fat diet developed an increase body weight which was significantly augmented ($P<0.001$) from week 20 to 36 (Fig. 2). In 35-week-old female mice, glucose metabolism was studied using an oral glucose

Apelin mRNA levels

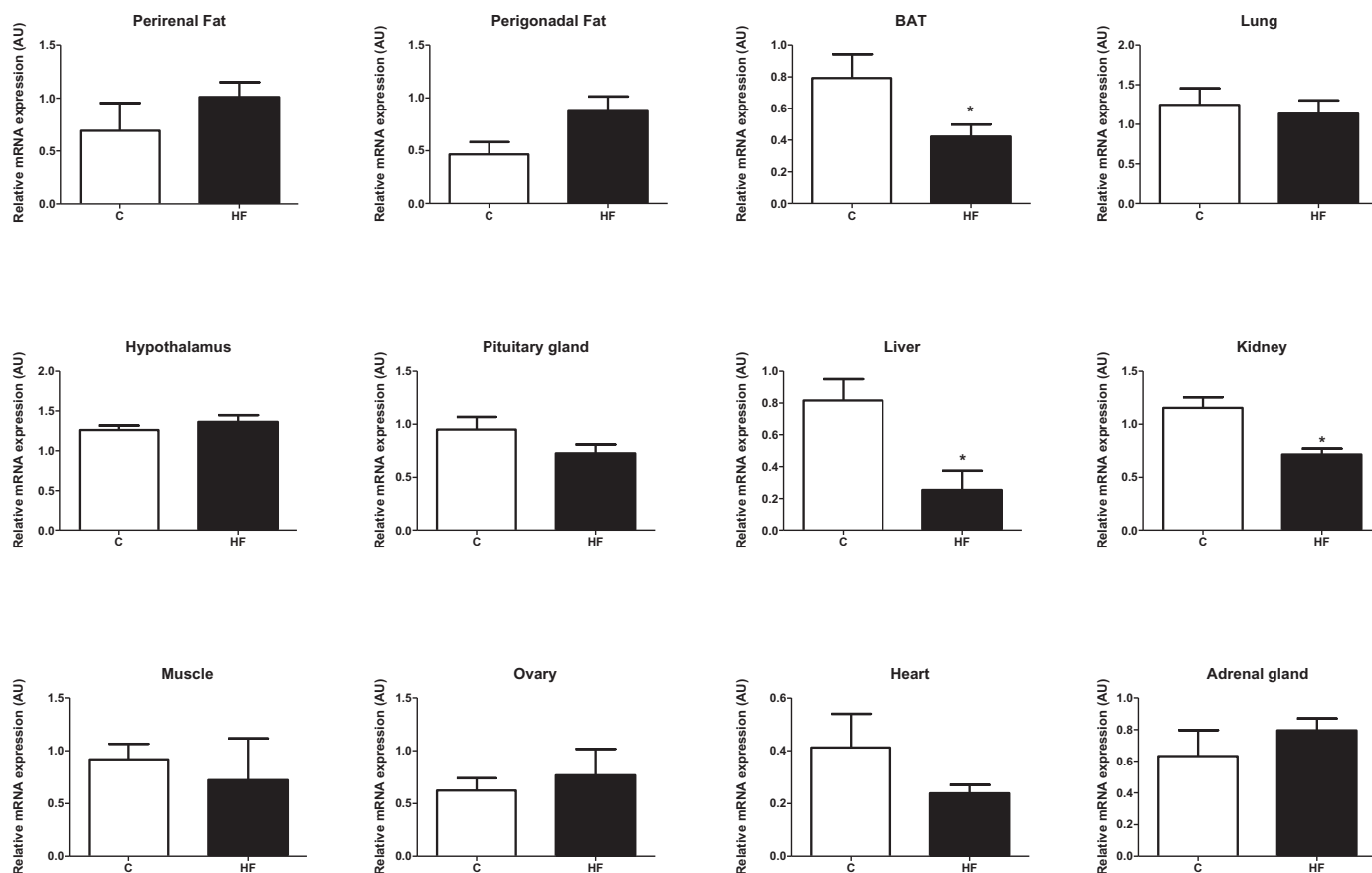


Fig. 6. Relative quantification by RT-qPCR analyses of apelin gene-expression level in 12-selected tissues of 36-week-old female mice fed with a control (C) or a high-fat (HF) diet. Values are means \pm S.E.M. ($n = 6-7$ animals/group). * $P < 0.05$ HF vs C group.

tolerance test (Fig. 3) and an insulin tolerance test (Fig. 4). During OGTT, basal blood glucose level was similar between groups but response to a glucose bolus revealed a glucose intolerance in HF female mice demonstrated by a higher blood glucose level at time 15, 30, 45, 60 and 90 min after gavage (Fig. 3A) and an increased value ($P < 0.01$) of the calculated area under curve during this test (Fig. 3B). During ITT which was performed two-days later, basal blood glucose level was increased ($P < 0.01$) in fasted-HF female mice (point T-30 in Fig. 4A), as well as 90 and 120 min ($P < 0.001$) after insulin injection (Fig. 4A). The reduced insulin sensitivity in HF female mice was confirmed by the significant increased value ($P < 0.01$) of the calculated area under curve in this experiment (Fig. 4B).

3.3. Morphometric and biological parameters in 36-week-old fasted female mice

At 36 weeks of age, HF female mice were obese as shown by the drastic increase of their body weight (+56%, $P < 0.01$, Table 2). Obese HF females had a higher amount of perirenal (+176%) and perigonadal (+158%) fat deposits as well as brown adipose tissue (+87%, $P < 0.01$, Table 2). A significant increase ($P < 0.01$) of both liver (+68%) and lungs (+60%) weights were also observed in HF mice (Table 2). Basal blood glucose level and plasma apelin concentration were not significantly different between groups (Table 2).

3.4. Apelin and APJ expressions in 36-week-old fasted female mice

We selected 12 tissues known to express of the APL/APJ system at a high level. In a first RT-qPCR experiment performed in control mice (Fig. 5), we measured the amount of APL and APJ mRNAs to confirm the high expression level of these two factors. In Fig. 5A, we demonstrated that apelin mRNA was found to be expressed in

Table 2
Morphometric and biological parameters after 6 h of fasting of adult female mice (36 weeks old) fed with a control (C) or a high-fat (HF) diet.

	C	HF
Body weight (g)	24.2 \pm 0.6	37.6 \pm 1.2**
Blood glucose (mg/dL)	155 \pm 14	164 \pm 12
Plasma apelin (ng/mL)	6.9 \pm 1.5	6.5 \pm 1.0
Perirenal fat (mg)	120 \pm 15	332 \pm 59**
Perigonadal fat (mg)	214 \pm 35	554 \pm 58**
Brown adipose tissue (mg)	109 \pm 9	204 \pm 2**
Lungs (mg)	174 \pm 11	279 \pm 31**
Liver (mg)	1152 \pm 91	1951 \pm 81**
Spleen (mg)	202 \pm 47	216 \pm 52
Kidneys (mg)	334 \pm 21	392 \pm 12
Ovaries (mg)	14 \pm 2	24 \pm 3
Heart (mg)	160 \pm 17	162 \pm 9
Adrenal glands (mg)	11 \pm 1	15 \pm 1

Values are means \pm S.E.M., $n = 6-7$ animals in each group.

** $P < 0.01$ HF vs C group.

APJ mRNA levels

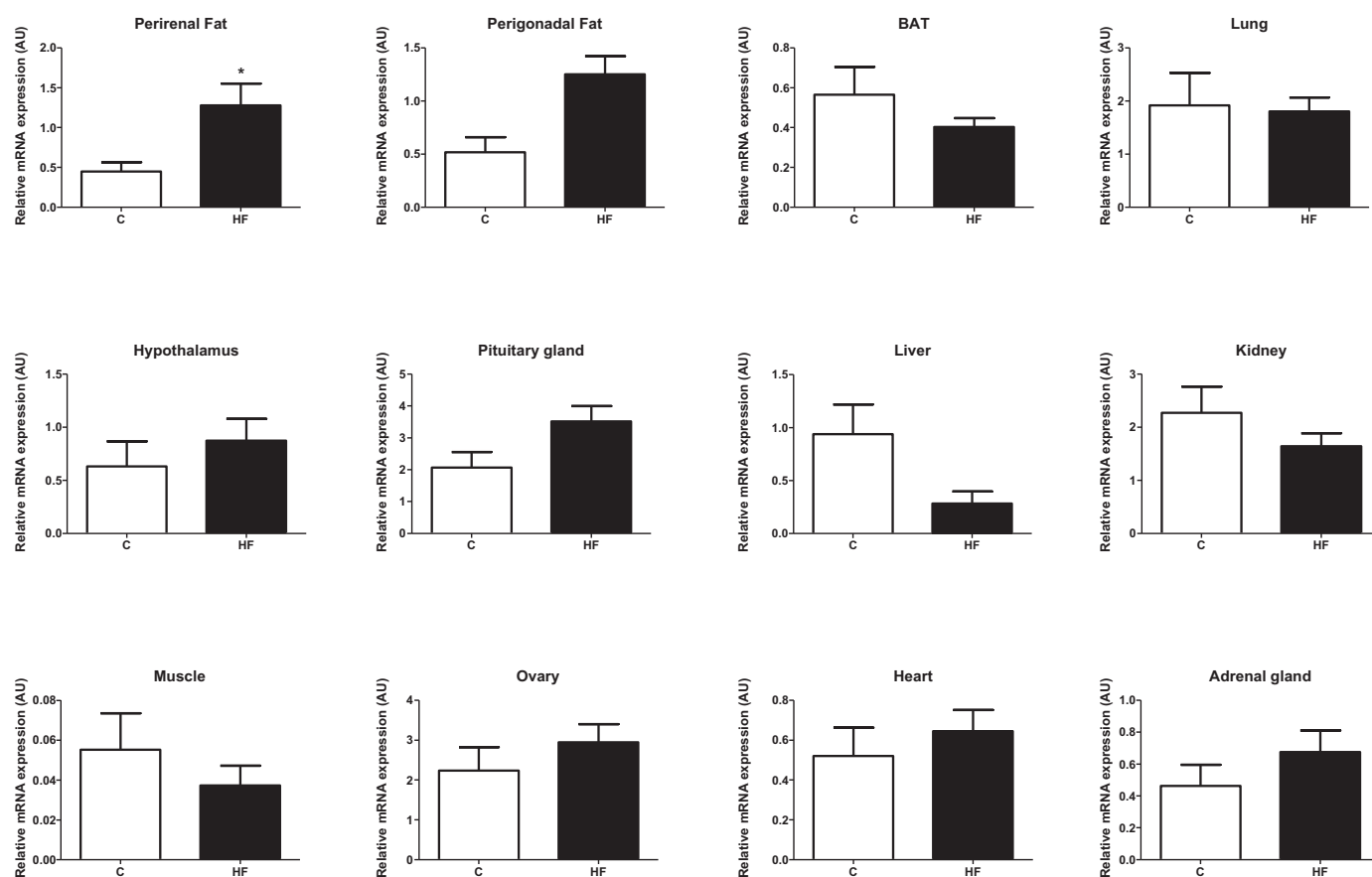


Fig. 7. Relative quantification by RT-qPCR analyses of APJ gene-expression level in 12-selected tissues of 36-week-old female mice fed with a control (C) or a high-fat (HF) diet. Values are means \pm S.E.M. ($n = 6-7$ animals/group). * $P < 0.05$ HF vs C group.

all the selected tissues with a slight more marked expression in lungs, kidneys and hypothalamus (Fig. 5A). For APJ, its mRNA was also found to be expressed in all the selected tissues, but a higher expression of this receptor was found in four tissues: lungs, kidneys, ovaries and pituitary gland (Fig. 5B). In a second experiment, we measured the effect of the high-fat diet on APL/APJ mRNAs expressions in these tissues. A 50% reduction of APL mRNAs ($P < 0.05$) was found in BAT and in kidneys of HF mice as well as a 75% reduction ($P < 0.05$) in liver (Fig. 6). For the receptor APJ, its gene expression was significantly increased (+160%, $P < 0.05$) in perirenal fat (Fig. 7). Although not significant, a tendency to an augmented expression was observed in perigonadal fat and a tendency to a reduction was noted in liver (Fig. 7). Finally, a significant reduction ($P < 0.05$) of apelin content was found in BAT of HF mice (Fig. 8A) whereas only a tendency to a decrease APL content was observed in their kidneys (Fig. 8B).

4. Discussion

The first aim of the present study was to investigate the apelinemia in female mice as, up to date; no data are available on the apelinergic system in female rodents. We first postulated that the apelinergic system may be sexually dimorphic in the mouse as the values of plasma APL concentrations found in healthy and lean men [4] were close to be doubled in healthy and lean women [7]. To explore this putative sexual dimorphism in the mouse, we

measured in 3-month-old male and female mice, the circadian plasma apelin variation and the effect of fasting on apelinemia. No significant differences were found for these parameters suggesting that, in the mouse, the apelinemia is not affected by the sex of the animal. Moreover, we did not find any modification of the apelinemia at rest during the four days of the estrous cycle suggesting an absence of implication of gonadal hormones in the regulation of plasma APL level in female mice. However, as estradiol was shown to increase apelin gene expression in bovine ovary follicles [36], a sex-specific regulation of apelin expression and probably of cellular action may occur into specific tissues. The origin of plasmatic apelin probably involves numerous tissues but the adipose tissue seems to be an important contributor to this phenomenon as significant higher plasma apelin level was reported in obese patients of both sexes in several studies [4,7,17]. In female mouse, we demonstrated in accordance with previous findings in males [23] that apelin gene is expressed in numerous organs and tissues including here the ovaries. In addition, it has also been described to be expressed in the uterus and mammary gland in female rodents [23,33]. The apelin receptor APJ gene is ubiquitously expressed but, in accordance with others studies [23,33], we demonstrated that some organs express high level of this receptor, *i.e.* lung, pituitary gland, kidneys and ovaries suggesting important physiological functions of the apelinergic system in these organs. Studies have shown that in the lung, apelin controls vascular plasticity and activity acting mainly on endothelial cells and smooth muscle of small pulmonary vessels

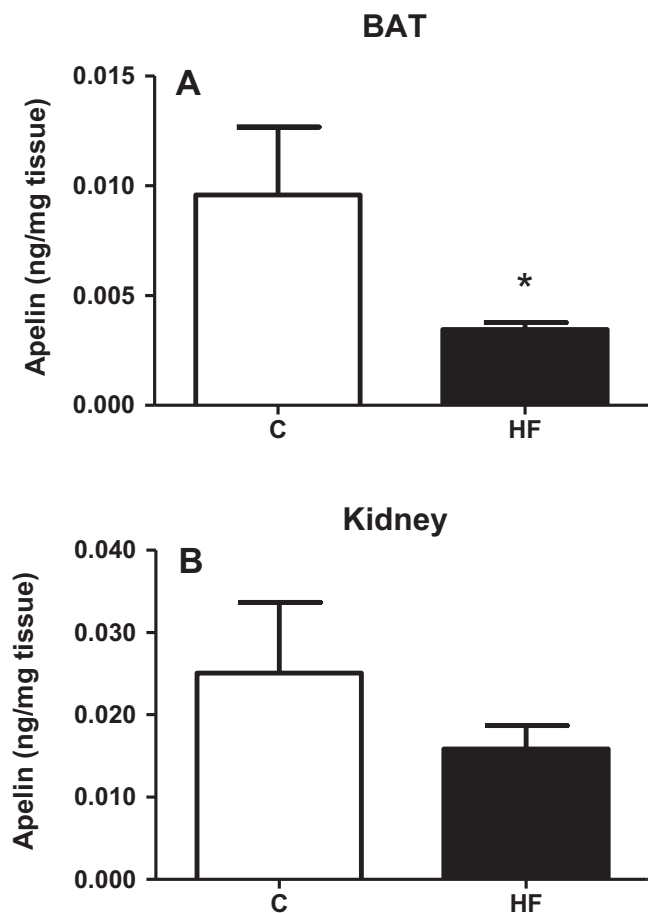


Fig. 8. Quantification of apelin content in BAT (A) and kidneys (B) of 36-week-old female mice fed with a control (C) or a high-fat (HF) diet. Values are means \pm S.E.M. ($n = 6-7$ animals/group). * $P < 0.05$ HF vs C group.

[16,32]. Recently, the pulmonary APL/APJ system has been implicated in beneficial or pathological effects during hypoxia exposure [8,44]. In the rat pituitary gland, apelin was shown to be expressed mainly in the anterior pituitary and located in corticotrophs and to a much lower extent in somatotrophs [34]. At this level, *in vivo* and *ex vivo* experiments have clearly demonstrated that apelin stimulates ACTH release through autocrine/paracrine actions [34]. In the kidney, the inner strip of outer medulla contains the highest level of APJ mRNA [20]. As this region is implicated in the balance of water and sodium of the body, it has been proposed that apelin may modulate tubular functions to exert its well described diuretic effects in addition to inhibit pituitary arginine vasopressin (AVP) release [28]. Finally, in ovary, the apelinergic system has been studied only in bovine [36,37]. In this specie, the APL/APJ system is involved in angiogenesis and cellular apoptosis processes that take place during follicle maturation and corpora lutea formation.

The second aim of this study was to evaluate tissue-specific alterations of the APL/APJ system expression in obese and insulin-resistant mice fed with a high-fat diet during 28 weeks. Surprisingly, in 36-week-old HF female mice, an absence of augmented basal plasma apelin concentration was found after fasting although such augmentation has been previously reported in fasted-obese HF male mice [5,14] and in obese men and women [4,7,17]. In obese and insulin-resistant male mice, it was demonstrated that HF diet altered drastically the circadian plasma apelin variation [14]. In addition, these authors also showed that, in control male mice,

plasma apelin level is modulated by the nutritional state of animals, *i.e.* fed vs fasted state [14]. Thus, we can postulate that in HF female mice, the circadian rhythm of apelin secretion may be altered. Such alteration may explain, in the present study, the absence of significant elevation of plasma apelin in fasted-obese mice at time of sampling. Alternatively, we cannot rule out that in mouse, females may have a different physiological regulation of plasma apelin level than males under obesity and insulin-resistance conditions. Additional studies are needed to clarify these hypotheses. We selected in this study, 12 tissues expressing the APL/APJ dyad to explore specific tissular dysfunctions of the apelinergic system under obesity and insulin-resistance states as the majority of available studies have been focused on a single tissue. Using mRNA quantification of both apelin and APJ, we found significant modifications of this system mainly in 3 tissues: the adipose tissue (white and brown), the liver and the kidney. In white adipose tissue (WAT), a tendency of increase apelin and APJ expression was found suggesting an augmented activity of this signaling system in obese and insulin-resistant females. Inversely, reduced expressions of this dyad as well as apelin content were found in brown adipose tissue (BAT). In human, apelin stimulates glucose uptake by adipose tissue [2] and, *in vitro*, recent data indicate that autocrine signaling of apelin in adipocytes inhibits adipogenesis of pre-adipocytes and lipolysis in mature adipocytes [42]. For brown adipose tissue (BAT), central infusion of apelin-13 was shown to increase BAT temperature and the activity of the sympathetic nerve activity innervating BAT in rat [29]. Similarly, in mouse, apelin treatment increased body temperature and oxygen consumption and regulated the expression of BAT uncoupling protein 1 (UCP1) expression in naive animals [18]. Altogether, our findings suggest that, in both white and brown adipose tissues, autocrine activity of the apelinergic signaling system may be disrupted during obesity and insulin-resistance conditions. In accordance with this hypothesis, a study has shown that the body fat mass increases in APKO mice (mice with generalized deficiency of apelin signaling) reinforcing the concept that this signaling system controls fat mass development [47]. A reduced hepatic expression of the APL/APJ dyad was found in obese and insulin-resistance female mice in the present study. In human, a marked activation of the APL/APJ system was described in several liver diseases such as biliary atresia [9] or cirrhosis [46], as well as, during angiogenic and fibroproliferative responses occurring in chronic liver pathologies [30]. Thus, we can postulate that in HF female mice, the reduced activity of the autocrine apelinergic signaling system may be a counter regulatory response to the development of liver alterations induced by HF diet and during the establishment of obesity and insulin-resistance states. Finally, similarly to hepatic modulations, a reduced expression of the apelinergic system was observed in the kidney of HF female mice. Accordingly, a recent study has reported a reduced renal APJ expression in diabetic mice [12] and has demonstrated that a short treatment with apelin is able to retard the progression of diabetic nephropathy in mouse. Altogether, these data suggest that the renal APL/APJ system may be altered by obesity and insulin-resistance states and thus could be implicated in the development of renal dysfunctions.

In conclusion, we demonstrate in mouse that the circulating level of apelin is not influenced by the sex of animals and by the day of the estrous cycle in females. In obese and insulin-resistant female mice, the apelinergic system is altered mainly in 3 tissues: the adipose tissue, the liver and the kidney. As it has been suggested that pharmacologic modulations of the autocrine APL/APJ signaling system may serve as a therapeutic target for obesity and type 2 diabetes, we propose that such treatment may particularly target the fat mass, the liver and kidneys and be of interest in the treatment of these organs in obese and diabetic subjects.

Funding

This work was supported by the French Ministry of Higher Education and Research.

Conflict of interest

The authors have nothing to declare.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. I. Fajardy for her assistance and A. Dive and M. Pottier for cares to animals (Département Hospitalo-Universitaire en Recherche Expérimentale).

References

- Ashley EA, Powers J, Chen M, Kundu R, Finsterbach T, Caffarelli A, et al. The endogenous peptide apelin potently improves cardiac contractility and reduces cardiac loading in vivo. *Cardiovasc Res* 2005;65:73–82.
- Attané C, Daviaud D, Dray C, Dusaulcy R, Masseboeuf M, Prévot D, et al. Apelin stimulates glucose uptake but not lipolysis in human adipose tissue ex vivo. *J Mol Endocrinol* 2011;46:21–8.
- Bai B, Tang J, Liu H, Chen J, Li Y, Song W. Apelin-13 induces ERK1/2 but not p38 MAPK activation through coupling of the human apelin receptor to the G_{i2} pathway. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008;40:311–8.
- Boucher J, Masri B, Daviaud D, Gesta S, Guigné C, Mazzucotelli A, et al. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 2005;146:1764–71.
- Castan-Laurell I, Dray C, Attané C, Duparc T, Knauf C, Valet P. Apelin, diabetes, and obesity. *Endocrine* 2011;40:1–9.
- Castan-Laurell I, Dray C, Knauf C, Kunduzova O, Valet P. Apelin, a promising target for type 2 diabetes treatment? *Trends Endocrinol Metab* 2012;23:234–41.
- Castan-Laurell I, Vítková M, Daviaud D, Dray C, Kováčiková M, Kovacova Z, et al. Effect of hypocaloric diet-induced weight loss in obese women on plasma apelin and adipose tissue expression of apelin and APJ. *Eur J Endocrinol* 2008;158:905–10.
- Chen S, Xue F, Jin HL, Chen L, Chen Y, Wang GF, et al. Effect of swimming exercise on the expression of apelin and its receptor in pulmonary tissues of rats with hypoxic pulmonary hypertension. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi* 2012;28:5–8.
- Chen W, Oue T, Ueno T, Uehara S, Usui N, Fukuzawa M. Apelin is a marker of the progression of liver fibrosis and portal hypertension in patients with biliary atresia. *Pediatr Surg Int* 2013;29:79–85.
- Clarke KJ, Whitaker KW, Reyes TM. Diminished metabolic responses to centrally-administered apelin-13 in diet-induced obese rats fed a high-fat diet. *J Neuroendocrinol* 2009;21:83–9.
- Cox CM, D'Agostino SL, Miller MK, Heimark RL, Krieg PA. Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Dev Biol* 2006;296:177–89.
- Day RT, Cavaglieri RC, Feliens D. Apelin retards the progression of diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013;304:F788–800. <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00306.2012>.
- Dray C, Knauf C, Daviaud D, Waget A, Boucher J, Buléon M, et al. Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 2008;8:437–45.
- Duparc T, Colom A, Cani PD, Massaly N, Rastrelli S, Drougard A, et al. Central apelin controls glucose homeostasis via a nitric oxide-dependent pathway in mice. *Antioxid Redox Signal* 2011;15:1477–96.
- Falcão-Pires I, Castro-Chaves P, Miranda-Silva D, Lourenço AP, Leite-Moreira AF. Physiological, pathological and potential therapeutic roles of adipokines. *Drug Discov Today* 2012;17:880–9.
- Fan XF, Wang Q, Mao SZ, Hu LG, Hong L, Tian LX, et al. Protective and therapeutic effect of apelin on chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi* 2010;26:9–12.
- Heinonen MV, Purhonen AK, Miettinen P, Pääkkönen M, Pirinen E, Alhava E, et al. Apelin, orexin-A and leptin plasma levels in morbid obesity and effect of gastric banding. *Regul Pept* 2005;130:7–13.
- Higuchi K, Masaki T, Gotoh K, Chiba S, Katsuragi I, Tanaka K, et al. Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology* 2007;148:2690–7.
- Hosoya M, Kawamata Y, Fukusumi S, Fujii R, Habata Y, Hinuma S, et al. Molecular and functional characteristics of APJ: tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J Biol Chem* 2000;275:21061–7.
- Hus-Citharel A, Bouby N, Frugiere A, Bodineau L, Gasc JM, Llorens-Cortes C. Effect of apelin on glomerular hemodynamic function in the rat kidney. *Kidney Int* 2008;74:486–94.
- Ivars J, Butruille L, Knauf C, Bouckenooghe T, Mayeur S, Vieau D, et al. Maternal hypertension induces tissue-specific modulations of the apelinergic system in the fetoplacental unit in rat. *Peptides* 2012;35:136–8.
- Japp AG, Cruden NL, Amer DA, Li VK, Goudie EB, Johnston NR, et al. Vascular effects of apelin in vivo in man. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:908–13.
- Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S, Hosoya M, Fujii R, Hinuma S, et al. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim Biophys Acta* 2001;1538:162–71.
- Kleinz MJ, Davenport AP. Emerging roles of apelin in biology and medicine. *Pharmacol Ther* 2005;107:198–211.
- Lee DK, George SR, O'Dowd BF. Unravelling the roles of the apelin system: prospective therapeutic applications in heart failure and obesity. *Trends Pharmacol* 2006;27:190–4.
- Li L, Yang G, Li Q, Tang Y, Yang M, Yang H, et al. Changes and relations of circulating visfatin, apelin, and resistin levels in normal, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetic subjects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006;114:544–8.
- Liu C, Su T, Li F, Li L, Qin X, Pan W, et al. PI3K/Akt signaling transduction pathway is involved in rat vascular smooth muscle cell proliferation induced by apelin-13. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2010;42:396–402.
- Llorens-Cortes C, Moos F. Apelin and vasopressin: two work better than one. *J Neuroendocrinol* 2012;24:1085–6.
- Masaki T, Yasuda T, Yoshimatsu H. Apelin-13 microinjection into the paraventricular nucleus increased sympathetic nerve activity innervating brown adipose tissue in rats. *Brain Res Bull* 2012;87:540–3.
- Melgar-Lesmes P, Pauta M, Reichenbach V, Casals G, Ros J, Bataller R, et al. Hypoxia and proinflammatory factors upregulate apelin receptor expression in human stellate cells and hepatocytes. *Gut* 2011;60:1404–11.
- O'Shea M, Hansen MJ, Tatemoto K, Morris MJ. Inhibitory effect of apelin-12 on nocturnal food intake in the rat. *Nutr Neurosci* 2003;6:163–7.
- Poirier O, Ciumas M, Eyries M, Montagne K, Nadaud S, Soubrier F. Inhibition of apelin expression by bmp signaling in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012;303:C1139–45. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00168.2012>.
- Pope GR, Roberts EM, Lolait SJ, O'Carroll AM. Central and peripheral apelin receptor distribution in the mouse: species differences with rat. *Peptides* 2012;33:139–48.
- Reaux-Le Goazigo A, Alvear-Perez R, Zizzari P, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT, Llorens-Cortes C. Cellular localization of apelin and its receptor in the anterior pituitary: evidence for a direct stimulatory action of apelin on ACTH release. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292:7–15.
- Reaux-Le Goazigo A, Bodineau L, De Mota N, Jeandel L, Chartrel N, Knauf C, et al. Apelin and the proopiomelanocortin system: a new regulatory pathway of hypothalamic α -MSH release. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;301:955–66.
- Schiffarth S, Antoni B, Schams D, Meyer HH, Berisha B. The expression of apelin and its receptor APJ during different physiological stages in the bovine ovary. *Int J Biol Sci* 2009;5:344–50.
- Shimizu T, Kosaka N, Murayama C, Tetsuka M, Miyamoto A. Apelin and APJ receptor expression in granulosa and theca cells during different stages of follicular development in the bovine ovary: Involvement of apoptosis and hormonal regulation. *Anim Reprod Sci* 2009;116:28–37.
- Siddiquee K, Hampton J, McAnally D, May LT, Smith LH. The apelin receptor inhibits the angiotensin II type 1 receptor via allosteric trans-inhibition. *Br J Pharmacol* 2013;168:1104–17. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02192>.
- Soriguer F, Garrido-Sanchez L, Garcia-Serrano S, Garcia-Almeida JM, Garcia-Arnes J, Tinahones FJ, et al. Apelin levels are increased in morbidly obese subjects with type 2 diabetes mellitus. *Obes Surg* 2009;19:1574–80.
- Sunter D, Hewson AK, Dickson SL. Intracerebroventricular injection of apelin-13 reduces food intake in the rat. *Neurosci Lett* 2003;353:1–4.
- Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, Kumaki I, Zhang W, Kumano K, et al. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept* 2001;99:87–92.
- Than A, Cheng Y, Foh LC, Leow MK, Lim SC, Chuah YJ, et al. Apelin inhibits adipogenesis and lipolysis through distinct molecular pathways. *Mol Cell Endocrinol* 2012;36:227–41.
- Valle A, Hoggard N, Adams AC, Roca P, Speakman JR. Chronic central administration of apelin-13 over 10 days increases food intake, body weight, locomotor activity and body temperature in C57BL/6 mice. *J Neuroendocrinol* 2008;20:79–84.
- Visser YP, Walther FJ, Laghmani el H, Laarse A, Wagenaar GT. Apelin attenuates hyperoxic lung and heart injury in neonatal rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:1239–50.
- Xu S, Han P, Huang M, Wu JC, Chang C, Tsao PS, et al. In vivo, ex vivo, and in vitro studies on apelin's effect on myocardial glucose uptake. *Peptides* 2012;37:320–6.
- Yokomori H, Oda M, Yoshimura K, Hibi T. Enhanced expressions of apelin on proliferative hepatic arterial capillaries in human cirrhotic liver. *Hepatol Res* 2012;42:508–14.
- Yue P, Jin H, Xu S, Aillaud M, Deng AC, Azuma J, et al. Apelin decreases lipolysis via G(q), G(i), and AMPK-dependent mechanisms. *Endocrinology* 2011;152:59–68.

Cortical Abnormalities and Non-Spatial Learning Deficits in a Mouse Model of CranioFrontoNasal Syndrome

Dina N. Arvanitis^{1,2}, Annie Behar^{1,2}, Anne Drougard^{2,4}, Pascal Roulet^{2,3}, Alice Davy^{1,2*}

1 Centre de Biologie du Développement, CNRS UMR5547, Toulouse, France, **2** Université de Toulouse UPS, Toulouse, France, **3** Centre de Recherche Sur la Cognition Animale, CNRS, Toulouse, France, **4** Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), INSERM, Toulouse, France

Abstract

Eph receptors and their ephrin ligands play critical roles in the development of the nervous system, however, less is known about their functions in the adult brain. Here, we investigated the function of ephrinB1, an ephrinB family member that is mutated in CranioFrontoNasal Syndrome. We show that ephrinB1 deficient mice (*EfnB1*^{Y/-}) demonstrate spared spatial learning and memory but exhibit exclusive impairment in non-spatial learning and memory tasks. We established that ephrinB1 does not control learning and memory through direct modulation of synaptic plasticity in adults, since it is not expressed in the adult brain. Rather we show that the cortex of *EfnB1*^{Y/-} mice displayed supernumerary neurons, with a particular increase in calretinin-positive interneurons. Further, the increased neuron number in *EfnB1*^{Y/-} mutants correlated with shorter dendritic arborization and decreased spine densities of cortical pyramidal neurons. Our findings indicate that ephrinB1 plays an important role in cortical maturation and that its loss has deleterious consequences on selective cognitive functions in the adult.

Citation: Arvanitis DN, Behar A, Drougard A, Roulet P, Davy A (2014) Cortical Abnormalities and Non-Spatial Learning Deficits in a Mouse Model of CranioFrontoNasal Syndrome. PLoS ONE 9(2): e88325. doi:10.1371/journal.pone.0088325

Editor: Barbara Bardoni, CNRS UMR7275, France

Received: September 9, 2013; **Accepted:** January 7, 2014; **Published:** February 10, 2014

Copyright: © 2014 Arvanitis et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by a Career Development Award from the Human Frontier Science Program Organization (<http://www.hfsp.org/>) and an ATIP from the CNRS (<http://www.cnrs.fr/>) both awarded to AD. DA was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (<http://www.frm.org/>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: alice.davy@univ-tlse3.fr

Introduction

Eph receptor/ephrin signaling is a cell-cell communication pathway that plays a crucial role in embryonic development [1], yet, increasing evidence shows a role for Eph/ephrin signaling in adult physiology [2]. There are two classes of Eph receptors and ephrins (A and B) and in the adult brain, both classes have been shown to control synaptic development and plasticity in the hippocampus [3,4,5,6,7]. To date, the EphB receptors and their ligands the ephrinBs have been implicated in hippocampal LTP and in spatial learning paradigms. For example, double and triple mutant mice lacking EphB1, EphB2, and EphB3 showed significant deficits in dendritic spine formation and clustering of AMPA and NMDA receptors [8]. EphrinB3 mutant mice have impairments in hippocampal mossy fibre LTP and in hippocampal-based learning tasks [9], while ephrinB2 conditional knockout mice showed severe deficits in both LTP and in long-term depression [10,11].

EphrinB1, which is the third member of the ephrinB family is expressed predominantly in apical progenitors in the developing cortex [12] where it has been shown to control the switch between progenitor maintenance and neuronal differentiation by regulating levels of miR-124, a pro-neuronal miRNA [13,14]. More recently we showed that ephrinB1 is required in cortical progenitors to maintain their apical adhesion thereby ensuring the structural integrity of the developing cortex [15]. Interestingly, ephrinB1 is encoded by *EfnB1*, an X-linked gene associated with the human CranioFrontoNasal Syndrome (CFNS) [16,17]. This syndrome is characterized by severe hypertelorism, frontonasal dysplasia,

craniosynostosis and developmental delays [18,19]. In contrast to ephrinB2 and ephrinB3, very little is known for the role of ephrinB1 in the adult brain. Previous work in cell culture has shown that ephrinB1 increases the number of dendritic spines on hippocampal rat neurons [20], regulates EphB-dependent presynaptic development on cortical rat neurons [21], and undergoes time-dependent up-regulation in lesion induced plasticity in the adult mouse hippocampus [22]. Collectively these findings suggest that ephrinB1 plays a role in synaptic development and plasticity, yet the role of ephrinB1 in cognitive function remains unknown.

Here we show that *EfnB1* deficient mice (*EfnB1*^{Y/-}) display normal learning and memory in spatial learning paradigms. No deficits in locomotion or anxiety were detected in *EfnB1*^{Y/-} mice; however, they exhibited a specific impairment in non-spatial learning and memory tasks. Given that we observed no impairment in spatial learning, which strongly implicates the hippocampus (reviewed in [23,24]) and rather observed learning impairments that are strongly associated with cortical functioning [25,26,27,28], emphasis was placed on analyzing the cortex, specifically the perirhinal cortex, in these mutants. Surprisingly, we established that ephrinB1 does not control learning and memory through modulation of synaptic plasticity in adults, since it is not expressed in the adult brain. Further scrutiny of the adult cortex of *EfnB1*^{Y/-} mice showed supernumerary neurons, with increased interneuron number, and decreased dendritic complexity in cortical pyramidal neurons as compared to wild-type (*EfnB1*^{Y/+}) littermates. Altogether, our findings indicate that the absence of ephrinB1 results in increased neuron numbers with changes in

dendritic morphology in the postnatal cortex that correlate with a selective learning and memory deficit.

Materials and Methods

Animals

Wild-type (WT : *EfnB1*^{+/+}), and mutant *EfnB1*^{1/-} male mice where generated as described [29] and kept in a mixed 129S4/C57BL/6J genetic background. Heterozygote females were crossed with *EfnB1*^{1/+} or *EfnB1*^{1/-} males to generate all genotypes. All animal procedures were approved by the Midi-Pyrénées Animal Experimentation Ethics Committee (MP/07/21/04/11).

Behavioural Testing

All experiments were performed during the light phase. Three- to 4-month old mice (n = 12 per genotype) were familiarized to the experimenter and mice were subject to two behavioral tasks; one non-stressing test (object recognition or object location) and one aversive task (Morris water maze, passive avoidance or fear conditioning). The order of experiments was pseudo randomized to avoid any influence of test order. Locomotor activity was analyzed during the 10 min familiarization phase of the object recognition or object location tasks. Anxiety was evaluated based on percent time spent in the open arms of the elevated plus maze.

Morris water maze. Spatial memory testing was conducted as described [30,31]. Briefly, mice were introduced to a circular pool (110 cm in diameter) filled with water made opaque. Subjects were trained to locate the hidden platform, which was submerged 0.5 cm below the water. One mass-training procedure was performed to unambiguously separate acquisition from consolidation processes. With this massed procedure, we have the same hippocampal involvement during acquisition and consolidation as found in the distributed procedure [32,33]. The procedure included one training session composed of 4 blocks, each consisting of three consecutive trials. The phase between consecutive blocks was 15 to 20 min long, during which the mouse was returned to its home cage. Twenty-four hours post acquisition, memory was assessed during a single one minute probe test in the absence of the platform.

Object recognition. The procedure consisted of three different phases as described [34]. Briefly, a familiarization phase in which each mouse was placed in the empty square open-field for 10 min. A sample phase, 24 h later, in which two identical metallic objects were placed in the middle of the open-field. A test phase, 24 h later whereby mice were reintroduced into the arena and exposed to two objects, a familiar object and a novel object, to test recognition memory. The percent time spent exploring the novel object was calculated as a preference index to measure novel object recognition. Performance in this non-spatial task, in contrast to the object location task, is not affected by hippocampal lesions [35,36] unless conducted in a complex spatial environment [36]. To avoid this bias, we used the original procedure described by Ennaceur and Delacour [35], which we have previously demonstrated does not require an intact hippocampus [37].

Object location. The same open-field with the same environment was used as that of the object recognition task. A similar procedure was employed except that one of the two identical objects was moved to a novel location [34]. The percent time spent exploring the displaced object was calculated as a preference index to measure spatial memory.

Fear conditioning. Mice were placed in the fear-conditioning apparatus chamber for 5 min and 30 sec. After a 2-min exploration period, a sound (CS) was emitted for 30 sec and a foot-shock of 0.7 mA (US) was superposed to the tone during the last

2 sec. After 2 min, the paired CS-US was repeated. Twenty four hours after conditioning, context-dependent freezing rate was measured in the conditioning chamber for 4 min. Three hours later, context-independent (tone dependent) freezing rate was measured. Specifically, mice were placed in a modified context; 2 min after their introduction in the modified chamber, mice received a 2-min tone presentation. Freezing rates to CS or US were calculated for *EfnB1*^{1/+} and *EfnB1*^{1/-} mice as described [38].

Passive avoidance. The apparatus consisted of a rectangular box divided into an illuminated safe compartment and a dark shock compartment. Subjects were individually placed into the illuminated compartment and when subjects entered completely inside the dark box, a foot shock (280 μ A for 2 sec) was administered. Subsequently, the mouse was placed in its home cage. Retention was measured 24 h later by placing the mouse in the light compartment and measuring the latency to enter the dark box.

Brain Sample Preparations

Four to five month old *EfnB1*^{1/+} and *EfnB1*^{1/-} mice month old mice, following behavioural testing, were anesthetized with an injection cocktail of 3:3:1 ketamine (100 mg/ml)/xylazine (20 mg/ml)/acepromazine (10 mg/ml) at a dose of 0.01 ml injection cocktail/g body weight and intra-cardially perfused with 0.9% saline followed by 4% formaldehyde in phosphate buffered saline (PBS). The dissected brains post-fixed in 4% PFA at 4°C. All sample brains were removed from PFA and either equilibrated in 70% ethanol and embedded in paraffin or equilibrated in sucrose and embedded in OCT blocks for cryostat sectioning. Alternatively, *EfnB1*^{1/+} and *EfnB1*^{1/-} mice, at specified ages were sacrificed by cervical dislocation and quickly weighed. The brains were removed, weighed and harvested in RNA Later® (Ambion) until use. Coronal sections (7 μ M) were obtained and placed on Superfrost microscope slides (Fisher Scientific) and stored at room temperature until use.

Cresyl Violet Staining

Multiple serial sections were Nissl-stained to provide a qualitative view of the cortical and hippocampal structures. The slides were immersed in 25°C cresyl violet for 10 min, washed vigorously in rapid exchanges of distilled water to remove the excess cresyl violet, dehydrated in graded ethanol, cleared in xylenes, and coverslipped. Images were acquired using a Nikon Eclipse 80i.

Immunohistochemistry

Sections used for immunohistochemistry were blocked in 3% goat serum in PBS. Primary antibodies were against ephrin-B1 (1:50, R&D Systems), NPY (1:5000, Sigma Aldrich), PV (1:5000, Swant), Calretinin (1:5000, Swant), NeuN (1:600, Millipore). Primary antibodies were visualized by secondary antibodies conjugated with Alexa (1:300, Jackson Immunoresearch), followed by nuclear counterstaining with Draq5 (Vector Labs) for quantification of total cell number. Images were acquired using a Confocal LEICA SP2 or LEICA SP5.

Neuronal Cell Counts

The mouse brain atlas was used to identify different regions of the cortex, hippocampus, amygdala and striatum. Serial coronal sections (7 μ m) were obtained. NeuN staining was performed on every 20th μ m -section from postnatal and adult brains (n = 3/ genotype/age). For quantification of cells, images were taken with a 40 \times objective using a confocal microscope (Leica SP2 or SP5).

Cell counts included all fully visible cells within the 100 μm^2 counting frame using the cell counter plugin for ImageJ. For each cortical area the number of NeuN+ cells was quantified in 3-nonoverlapping 100 μm^2 counting boxes starting at the pial surface. Emphasis was placed on sections containing perihinal cortex. For the hippocampal CA1 and CA3 a 100 μm^2 counting box was placed over each region and NeuN-positive cells were counted manually using the cell counter plug-in from ImageJ. For the amygdala two non-overlapping 100 μm^2 counting boxes were placed in the amygdala region at the level of 2.34 mm to 1.62 mm posterior to the interaural plane. For the striatum, four coronal sections at the level of 3.94 mm posterior to the interaural plane were analyzed. Three non-overlapping 100 μm^2 counting frames were placed vertically starting at the corpus callosum. Interneuron staining was performed on every 10th section between the interaural planes 3.10 mm to 1.10 mm ($n = 6/\text{genotype}$). A 100 μm^2 counting box was placed across three different counting regions of interest in the frontal, somatosensory or perirhinal cortices. Triplicate cell counts were performed in each region. Furthermore, the cortical thickness was measured as the shortest distance between the grey/white matter boundary and pial surface. Triplicate measurements were performed on 10 sections per sample; $n = 3$ per genotype.

Golgi Cox Impregnation

Brain tissues were removed and processed by Golgi-Cox staining, using procedures described previously [39]. Briefly, brains were first stored in the dark for 14 days in Golgi-Cox solution followed by 3 days in 30% sucrose. The brains were sectioned 200- μm thick on the coronal plane using a vibratome. Sections were collected on cleaned, gelatin-coated slides and stained in ammonium hydroxide for 30 min, followed by Kodak Fix for film for another 30 min and finally were washed with water, dehydrated, cleared and mounted using Permount (Fischer Scientific). Slides were coverslipped and allowed to dry before quantitative analysis. Several pyramidal neurons impregnated with the Golgi solution were readily identified in the cortex by their characteristic triangular soma shape and numerous dendritic spines. Four to five neurons per animal were reconstructed by ImageJ software. For spine quantification, a 100 \times oil-immersion objective was used to identify spines in dendrites longer than 10 μm . Quantification of the number of primary dendrites (defined as dendrites longer than 21 μm emanating directly from the soma) and total dendrites (defined as the amount of all dendritic branches) was done on images acquired with 25 \times objective, in which a circle was drawn around the cell body and the number of dendrites crossing each circle (primary dendrites) and the total branches were manually counted. Quantitative analysis for spines was performed using NeuronStudio and ImageJ in images acquired with 100 \times objective. The dendritic branching patterns were analyzed using Sholl's method of regularly spaced concentric circles centred on the neuronal soma [40]. The number of dendritic intersections crossing each 20 μm -radius circle progressively more distal from the soma was counted. For each of these parameters, an average was calculated for each animal. Means for the *EfnB1*^{+/+} and *EfnB1*^{+/−} groups were then obtained from these individual values. Spine densities were calculated as mean numbers of spines per micrometer per dendrite per neuron in individual mice per group.

Quantitative RT-PCR

RNA from embryonic and adult cortices was harvested in RNA Later[®] (Ambion) and total RNA was extracted using Trizol[®] (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Messen-

ger RNA expression was measured by qRT-PCR using a Bio-Rad thermo-cycler. Reverse transcription (RT) was performed using Superscript[®] III (Invitrogen) with 1 μg of total RNA per reaction. For the qRT-PCR reaction the resultant cDNA was diluted 1:1000. Each RT step was performed in duplicate and the qRT-PCR in triplicate for each RT reaction. RT-PCR was performed using SYBR Green JumpStart[™] (Sigma-Aldrich). Relative values were calculated by the 2- $\Delta\Delta\text{CT}$ method. Values were normalized to β -Actin or GAPDH mRNA levels. Results in adult tissues are standardized to *EfnB1* expression values at E16.5. Primer sequences were as follows:

*EfnB1*F:TGAAGGTTGGGCAAGATCC, R:GGTTCA-CAGTCTCATGCTTGC;

*EfnB1*F:GACAAGCTGGACATCATCTGC, R:GCCGCCCGCTGCTGTGT;

*EfnB1*F:TTGGCCAAGAACCCTGGAG, R:GCCCTTCCCACCTTAGGAAC.

*Actin*F:TCGACAACGGCTCCGGCAT, R:AAGGTGTGGTGCCAGATTTTC.

*Gapdh*F:TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC, R:CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC.

Note that different primer sequences for *EfnB1* were used to confirm expression levels in adult cortices.

Statistical Analysis

Mean, standard deviation and p values were calculated using Excel software. For behavioural analyses SYSTAT 11.0 statistical software was used. The results were analyzed using one or two-way ANOVAs, or a repeated measure ANOVA when appropriate. *Post-hoc* multiple comparisons were carried out when allowed, using Tukey's Honestly Significant Distance (HSD) test. Student t-test was performed to determine significant differences between samples. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. For dendritic complexity and spine density, the results are presented as mean \pm S.E.M. Statistical differences were determined by Student's t test for two-group comparisons.

Results

Spatial Memory is Unaffected in *EfnB1* Mutant Mice

The general behaviour of *EfnB1*^{+/−} mice is comparable to that of *EfnB1*^{+/+} mice, as we observed no significant differences in the level of locomotor activity or anxiety between *EfnB1*^{+/−} mice and control mice (Fig. 1A). Spatial learning and memory competences of *EfnB1*^{+/−} males were assessed using the Morris Water Maze (MWM). *EfnB1*^{+/+} and *EfnB1*^{+/−} mice performed equally during the acquisition phase (Fig. 1B) and during the probe test 24 h after acquisition (Fig. 1C). These findings demonstrate that *EfnB1*^{+/−} mice showed no deficits in spatial learning and memory as determined by the MWM.

To validate the notion that loss of ephrinB1 does not influence spatial memory, *EfnB1*^{+/+} and *EfnB1*^{+/−} male mice were further assessed in the object location task. During the retention phase, both *EfnB1*^{+/+} and *EfnB1*^{+/−} mice spent significantly more time exploring the displaced object, showing a preference index significantly different from chance level (50%; Fig. 1D). Therefore, our findings indicate that spatial learning and memory, which are hippocampus-dependent, were normal in absence of ephrinB1.

Non-spatial Memory Deficits in *EfnB1* Mutant Mice

We next studied non-spatial learning and memory competencies in *EfnB1*^{+/−} mice. In the object recognition test, mutant and control males spent an equal amount of time exploring the two identical objects during the training phase (data not shown).

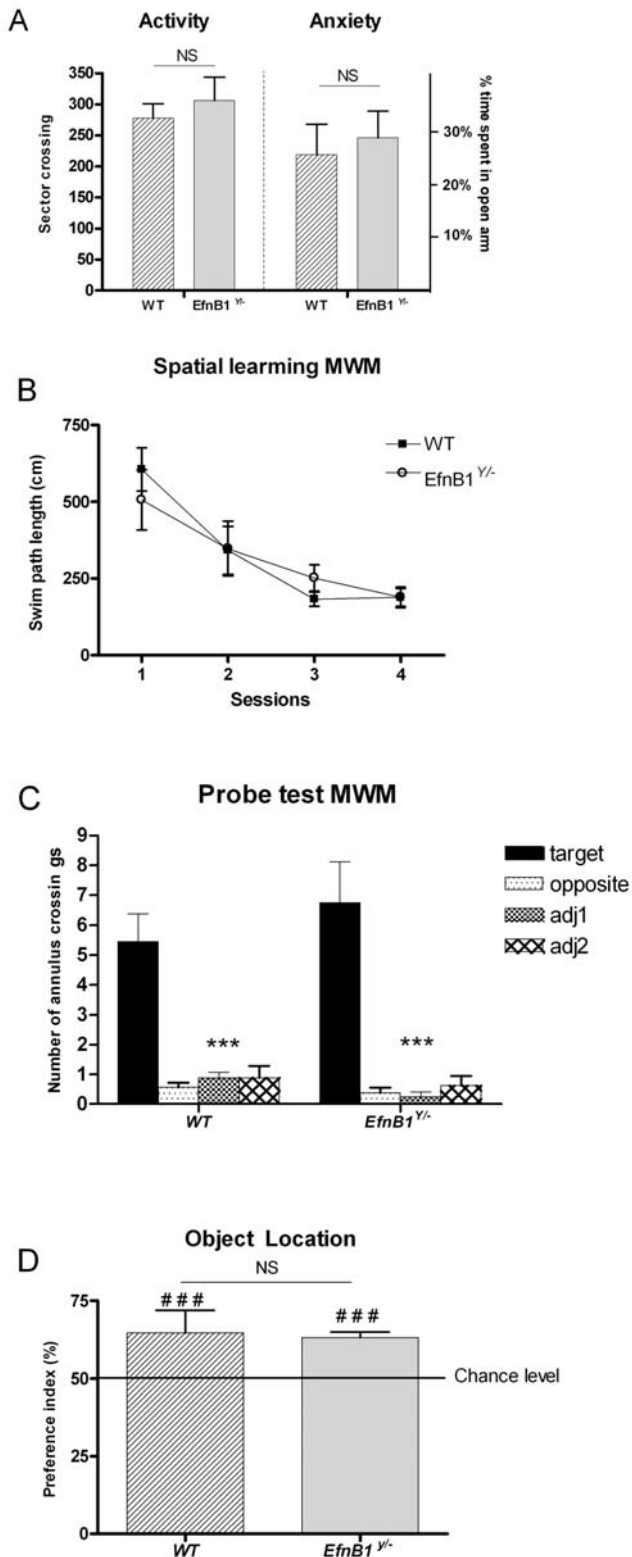


Figure 1. General behaviour and spatial memory are preserved in *EfnB1* mutant mice. A. Locomotor activity and anxiety levels in *EfnB1* mutant (*EfnB1*^{Y/Y}) mice as compared to control (WT) mice. B. Graph presenting swim path length as a function of individual training sessions (S1–S4). Throughout the training sessions, *EfnB1*^{Y/Y} mice learned equally well to locate the hidden platform and exhibited decreasing swim distances over blocks of trials ($F_{3,45} = 12.58$, $p < 0.001$). C. Number of annulus crossings during probe tests. All groups of mice

showed similar preference for the target zone where the platform was located during training sessions as compared to the adjacent (Adj1 and Adj2) and opposite zones (target vs others, $**p < 0.01$; $***p < 0.001$). D. Performances in the object location task are expressed as the group mean (\pm SEM) preference index. The horizontal line represents equal exploration of the two objects. *EfnB1*^{Y/Y} and WT mice presented the same level of reaction to the object displacement ($F_{1,17} = 0.139$, $p = 0.714$) and spent significantly more time exploring the displaced object than the non-displaced one ($###p < 0.001$; index vs chance level (50%)). NS: not significant.

doi:10.1371/journal.pone.0088325.g001

During the retention test *EfnB1*^{Y/Y} mice spent significantly more time exploring the novel object as opposed to the familiar one, so that the preference index was significantly different from chance level (50%). In contrast, the preference index for *EfnB1*^{Y/Y} mice was not different from chance level indicating that these animals were not able to recognize the novel object (Fig. 2A). These results suggest that *EfnB1*^{Y/Y} mice exhibited a non-spatial memory deficit. To further explore non-spatial learning and memory in *EfnB1* mutants, the subjects were examined in the passive avoidance and fear conditioning paradigms. In the passive avoidance paradigm, *EfnB1*^{Y/Y} mice exhibited shorter latencies to enter the dark chamber during the retention test than did the corresponding *EfnB1*^{Y/Y} controls (Fig. 2B) therefore indicating that mutant mice displayed a significant memory retention deficit in this aversive task. We further tested these mice in the fear conditioning paradigm. Interestingly, we found that *EfnB1*^{Y/Y} mice demonstrate impairments both in contextual and cued conditioning tests (Fig. 2C, D), thus the deficit is not specific to hippocampus-dependent (context) memories [41]. Altogether these findings indicate that loss of ephrinB1 leads to impairments in non-spatial learning and memory that preferentially implicate the cortex.

Behavioural Deficits Indirectly Correlate with EphrinB1 Function

To establish the neuroanatomical basis of the observed behavioural deficits in *EfnB1* mutants, we performed a histological analysis of adult brains from *EfnB1*^{Y/Y} and *EfnB1*^{Y/Y} mice. *EfnB1* mutants displayed similar brain:body mass indices compared to littermate controls (*EfnB1*^{Y/Y}: 0.211 ± 0.05 , *EfnB1*^{Y/Y}: 0.208 ± 0.07). The gross morphology of *EfnB1*^{Y/Y} brains was normal (Fig. 3A, B); however, 28% (4/14) mutants demonstrated a slight enlargement of the ventricles (Fig. 3B). We did not observe agenesis of the corpus callosum in *EfnB1*^{Y/Y} mice, even though it has been previously reported by others [42]. This discrepancy is likely due to the different genetic backgrounds of the mice under study.

The *EfnB1*^{Y/Y} mice displayed no deficit in any of the spatial learning paradigms that are known to strongly involve the hippocampus [23,24]; but rather showed impairment in non-spatial learning tasks that have been shown to be largely independent of hippocampal involvement but involve the cortex [35,36]. To better understand the putative role of ephrinB1 in non-spatial learning and memory, we performed immunohistochemical staining to establish the expression pattern of ephrinB1 in the adult brain. Surprisingly, we could not detect ephrinB1 in the adult WT cortex or in the adult WT hippocampus at the stage where behavioural studies were performed (Fig. 3). These findings indicate that the learning and memory deficit observed may be independent of ephrinB1 expression in the adult brain. To further assess the spatio-temporal expression pattern of ephrinB1 in the postnatal brain we performed qRT-PCR and immunohistochemical analyses and found that while ephrinB1 is expressed at P5 in the cortex, its levels decrease by P10 and it is no longer detected in the P15–P150 brain (Fig. 3E). Similar to our findings for the

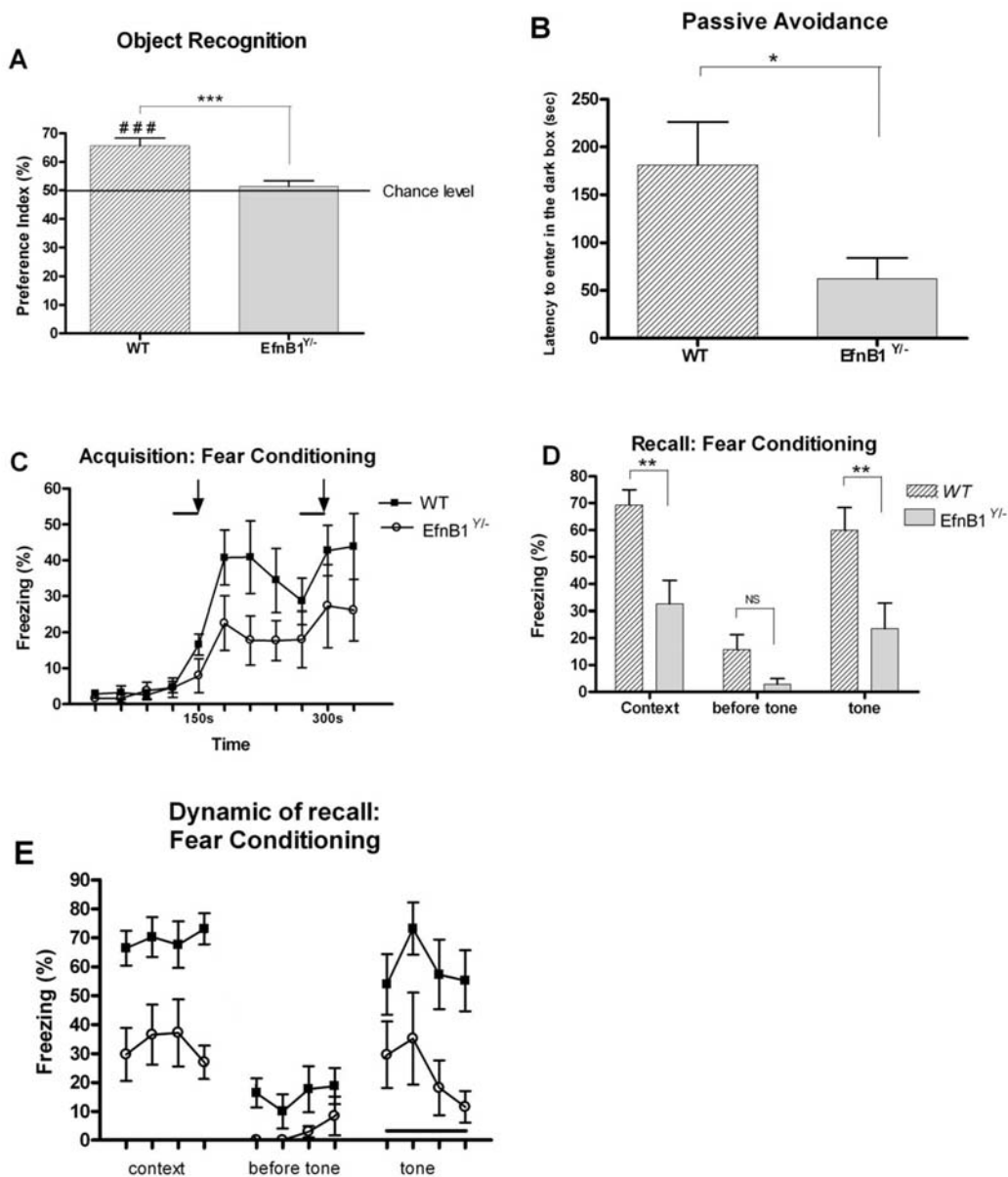


Figure 2. *EfnB1* mutant mice present a deficit in non-spatial memory. A. Performances in the object recognition task are expressed as the group mean (\pm SEM) preference index. The horizontal line represents equal exploration of the two objects. *EfnB1*^{Y-/-} male mice exhibited severe deficits in this task ($F_{1,14} = 17.890$ $p < 0.001$) and were not able to distinguish the new object. B. In the passive avoidance paradigm, *EfnB1*^{Y-/-} male mice exhibit decreased memory performance relative to wild-type littermates ($F_{1,15} = 6.002$ $p = 0.027$). C. Acquisition curve for the percentage freezing rate in the fear conditioning task. *EfnB1*^{Y-/-} mice in the 2 groups showed similar levels of freezing before the presentation of any tones ($F_{3,45} = 0.272$ $p = 0.845$). During the two tone presentation, the freezing performances are not different between the two groups (first tone: ($F_{1,15} = 2.282$ $p = 0.110$; second tone: $F_{1,15} = 1.472$ $p = 0.244$) and subsequent to the first tone presentation, all mice showed increased freezing ($F_{6,90} = 3.781$ $p = 0.002$). Even though lower levels of freezing behaviors were observed in *EfnB1*^{Y-/-} mice, this difference was not significant ($F_{1,15} = 3.48$ $p = 0.082$). Solid lines represent tone and arrows indicate the presentation of a foot shock D. 24 h following conditioning, male mutant mice were impaired in contextual fear conditioning ($F_{1,15} = 13.694$ $p = 0.002$) and in cued fear conditioning ($F_{1,15} = 7.921$ $p = 0.013$). E During the two tests, the dynamic of the freezing response is not different between the two groups indicating that the deficit in performances reflects more a global decrease in the quantity of freezing than a deficit in delayed recall (contextual: $F_{3,45} = 1.268$ $p = 0.297$; cued: $F_{3,45} = 0.636$ $p = 0.596$). ** $P < 0.01$. NS: not significant. doi:10.1371/journal.pone.0088325.g002

cortex, we found that ephrinB1 is expressed throughout the hippocampus in the early postnatal brain and not expressed in the adult (Fig. 3F, G). Therefore, ephrinB1 expression coincides with early postnatal brain maturation.

Supernumerary Neurons in the Cortex of Adult *EfnB1*^{Y-/-} Mutant

Given that ephrinB1 is not expressed in the adult brain we asked whether the cortex exhibited anomalies at the cellular level that may correlate with the non-spatial learning and memory deficit. We performed immunohistochemistry with the pan-neuronal marker (NeuN) at various postnatal stages and observed that

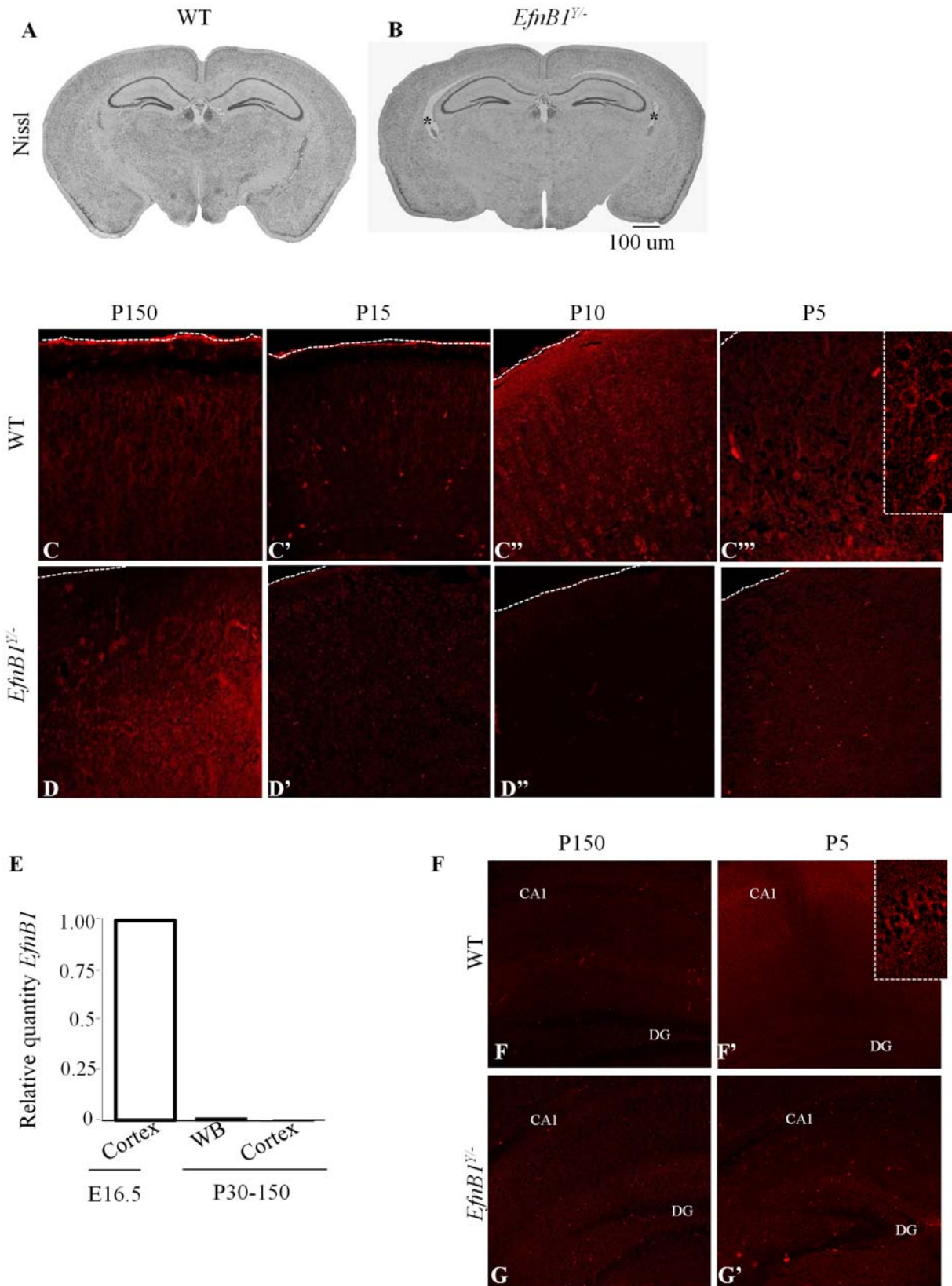


Figure 3. EphrinB1 is not expressed in the adult cortex. *A, B.* Representative coronal section of the brain from wild type (*A*) and *EfnB1* mutant (*B*) adult mice showing normal gross morphology of the brain. Both mutant and wild type brains have similar sizes. A slight enlargement of the ventricles was observed in some of the mutant brains (*B*, asterisks). *C–D''.* Immunohistochemistry for EphrinB1 at noted postnatal (P) dates in *EfnB1*^{Y/+} and *EfnB1*^{Y/-} cortices. EphrinB1 is not detected in *EfnB1*^{Y/+} adult cortices (*C*), rather strong, positive signals are observed at P5 (*C'''*) and decline by P15 (*C*) in *EfnB1*^{Y/+} samples. *E.* Quantitative RT-PCR of P30–150 whole brain (WB) extracts and cortical extracts were analysed for *EfnB1* expression and

compared to control embryonic (E) day 16.5 cortical extracts that express *EfnB1*. $n = 3/\text{age}$. F–G'. Immunohistochemistry for ephrinB1 in *EfnB1*^{+/+} and *EfnB1*^{-/-} hippocampi at P5 and P150. EphrinB1 is not detected in *EfnB1*^{+/+} adult hippocampi (F), but observed in the CA1 region at P5 (F'; inset). doi:10.1371/journal.pone.0088325.g003

starting at P10, a significantly greater number of NeuN positive cells were present in the cortex of *EfnB1*^{-/-} compared to *EfnB1*^{+/+} mice (Fig. 4A–C). This difference in neuron number was still present at p150, where counts were conducted in all cortical regions; the frontal cortex, the somatosensory 1 cortex (S1), the somatosensory 2 cortex (S2), and the perirhinal cortex (Phr). Importantly, this increase in cell number did not correlate with an increased thickness of the mutant cortex (Fig. 4D). To determine whether the increase in neuron number was specific to the cortex, we quantified NeuN positive cells in the striatum, amygdala and hippocampal CA1 and CA3 regions. We observed no statistical difference in NeuN positive cells in any of these structures in *EfnB1*^{-/-} compared to *EfnB1*^{+/+} mice (Fig. 4E). Altogether, these results indicate that loss of ephrinB1 leads to a postnatal increase in cortical neuron number.

Increased Interneuron Number in Adult *EfnB1*^{-/-} Mutants

Changes in interneuron numbers have been widely implicated in a number of cognitive deficits [43], therefore we quantified cortical interneuron populations including parvalbumin (PV+; Fig. 5A, B), calretinin (CR+; Fig. 5C, D), and neuropeptide Y (NPY+; Fig. 5E, F) interneurons in *EfnB1*^{+/+} and *EfnB1*^{-/-} mutants. Counts were conducted in all cortical regions; the frontal cortex, S1, S2, and Phr of *EfnB1*^{+/+} and *EfnB1*^{-/-} mice. Importantly, only the proportion of CR+ neurons, specifically in the S2 cortical region, was significantly increased in absence of ephrinB1 (Fig. 5G).

Decreased Dendritic Arborisation and Synaptic Density in *EfnB1* Mutants

We next sought to determine whether changes in neuronal number correlated with modification of synaptic contacts in the cortex of *EfnB1*^{-/-} mice. The dendritic complexity of the layer II/III pyramidal neurons from three different regions of the mouse cortex: the frontal cortex, S1, S2, and Phr cortical neurons was analysed in adult *EfnB1*^{+/+} and *EfnB1*^{-/-} mice (Fig. 6A, B). Sholl analysis showed a significant difference in the number of intersections at longer distances from the cell soma (Fig. 6C). Further, the dendritic branching of neurons from *EfnB1*^{-/-} mice was less complex than that observed in *EfnB1*^{+/+} animals. Moreover, the majority of dendritic intersections in the cortex of *EfnB1*^{-/-} mice were found proximal to the soma, at a distance of ~20–50 μm compared to *EfnB1*^{+/+} (Fig. 6C). Quantitative morphological analysis of neurons in the cortex of *EfnB1*^{+/+} and *EfnB1*^{-/-} mice showed that the length of dendritic branches was significantly reduced in *EfnB1*^{-/-} samples (88 $\mu\text{m} \pm 12$) compared to *EfnB1*^{+/+} controls (125 $\mu\text{m} \pm 7$) (Fig. 6D). In addition, we observed varicosities on dendrites from *EfnB1*^{-/-} samples (Fig. 6B, F) that are not seen in *EfnB1*^{+/+} controls (Fig. 6E). Dendritic spines were then analyzed on the basilar tree of the pyramidal neurons. The number of morphologically distinct dendritic spines on the basilar tree of cortical layer II/III pyramidal neurons was significantly different between *EfnB1*^{+/+} and *EfnB1*^{-/-} samples (Fig. 6E, F). Long, thin spines were prevalent on dendritic varicosities of neurons from *EfnB1*^{-/-} mice (Fig. 6F). Analysis of spine morphology revealed that neurons in *EfnB1*^{-/-} cortices have a significantly higher number of thin spines and reduced numbers of mushroom or stubby shaped spines compared to neurons in *EfnB1*^{+/+} controls (Fig. 6G). Analysis of the total number of spines

along a dendrite showed fewer spines throughout the entire length of the basal dendrites of neurons from *EfnB1*^{-/-} samples (Fig. 6H).

Discussion

Here we show that loss of ephrinB1 leads to specific cognitive deficits in adult mice. *EfnB1* deficient mice exhibit defects in non-spatial learning and memory but performed equally to the *EfnB1*^{+/+} controls in all spatial learning tasks. Strikingly, while mutant mice were able to detect spatial differences in the object location task, all subjects showed impairment in the object recognition task. Mutant mice also displayed a significant memory retention deficit in the passive avoidance task and in the fear conditioning paradigm. While ephrinBs were recently implicated in neuropathic pain responses [44], we found no difference in the response of wild type and *EfnB1* mutant mice to the shock in the fear conditioning experiment, indicating that all subjects were able to sense pain in these learning paradigms. These findings demonstrate that the absence of ephrinB1 does not lead to a general cognitive impairment, but rather to a highly selective deficit. To the best of our knowledge, this is a type of cognitive phenotype affecting specifically non-spatial learning and memory has not been reported to date.

Non-spatial learning and memory employs a number of different structures including cortical regions such as the entorhinal and perirhinal cortices, sub-cortical structures such as the amygdala and striatum, and occasionally the hippocampus [45,46]. Using a number of different learning paradigms with distinctive methodologies, we aimed to identify the most probable brain structure impaired in absence of ephrinB1. For example, the cortex, amygdala and striatum are involved in passive avoidance [46] and fear conditioning [27,28,47,48] and so are potential candidate structures to explain the performance deficit in *EfnB1* mutant mice. However, the striatum and amygdala are not implicated in the object recognition task suggesting that a different structure may be involved in the behavioural deficits observed in our mutant mice. The non-spatial learning tasks are not completely independent of hippocampal functioning as these tests are conducted in a specific context. It is possible, however, to reduce hippocampal involvement by reducing the complexity of the contextual environment [36]. For this reason, we used the object recognition task with the simplest possible context; the passive avoidance task was performed with a very small light chamber in a dark experimental room; and the fear conditioning task employed two different procedures, one in the same context and the second in a different context. As we obtained a deficit in all these procedures, this strongly suggested that the deficit is not context dependant and therefore is independent of hippocampal functioning. Given that the *EfnB1* mutant mice displayed no impairment in either of the spatial learning paradigms employed, which strongly involve the hippocampus, we concluded that the most likely structure implicated in learning and memory deficit in *EfnB1* mutants is the cortex and we thus focused our neuroanatomical analyses on the cortex.

Interestingly, we could not detect ephrinB1 expression in the adult cortex or hippocampus at the time the behaviour studies were performed. While an earlier study has shown widespread diffuse ephrinB1 expression in adult brain in mice [49], we show here, using the *EfnB1* knockout mouse line as a control, that ephrinB1 is not expressed in the adult cortex or hippocampus.

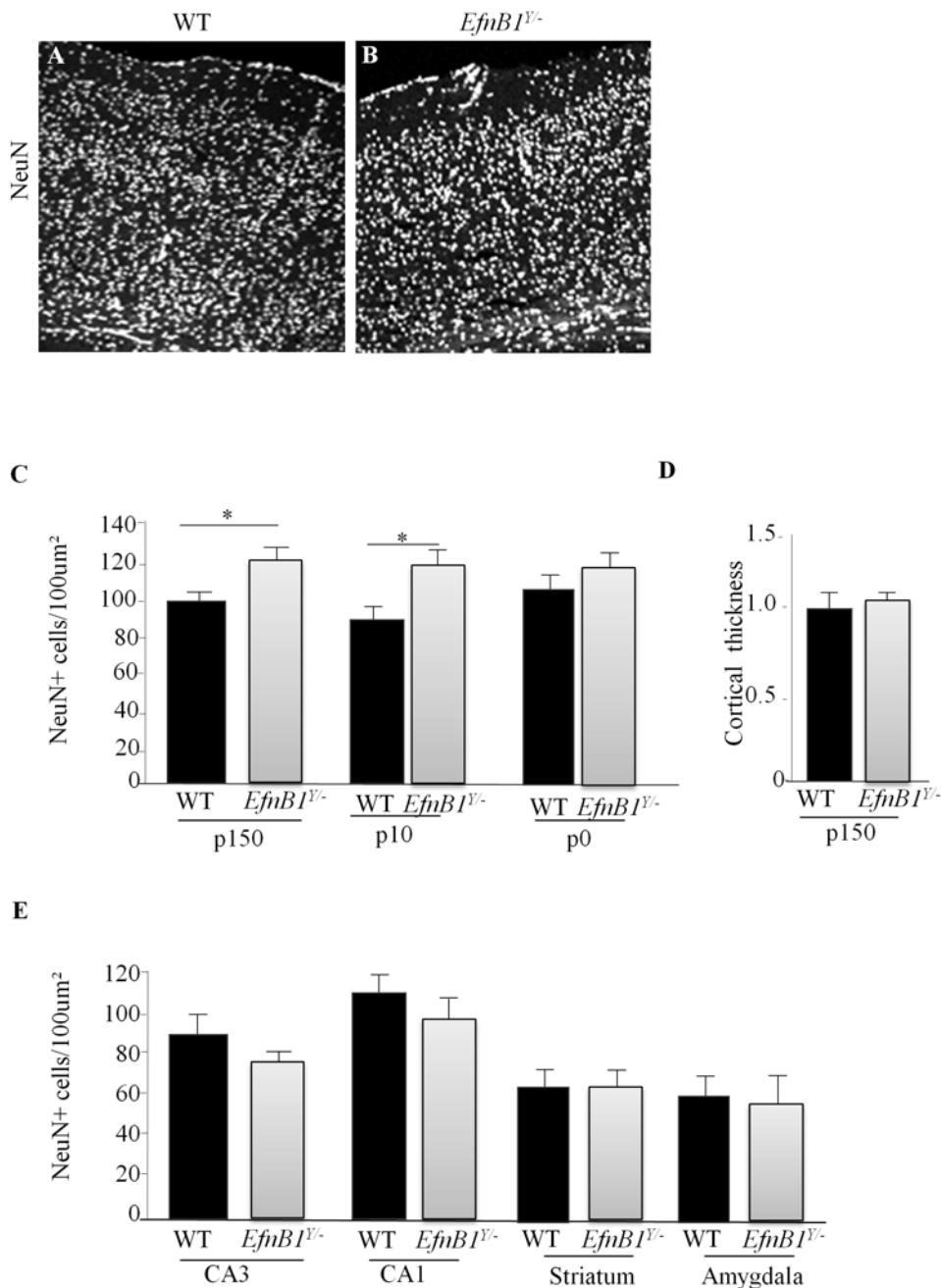


Figure 4. Changes in cell number in *EfnB1* mutant cortices. A, B. Representative images of cortical sections from *EfnB1*^{Y/Y+} (WT; A) and *EfnB1*^{Y/Y-} (B) mice at P150 stained for NeuN. Shown are areas of the frontal cortex. C. Quantification of NeuN stained cells demonstrating an increase in NeuN-positive cells in P150 *EfnB1*^{Y/Y-} mice, P10 *EfnB1*^{Y/Y-} mice and not at P0 stages. * $p < 0.05$. D. Ratio of cortical thickness in *EfnB1*^{Y/Y-} mice as compared to controls. E. Quantification of NeuN positive cells in the CA3 and CA1 region of the hippocampus, and in the striatum and amygdala in P150 *EfnB1*^{Y/Y+} and *EfnB1*^{Y/Y-} mice.

doi:10.1371/journal.pone.0088325.g004

Therefore our findings suggest that ephrinB1 does not control learning and memory through direct modulation of synaptic transmission or synaptic plasticity, but instead plays a role in postnatal cortical maturation. Given that ephrinB2 and ephrinB3 have been shown to directly modulate hippocampal synaptic plasticity and learning and memory [50,51], our findings show that ephrinB1 impacts learning and memory through a mechanism that is distinct from other ephrins. Further analyses of *EfnB1*^{Y/Y-} adult brain showed a significant increase in the number

of neurons only in the cortex of *EfnB1*^{Y/Y-} mice. The increase in the number of neurons was traced to a postnatal event since neuron numbers were not significantly different between wild type and *EfnB1* mutant mice at birth (P0). How loss of ephrinB1 leads to an increased number of cortical neurons is unknown, yet the timing of appearance of this phenotype is suggestive of a decrease in programmed neuronal cell death that normally takes place in the cortex around P5. A number of studies have shown a potential role for Eph receptors and ephrins in brain region specific

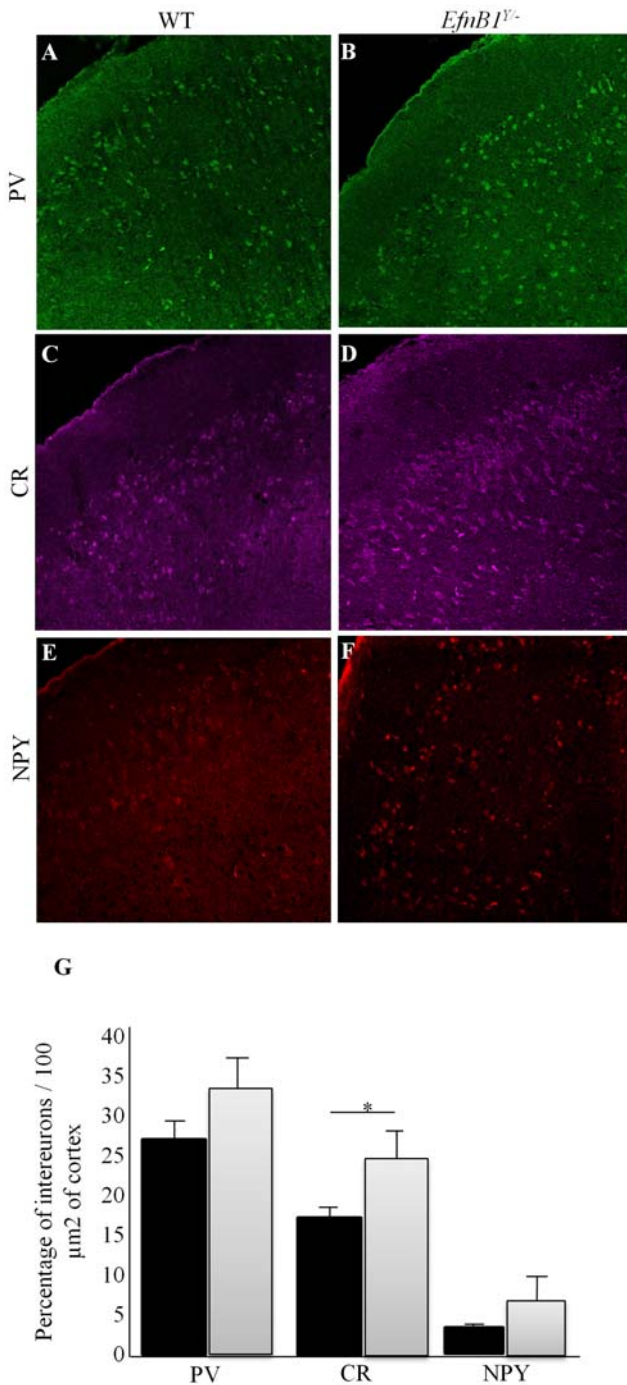


Figure 5. Increased interneuron number in adult *EfnB1*^{-/-} mutants. A–F. Representative immunofluorescent images of *EfnB1*^{+/+} (A, C, E) and *EfnB1*^{-/-} (B, D, F) mutant somatosensory S2 cortices stained for PV (A, B), CR (C, D) and NPY (E, F). The percent of interneuron numbers per 100 micro(μ)m² is shown for the S2 region of *EfnB1*^{+/+} versus *EfnB1*^{-/-} samples. G. We observed an overall increase in PV+, CR+ and NPY+ neurons in *EfnB1*^{-/-} mutants as compared to *EfnB1*^{+/+} in all cortical regions studied. A significant increase was detected for CR+ neurons in the *EfnB1*^{-/-} S2 cortical region. * p < 0.05. doi:10.1371/journal.pone.0088325.g005

apoptosis (reviewed in [52]). Previous work has linked EphA/ephrinA signalling to the control of cell number in the developing brain, via a direct effect on survival of embryonic neural

progenitors [53]. While these studies all show a role for Eph/ephrin signaling on apoptosis of neural progenitors, this is the first report to show that a member of the Eph/ephrin family, ephrinB1, is important to control neuron number in the postnatal cerebral cortex. Future work is required to understand the role of ephrinB1 in this apoptotic molecular cascade. Interestingly we noted no difference in cortical thickness from *EfnB1*^{+/+} and *EfnB1*^{-/-} cortices despite changes in cortical neuron numbers. This finding suggests that neuronal packing may be changed in absence of ephrinB1.

In correlation with the increased neuronal numbers, we found aberrant dendritic morphology and arborisation, along with a significant decrease in spine density on pyramidal cortical neurons in *EfnB1*^{-/-} cortices. This reduced branching of the neurons from *EfnB1*^{-/-} mice could explain the maintenance of cortical thickness in *EfnB1*^{-/-} mice despite changes in cortical neuron numbers. Whether reduced branching is a consequence of increased neuron numbers is currently unknown. Neurons from *EfnB1*^{-/-} mice displayed dendritic varicosities, a peculiarity seen in some cases of infantile neurobehavioral failure, in addition to a number of progressive neurodegenerative disorders including Huntington's disease frontal lobe dementia and Alzheimer's disease (reviewed in [54]). The cause of the varicosities is not well known, yet varicosities are related to dendritic spine dysgenesis and loss. Closer scrutiny of dendritic spines revealed a significantly higher number of thin spines on neurons in *EfnB1*^{-/-} mutants with reduced mushroom or stubby shaped spines. Spines form a variety of shapes and sizes that correlate with their synaptic strength, motility, and structural plasticity [55]. Evidence shows that thin spines are abundant in the early postnatal brain and undergo refinement to promote dendritic spine maturation and synapse/dendrite stability [2,54]. Previous studies have shown that stimulation of cultured neurons with soluble recombinant ephrinB1 protein induces dendritic spine formation and maturation [20,56]. These findings suggest a direct role of ephrinB1 in spine maturation and suggest that the abundance of thin spines in *EfnB1*^{-/-} cortices could be a manifestation for the privation of postnatal spine maturation in the absence of ephrinB1. An increase in thin spines has been associated with several hereditary forms of intellectual disability, and is often observed for many genes that underlie X-linked intellectual disability [57]. It is thus possible that the defective architectural structuring of synaptic connections in *EfnB1*^{-/-} cortical pyramidal neurons underlies cognitive impairment of these mutants. Alternatively, changes in the number of CR+ cells have been reported in various disorders [58], and we have observed an alteration of the CR+ interneuron subtype in the somatosensory cortex of *EfnB1* mutant mice. To date the functional properties of CR+ interneurons have been primarily studied in the hippocampus where they are responsible in synchronizing dendritic inhibitory cells [59] to regulate input information into principal neurons [60]. Why CR+ interneurons were increased specifically in the S2 cortical region of *EfnB1*^{-/-} mutants and whether this increase contributes to the behavioural impairment observed in these mice remains unknown. Overall our findings suggest that in the absence of ephrinB1, postnatal neuronal cell death does not occur normally, thus leading to imbalance between neuronal subtypes and to improper maturation of dendritic arbors.

Mutations in *EfnB1* are associated with a human syndrome called CranioFrontoNasal Syndrome (CFNS) [16,17]. CFNS is a rare X-linked disorder that shows paradoxically greater severity of craniofacial abnormalities in heterozygous females than in hemizygous males. This is due to the fact that these abnormalities are exacerbated by cellular mosaicism due to random X-

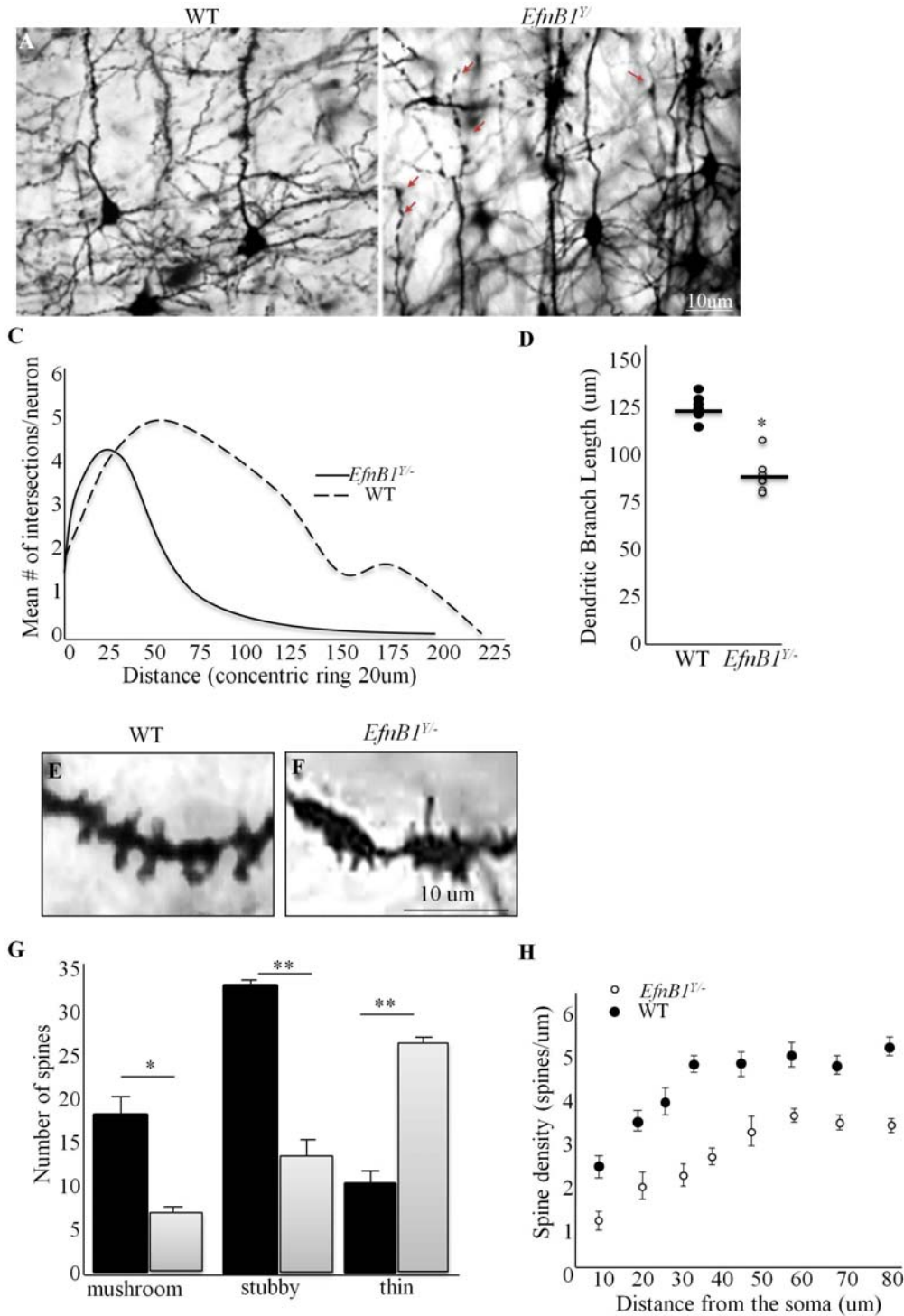


Figure 6. Comprised dendritic arbors in ephrinB1 mutant cortical pyramidal cells. A, B. Representative photomicrographs of golgi-cox impregnated S2 pyramidal neurons from *EfnB1*^{Y+/+} (A) and *EfnB1*^{Y-/-} (B) cortices. Note the presence of dendritic varicosities on dendrites from *EfnB1*^{Y-/-} samples (arrows). C. Sholl analysis of the structure of dendritic arbors. Mean number of dendritic intersections of layer II/III cortical pyramidal neurons show a significant decrease in the number of intersections in pyramidal neurons from *EfnB1*^{Y-/-} cortex at longer distances from the cell soma. Note that majority of dendritic intersections in *EfnB1*^{Y-/-} cortex were found proximal to the soma, at a distance of ~20–50 μm compared to *EfnB1*^{Y+/+} cortex. D. Quantitative analysis of dendritic branch length shows a statistically significant decrease in the branch length of pyramidal neurons from *EfnB1*^{Y-/-} samples compared to controls (*EfnB1*^{Y+/+} = 125 μm ± 7; *EfnB1*^{Y-/-} = 88 μm ± 12; p < 0.01). E, F. Higher magnified photomicrographs of *EfnB1*^{Y+/+} (E) and *EfnB1*^{Y-/-} (F) pyramidal neurons in the S2 field. Note the varicosities in dendrites from *EfnB1*^{Y-/-} samples. G. Quantitative analysis of the number of morphologically different spines on the basal tree of cortical layer II/III pyramidal neurons in *EfnB1*^{Y+/+} and *EfnB1*^{Y-/-} samples. A significantly higher number of thin spines are observed on neurons from *EfnB1*^{Y-/-} mice. H. Analysis of the total density of spines along a dendrite showed fewer spines throughout the entire length of the basal dendrites. Each dot represents 4–5 neurons per individual. n = 5/genotype. * p < 0.05, ** p < 0.001. doi:10.1371/journal.pone.0088325.g006

inactivation in female patients. This peculiar feature of CFNS is also observed in mice, since heterozygous females present more penetrant and generally stronger -yet similar- phenotypes than hemizygous males [61,62]. To date there is only sporadic information on the cognitive capacity of CFNS male or female patients; however, our study suggests that this syndrome may share a number of characteristic features with other neurodevelopmental disorders. Interestingly, cortical anomalies observed in *EfnB1*^{+/−} mutants also partially resemble those seen in genetic models for Fragile-X Syndrome, which exhibit a striking inhibitory/excitatory synapse imbalance and disrupted synaptic contacts [63]. Altogether, our findings demonstrate that ephrinB1 is involved in cortical maturation and in non-spatial learning and memory.

References

- Klein R (2012) Eph/ephrin signalling during development. *Development* 139: 4105–4109.
- Pasquale EB (2008) Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* 133: 38–52.
- Murai KK, Nguyen LN, Iric F, Yamaguchi Y, Pasquale EB (2003) Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nat Neurosci* 6: 153–160.
- Xu NJ, Sun S, Gibson JR, Henkemeyer M (2011) A dual shaping mechanism for postsynaptic ephrin-B3 as a receptor that sculpts dendrites and synapses. *Nat Neurosci* 14: 1421–1429.
- Hruska M, Dalva MB (2012) Ephrin regulation of synapse formation, function and plasticity. *Mol Cell Neurosci* 50: 35–44.
- Klein R (2009) Bidirectional modulation of synaptic functions by Eph/ephrin signaling. *Nat Neurosci* 12: 15–20.
- Nishimura T, Yamaguchi T, Tokunaga A, Hara A, Hamaguchi T, et al. (2006) Role of numb in dendritic spine development with a Cdc42 GEF intersectin and EphB2. *Mol Biol Cell* 17: 1273–1285.
- Henkemeyer M, Itkis OS, Ngo M, Hickmott PW, Ethell IM (2003) Multiple EphB receptor tyrosine kinases shape dendritic spines in the hippocampus. *J Cell Biol* 163: 1313–1326.
- Rodenas-Ruano A, Perez-Pinzon MA, Green EJ, Henkemeyer M, Liebl DJ (2006) Distinct roles for ephrinB3 in the formation and function of hippocampal synapses. *Dev Biol* 292: 34–45.
- Grunwald IC, Korte M, Adelmann G, Plueck A, Kullander K, et al. (2004) Hippocampal plasticity requires postsynaptic ephrinBs. *Nat Neurosci* 7: 33–40.
- Bouzioukh F, Wilkinson GA, Adelmann G, Frotscher M, Stein V, et al. (2007) Tyrosine phosphorylation sites in ephrinB2 are required for hippocampal long-term potentiation but not long-term depression. *J Neurosci* 27: 11279–11288.
- Stuckmann I, Weigmann A, Shevchenko A, Mann M, Huttner WB (2001) Ephrin B1 is expressed on neuroepithelial cells in correlation with neocortical neurogenesis. *J Neurosci* 21: 2726–2737.
- Brun VH, Leutgeb S, Wu HQ, Schwarcz R, Witter MP, et al. (2008) Impaired spatial representation in CA1 after lesion of direct input from entorhinal cortex. *Neuron* 57: 290–302.
- Arvanitis DN, Jungas T, Behar A, Davy A (2010) Ephrin-B1 reverse signaling controls a posttranscriptional feedback mechanism via miR-124. *Mol Cell Biol* 30: 2508–2517.
- Arvanitis DN, Behar A, Tryocn-Toth P, Bush JO, Jungas T, et al. (2013) Ephrin B1 maintains apical adhesion of neural progenitors. *Development* 140: 2082–2092.
- Wieland I, Jacubiczka S, Muschke P, Cohen M, Thiele H, et al. (2004) Mutations of the ephrin-B1 gene cause craniofrontonasal syndrome. *Am J Hum Genet* 74: 1209–1215.
- Twigg SRF, Kan R, Babbs C, Bochukova EG, Robertson SP, et al. (2004) Mutations of ephrin-B1 (EFNB1), a marker of tissue boundary, cause craniofrontonasal syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8652–8657.
- Twigg SR, Kan R, Babbs C, Bochukova EG, Robertson SP, et al. (2004) Mutations of ephrin-B1 (EFNB1), a marker of tissue boundary formation, cause craniofrontonasal syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8652–8657.
- Wieland I, Weidner C, Ciccone R, Lapi E, McDonald-McGinn D, et al. (2007) Contiguous gene deletions involving EFNB1, OPHN1, PJA1 and EDA in patients with craniofrontonasal syndrome. *Clin Genet* 72: 506–516.
- Ethell IM, Ethell DW (2007) Matrix metalloproteinases in brain development and remodeling: synaptic functions and targets. *J Neurosci Res* 85: 2813–2823.
- McClelland AC, Sheffler-Collins SI, Kayser MS, Dalva MB (2009) Ephrin-B1 and ephrin-B2 mediate EphB-dependent presynaptic development via syntenin-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 20487–20492.
- Wang Y, Ying GX, Liu X, Wang WY, Dong JH, et al. (2005) Induction of ephrin-B1 and EphB receptors during denervation-induced plasticity in the adult mouse hippocampus. *Eur J Neurosci* 21: 2336–2346.
- Mizumori SJ, Ragozzino KE, Cooper BG, Leutgeb S (1999) Hippocampal representational organization and spatial context. *Hippocampus* 9: 444–451.
- Kesner RP (2007) Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. *Learn Mem* 14: 771–781.
- Ennaceur A, Neave N, Aggleton JP (1996) Neurotoxic lesions of the perirhinal cortex do not mimic the behavioural effects of fornix transection in the rat. *Behav Brain Res* 80: 9–25.
- Tassoni G, Lorenzini CA, Baldi E, Sacchetti B, Bucherelli C (1999) A peculiar pattern of temporal involvement of rat perirhinal cortex in memory processing. *Behav Neurosci* 113: 1161–1169.
- Corodimas KP, LeDoux JE (1995) Disruptive effects of posttraining perirhinal cortex lesions on conditioned fear: contributions of contextual cues. *Behav Neurosci* 109: 613–619.
- Bucci DJ, Phillips RG, Burwell RD (2000) Contributions of postrhinal and perirhinal cortex to contextual information processing. *Behav Neurosci* 114: 882–894.
- Davy A, Aubin J, Soriano P (2004) EphrinB1 forward and reverse signaling are required during mouse development. *Genes Dev* 18: 572–583.
- Sargolini F, Florian C, Oliverio A, Mele A, Roullet P (2003) Differential involvement of NMDA and AMPA receptors within the nucleus accumbens in consolidation of information necessary for place navigation and guidance strategy of mice. *Learn Mem* 10: 285–292.
- Florian C, Roullet P (2004) Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice. *Behav Brain Res* 154: 365–374.
- Florian C, Roullet P (2004) Hippocampal CA3-region is crucial for acquisition and memory consolidation in Morris water maze task in mice. *Behav Brain Res* 154: 365–374.
- Artinian J, De Jaeger X, Fellini L, de Saint Blanquat P, Roullet P (2007) Reactivation with a simple exposure to the experimental environment is sufficient to induce reconsolidation requiring protein synthesis in the hippocampal CA3 region in mice. *Hippocampus* 17: 181–191.
- Goodman T, Trouche S, Massou I, Verret L, Zerwas M, et al. (2010) Young hippocampal neurons are critical for recent and remote spatial memory in adult mice. *Neuroscience* 171: 769–778.
- Ennaceur A, Neave N, Aggleton JP (1997) Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Exp Brain Res* 113: 509–519.
- Winters BD, Forwood SE, Cowell RA, Saksida LM, Bussey TJ (2004) Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. *J Neurosci* 24: 5901–5908.
- Stupien G, Florian C, Roullet P (2003) Involvement of the hippocampal CA3-region in acquisition and in memory consolidation of spatial but not in object information in mice. *Neurobiol Learn Mem* 80: 32–41.
- Daumas S, Halley H, Francés B, Lassalle JM (2005) Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions. *Learn Mem* 12: 375–382.
- Paul B, Soon KH, Dunne J, De Pasquale CG (2008) Diagnostic and prognostic significance of plasma N-terminal-pro-brain natriuretic peptide in decompensated heart failure with preserved ejection fraction. *Heart Lung Circ* 17: 497–501.
- Sholl DA (1953) Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* 87: 387–406.
- Gerlai R (2001) Behavioral tests of hippocampal function: simple paradigms complex problems. *Behav Brain Res* 125: 269–277.
- Bush JO, Soriano P (2009) Ephrin-B1 regulates axon guidance by reverse signaling through a PDZ-dependent mechanism. *Genes Dev* 23: 1586–1599.
- van Kleunen M, Manning JC, Pasqualetto V, Johnson SD (2008) Phylogenetically independent associations between autonomous self-fertilization and plant invasiveness. *Am Nat* 171: 195–201.
- Song XJ, Zheng JH, Cao JL, Liu WT, Song XS, et al. (2008) EphrinB-EphB receptor signaling contributes to neuropathic pain by regulating neural excitability and spinal synaptic plasticity in rats. *Pain* 139: 168–180.

Acknowledgments

We are grateful to Brice Ronsin and Aurélie Leru for their help with confocal microscopy (Imaging Core Facility, IFR 109). We thank the ABC animal facility and ANEXPLO for housing mice. We thank our laboratory colleagues for critical reading of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DA PR A. Davy. Performed the experiments: DA AB A. Drougard. Analyzed the data: DA AB A. Drougard PR A. Davy. Wrote the paper: DA PR A. Davy.

45. Maren S, Anagnostaras SG, Fanselow MS (1998) The startled seahorse: is the hippocampus necessary for contextual fear conditioning? *Trends Cogn Sci* 2: 39–42.
46. Riobos AS, Martin Garcia AI (1987) Open field activity and passive avoidance responses in rats after lesion of the central amygdaloid nucleus by electrocoagulation and ibotenic acid. *Physiol Behav* 39: 715–720.
47. LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23: 155–184.
48. White NM, Salinas JA (2003) Mnemonic functions of dorsal striatum and hippocampus in aversive conditioning. *Behav Brain Res* 142: 99–107.
49. Errico F, Santini E, Migliarini S, Borgkvist A, Centonze D, et al. (2008) The GTP-binding protein Rhes modulates dopamine signalling in striatal medium spiny neurons. *Mol Cell Neurosci* 37: 335–345.
50. Martinez A, Otal R, Sieber BA, Ibanez C, Soriano E (2005) Disruption of ephrin-A/EphA binding alters synaptogenesis and neural connectivity in the hippocampus. *Neuroscience* 135: 451–461.
51. Noberini R, Koolpe M, Peddibhotla S, Dahl R, Su Y, et al. (2008) Small molecules can selectively inhibit ephrin binding to the EphA4 and EphA2 receptors. *J Biol Chem* 283: 29461–29472.
52. Park S (2013) Brain-Region Specific Apoptosis Triggered by Eph/ephrin Signaling. *Exp Neurobiol* 22: 143–148.
53. Depaepe V, Suarez-Gonzalez N, Dufour A, Passante L, Gorski JA, et al. (2005) Ephrin signalling controls brain size by regulating apoptosis of neural progenitors. *Nature* 435: 1244–1250.
54. Fiala JC, Spacek J, Harris KM (2002) Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Brain Res Rev* 39: 29–54.
55. Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K (2002) Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol* 64: 313–353.
56. Simon AM, de Maturana RL, Ricobaraza A, Escribano L, Schiapparelli L, et al. (2009) Early changes in hippocampal Eph receptors precede the onset of memory decline in mouse models of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 17: 773–786.
57. Arikath J (2009) Regulation of dendrite and spine morphogenesis and plasticity by catenins. *Mol Neurobiol* 40: 46–54.
58. Barinka F, Druga R (2010) Calretinin expression in the mammalian neocortex: a review. *Physiol Res* 59: 665–677.
59. Gulyas AI, Hajos N, Freund TF (1996) Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *J Neurosci* 16: 3397–3411.
60. Miles R, Toth K, Gulyas AI, Hajos N, Freund TF (1996) Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* 16: 815–823.
61. Compagni A, Logan M, Klein R, Adams RH (2003) Control of skeletal patterning by ephrinB1-EphB interactions. *Dev Cell* 5: 217–230.
62. Davy A, Aubin J, Soriano P (2004) Ephrin-B1 forward and reverse signaling are required during mouse development. *Genes Dev* 18: 572–583.
63. Paluszkiwicz SM, Martin BS, Huntsman MM (2011) Fragile X syndrome: the GABAergic system and circuit dysfunction. *Dev Neurosci* 33: 349–364.

Personal pdf file for
C. Knauf, A. Drougard, A. Fournel, T. Duparc, P. Valet

With compliments of Georg Thieme Verlag

www.thieme.de

Hypothalamic Actions of Apelin on Energy Metabolism: New Insight on Glucose Homeostasis and Metabolic Disorders

DOI 10.1055/s-0033-1351321
Horm Metab Res 2013; 45: 928–934

For personal use only.
No commercial use, no depositing in repositories.

Publisher and Copyright
© 2013 by
Georg Thieme Verlag KG
Rüdigerstraße 14
70469 Stuttgart
ISSN 0018-5043

Reprint with the
permission by
the publisher only

 **Thieme**

Hypothalamic Actions of Apelin on Energy Metabolism: New Insight on Glucose Homeostasis and Metabolic Disorders

Authors

C. Knauf^{1,2}, A. Drougard^{1,2}, A. Fournel^{1,2}, T. Duparc³, P. Valet^{1,2}

Affiliations

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

²UPS, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Université Paul Sabatier, France

³Metabolism and Nutrition Research Group, Louvain Drug Research Institute, Université catholique de Louvain, LDRI, Brussels, Belgium

Key words

- apelin
- glucose metabolism
- hypothalamus
- type 2 diabetes
- obesity

Abstract

Hypothalamus is key area implicated in control of glucose homeostasis. This structure integrates nervous and peripheral informations to adapt a response modifying peripheral glucose utilization and maintaining energetic balance. Among peripheral signals, adipokines such as adiponectin and leptin are of special importance since deregulations of their actions are closely associated to metabolic disorders such as obesity and type 2 diabetes. During the past ten years, we have identified a new adipokine named apelin which has emerging role in the control of metabolism. The originality of the apelinergic system is to be largely represented in peripheral tissues

(adipose tissue, intestine, etc.) and in the brain. Then, apelin is released by adipose tissue as all adipokines, but also present another crucial role as neurotransmitter in hypothalamic neurons. By acting in the whole body, apelin exerts pleiotropic actions and is now considered as a major determinant of physiological functions. Besides its general beneficial effects on peripheral targets, central action of apelin remains still a matter of debate. In this review, we have made a parallel between peripheral vs. central actions of apelin in term of signalization and effects. Then, we have focused our attention on hypothalamic apelin and its potential role in glucose metabolism and associated pathologies.

Introduction

An alteration of the maintenance of energy balance, and particularly glucose homeostasis, can lead to metabolic disorders including obesity and type 2 diabetes. In this complex system, which includes hormonal and nervous regulation, the hypothalamus plays a major role as a center of integration of various nervous and peripheral signals including nutrients, afferent nerves and adipokines such as leptin and adiponectin. Recently, we have identified the role of an adipokine, apelin, which has the originality to be expressed in hypothalamic neurons. Thus, apelin can exert multiple peripheral and central actions, which have large consequences on numerous physiological functions and associated pathologies. This review focuses on the role of apelin, which binds to its receptor APJ, and especially on its implication in the control of energy metabolism by targeting the hypothalamus.

Apelin and the Apelin Receptor

APJ receptor

In 1998, Tatemoto et al. discovered the peptide binding the orphan APJ receptor and named it apelin (for APJ Endogenous Ligand) [1]. The APJ receptor is a G-protein-coupled receptor (GPCR) identified in 1993 in humans [2]. The specificity of this receptor is a close sequence homology with the type 1 angiotensin II receptor. However, APJ does not bind the angiotensin II. The gene encoding this receptor is located on the locus q22 of chromosome 11 and its RNA transcripts are found first in several brain areas. Hypothalamus contains the highest density of APJ transcripts and more particularly in the paraventricular (PVN), supraoptic (SON) and arcuate nuclei (ARC) [3,4]. Labeling of APJ is also found in extrahypothalamic structures such as cortex, pineal gland, olfactory bulb, dentate gyrus and choroid plexus [3]. On peripheral tissues, lungs and thyroid express strongly APJ as insulin-responsive tissue like adipose tissue, skeletal muscles, heart, and at lower level in the liver [5,6].

received 26.04.2013
accepted 08.07.2013

Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1351321>

Published online:

August 15, 2013

Horm Metab Res 2013;
45: 928–934

© Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York
ISSN 0018-5043

Correspondence

C. Knauf
INSERM U1048 – I2MC
Bat L4, 1 Avenue Jean Poulhès
CHU Rangueil BP 84225
31432 Toulouse Cedex 4
France
Tel.: +33/5/6132 5635
Fax: +33/5/6132 5623
claude.knauf@inserm.fr

Apelin

The human apelin gene is localized on the chromosome Xq25-q26.1 [7]. It encodes a 77-amino acid polypeptide with a secretory signal sequence and called preproapelin. Then, this precursor is cleaved by endopeptidases into proapelin (55 amino acid) and into various biologically active forms whose the predominant molecular forms are apelin-13, -17 and -36 [6]. Apelin is a peptide, originally extracted from bovine stomach tissue [1], which presents the originality to be expressed widely in the whole body, and in the brain [8,9] supporting a role as a hormone and a neurotransmitter. Similar to APJ, apelin isoforms are expressed in many brains regions including thalamus, hippocampus, midbrain, pineal gland, frontal cortex, and in the magnocellular neurons of hypothalamus areas such as preoptic area, periventricular, ventromedial, and dorsomedial nuclei [7] suggesting pleiotropic actions in physiology and/or physiopathology. Apelin isoforms are also expressed in many peripheral tissues [10] like heart [11], kidney [12], lung [6], mammary gland [6], and adipose tissue [8]. Predominant molecular forms in the hypothalamus and in the plasma are apelin-13 and apelin-36 [6] whereas Pyr(1)-apelin-13 seems to be the major form present in the heart [11]. This pyroglutamine residue offers a better protection and higher resistance for apelin to enzymatic degradation. For this reason, Pyr(1)-apelin-13 has been largely used to study in vivo or in vitro responses [13]. In fact, apelin has a short circulating half-life and can also be degraded by the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) [14].

Apelin/APJ signaling pathway

APJ is a GPCR, which could be internalized by the recruitment of β -arrestins leading to its desensitization. Apelin-13 and apelin-36 differ in receptor binding affinity and in their ability to affect the intracellular trafficking. Apelin-13 has greater affinity and potency for the APJ than apelin-36 [5]. Moreover, the apelin-13-internalized receptor is rapidly recycled to the cell surface through a Rab4-dependent mechanism while the apelin-36-internalized receptor is associated with β -arrestin1 and then is targeted for degradation in lysosomes by Rab7 [15]. Thus, the apelinergic system presents another originality since a single receptor (APJ) can be differentially trafficked as a result of activation by multiple isoforms of the same ligand. As a result, many data from literature suggest that the couple APJ/apelin is involved in many signaling pathways. APJ is preferentially coupled to Gi protein, and consequently apelin is able to 1) inhibit adenylyl cyclase, generating lower rise in cAMP [16] and 2) activate extracellular-regulated kinase (ERKs), more particularly induces p42 and p44 phosphorylation by a Protein Kinase C (PKC) dependent-pathway [17]. Apelin/APJ is also able to phosphorylate p70S6 kinase from activation of 2 signaling cascades implicating PI3 kinase and ERK, respectively, which are linked to a different pattern of p70S6K phosphorylation [18]. Via the implementation of signaling cascades implicating PI3 kinase, apelin can also activate phospholipase C (PLC) as mediator largely involved in the regulation of energetic metabolism such as endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) [19], AMPK [20] and Akt [21].

Physiological effects of apelin on peripheral tissues

Through these different signaling pathways, apelinergic system is involved in several physiological mechanisms. At the cellular level, apelin/APJ is implicated in the proliferation of endothelial progenitors during the formation of cardiovascular system, but also in the control of immune system with anti-inflammatory

effect on activated T lymphocytes [22]. In the same way, apelin stimulates endothelial cell proliferation and especially retinal angiogenesis [23] since apelin-knockout mice have a retardation of retinal vascular development [24]. This emerging vascular role of apelin seems to imply this molecule as a therapeutic target in cancer [25]. At the tissue level, apelin is involved in the regulation of cardiovascular system by an action on blood vessels and on heart. In fact, apelin generates a decrease of blood pressure via nitric oxide (NO) pathway [26] but also an increase of cardiac contractility [27]. Apelin has a cardioprotective role against oxidative stress and apoptosis [28,29] evidenced by low plasma levels measured in patient with cardiac pathologies [30]. This dual effect, direct and indirect, opens perspectives in treatment of cardiovascular diseases. Another preferential peripheral target of apelin is the digestive tract. Intestinal apelin stimulates gastric cell proliferation [31], duodenal bicarbonate secretion, enteric cholecystokinin release [32], and gastric acid secretion [33]. More recently, our group showed that glucose specifically promotes Pyr(1)-apelin-13 secretion in the intestine leading to increased glucose absorption by an AMPK-dependent mechanism [34].

Specific peripheral actions of apelin on energy metabolism

Metabolic disorders are characterized by multiple phenotypic alterations reflected by 2 known pathologies, that is, obesity and type 2 diabetes. Type 2 diabetes is commonly described as a pathology with various symptoms including hyperglycemia, hyperinsulinemia, and insulin resistance, which refers to a state where physiological concentrations of insulin are poorly effective [35]. This pathological state is strongly linked to obesity and it is characterized by an impairment to respond to high levels of insulin.

Adipocytes produce and secrete adipokines. Disruption of their global actions can influence the emergence of type 2 diabetes [36]. We have demonstrated in 2005 that apelin is not only produced but also secreted by adipocytes showing that apelin belongs to the family of adipokines [8]. Reinforcing the concept is shown in human since plasma levels are expressed at a concentration close to picomolar, consistent with the range of a circulating hormone. Apelin release is strongly related to insulin since it has been shown that its injection decrease insulin levels in vivo and in vitro [37], while insulin treatment on cultured adipocytes generates an increase of apelin expression and secretion [38]. Among the adipokines produced and secreted by adipocytes, apelin is considered as a promising target for treating metabolic disorders. In the peripheral organs, increased secretion and expression of apelin in different mouse models of obesity and obese subjects is strongly associated with insulin regulation. We demonstrated that apelin produced by the peripheral organs is considered beneficial with antidiabetic properties and represents a promising target for managing insulin resistance. Acute intravenous injection of apelin in normal mice has shown a powerful glucose-lowering effect by stimulating glucose utilization in skeletal muscle via eNOS, AMPK, and Akt-dependent pathways. Apelin restored glucose tolerance and increased glucose utilization in skeletal muscle and adipose tissue in obese and insulin-resistant mice fed a high-fat diet. Two weeks of chronic apelin treatment in insulin-resistant mice was shown to improve insulin sensitivity [39]. The role of apelin in glucose homeostasis has been confirmed in apelin knockout mice that have decreased insulin sensitivity [39]. Apelin improves also lipid metabolism by a decrease of adiposity,

serum levels of triglycerides and an increase of energy expenditure by brown adipose tissue (BAT) activity [40]. Moreover, chronic apelin treatment optimizes muscle mitochondrial performance through increased mitochondrial biogenesis and a tighter matching between fatty acid oxidation and the tricarboxylic acid cycle [41]. More recently, we demonstrated the specific relationships between the gut microbiota, which regulates glucose metabolism [42,43], and regulation of the apelinergic system in the adipose tissue [44]. Indeed, we showed that apelin/APJ expression was upregulated by the bacteria-derived compounds lipopolysaccharides in pathological situations such as metabolic diseases.

The originality of apelin is that it can act as an adipokine, but also as a neurotransmitter secreted by neurons in the central nervous system (CNS). In the context of T2D, apelin levels are increased in the plasma of human and mice [8,45] but also in the hypothalamus of mice [46]. As opposed to peripheral effect [20], central mechanisms of apelin action on glucose homeostasis are not totally elucidated, and will be developed in the next part of this review.

Apelin and the Brain



Physiological effect on the brain

As previously described, apelin and its receptor APJ are expressed in different areas of CNS. APJ/Apelin is abundantly expressed in the oligodendrocytes and neurons in human and at lower levels in astrocytes [47]. At the opposite, APJ was not expressed in microglia in the spinal cord [48]. This distribution implies apelin in various behavioral phenomena such as pain by an antinociceptive effect involving μ -opioid receptors [49], and as learning and memory consolidation via α -adrenergic, 5-HT₂ serotonergic, cholinergic, dopaminergic, GABAergic, and NO mediations [50]. Another characteristic of central apelin's action is its ability to protect neurons against excitotoxicity by several mechanisms [51]. In these studies, the authors demonstrate that apelin can protect cultured cortical neurons via an inhibition of reactive oxygen species (ROS) production, mitochondrial depolarization and apoptosis activation, mediated by ERK/Akt signaling pathways. Inversely, apelin cannot protect cultured hippocampal neurons without the presence of VEGF suggesting different actions depending on the area of the brain.

The hypothalamus is one of the area of the brain where apelin and its receptor are strongly expressed. In this structure, APJ is present in the medial parvocellular regions of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) and scattered magnocellular neurons of the PVN and the supraoptic nucleus (SON), which are key structures in the regulation of endocrine and autonomic responses for the maintenance of homeostasis [52]. APJ/Apelin is also present in the pituitary gland suggesting a role in the control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA). Indeed, it has been demonstrated the involvement of APJ as neuromodulator in modifying HPA axis activity in response to acute stress stimuli [53]. This study shows a decrease of ACTH release in APJ-deficient mice in response to hypoglycemic stress clearly confirming a role of central apelin in neuroendocrine functions. In the same way, apelin is co-expressed with vasopressin (AVP) and oxytocin in magnocellular neurons generating a functional role in fluid homeostasis [9]. APJ-deficient mice exhibit a decrease of water intake and an increase of AVP levels [54] while the intracerebroventricular (icv) injection of apelin inhibits AVP neurons

activity and activates diuresis [16]. It has already been shown that 24-h of water deprivation on rat lead to a decrease in AVP content and to an increase of apelin content in magnocellular neurons of PVN and SON. Treatment with AVP receptor antagonist on these neurons inhibits the increase of apelin content while treatment of AVP receptor agonist allows its rise suggesting the involvement of AVP in the regulation of neuronal apelin. Quantitative analysis demonstrated that 89% of apelin neurons contained POMC, whereas less than 10% contained NPY. However, numerous NPY nerve fibers are detected close to apelin neuronal cell bodies implying potential control of NPY on POMC/apelin neurons activity [46]. Indeed, NPY has been shown to inhibit the activity of POMC neurons via Y1 and Y5 receptors [55]. More than half of the arcuate nucleus (ARC) POMC neurons express apelin receptor mRNA, and agonist of apelin strongly increases α -MSH release from rat hypothalamic explants, whereas inactive apelin fragment does not [46]. This information suggests that apelin may be somatodendritically or axonally released from POMC neurons, stimulating in an autocrine manner the release of α -MSH, a neuropeptide reducing food intake and inducing weight loss. In accordance with this data, studies reveal an anorexigenic effect of icv apelin injection with the involvement of corticoliberins [56,57]. Contradictorily, Taheri et al. showed that apelin has no effect on food intake into fed rats while stimulates food intake in a dose-dependent manner by icv injection into fasting rats [58]. The effect generated by apelin seems to depend on animal model, on dose of apelin injected, nutritional status and metabolic status. It has been recently shown that the anorexigen effect of apelin is lost in obese/diabetic rats correlating with a decrease of hypothalamic APJ expression which could explain the lack of decrease of food intake in this model [57].

Cell signaling pathways in the brain

Concerning neuronal signaling pathways involved in apelin effects, we can retrieve similarly pathway than periphery (see Fig. 1). In fact, apelin generates Akt, ERK1/2 and Raf phosphorylation in hippocampal cultures [59]. Likewise in MC3T3-E1 cells, c-Jun N-terminal kinase and PI3-kinase/AKT signaling are activated in response to apelin while in cultured cortical neurons PKC phosphorylation is induced [60]. Finally, several forms of the APJ peptide ligand alleviate NMDA-mediated Ca²⁺ accumulation in neurons [51].

Besides an action on α -MSH release in hypothalamus, few studies have investigated central signaling pathway mediated by apelin and involved in the regulation of glucose metabolism. Duparc et al. demonstrate that icv injection of apelin into fed mice improves glucose homeostasis via NO-dependent pathway [61]. As previously described, apelin can phosphorylate eNOS that generates NO release which improves glucose metabolism in muscle. This regulation is also present in the hypothalamus since in response to icv apelin injection, hypothalamic eNOS is phosphorylated to decrease fed glycemia, improve glucose and insulin tolerance without modifying plasma insulin concentration. All these beneficial effects are abolished in eNOS-deficient mice and obese/diabetic mice proving the fundamental role of hypothalamic reactive nitrogen species (RNS) like NO in this regulation. Emerging data point to a pivotal role of hypothalamic ROS in the energy homeostasis regulation. Recent study has shown that apelin directly increases neuronal activity via stimulation of NADPH oxidase-derived superoxide in neurons cultured from ventral brainstem [62]. Superoxide belongs to the

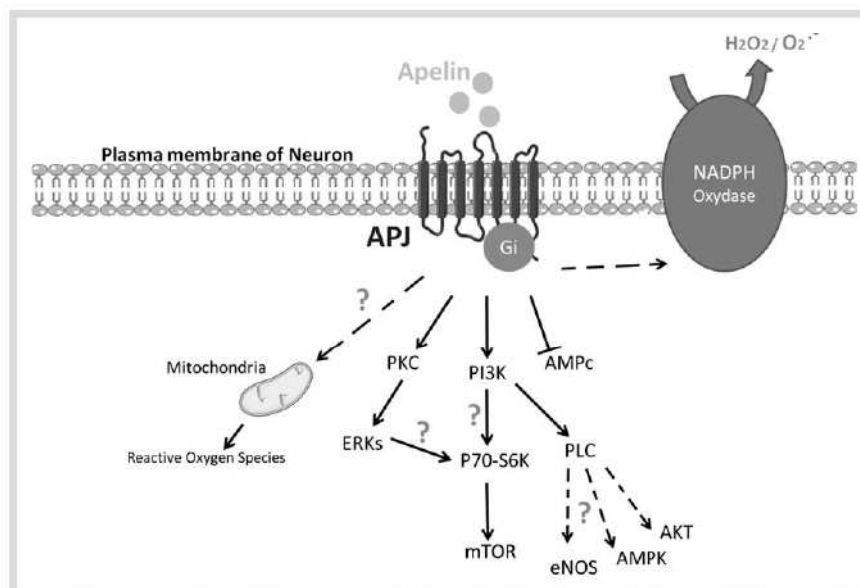


Fig. 1 Potential intracellular targets of neuronal apelin action.

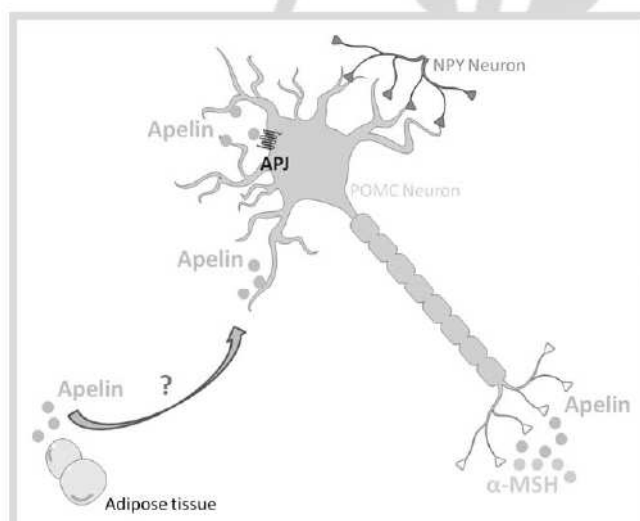


Fig. 2 Autocrine regulation of α -MSH release by apelin on POMC neurons. The large majority of apelin neurons contain POMC. POMC neurons express APJ and agonist of apelin strongly increases α -MSH release. It is suggested that apelin may be somatodendritically or axonally released stimulating in an autocrine manner the release of α -MSH. Moreover, numerous NPY nerve fibers are detected close to apelin neuronal cell bodies implying potential control of NPY neurons on apelin/POMC neurons activity. Finally, we can speculate that peripheral apelin may reach the hypothalamus via the blood-brain barrier in order to modulate the activity of apelin/POMC neurons.

ROS family, which is well known to be involved in the central regulation of glucose homeostasis [63,64]. As previously described, apelin can act on mitochondria and its metabolites but also on NADPH oxidase activity, 2 main producers of hypothalamic ROS [63,65], suggesting that this family of mediator could be implied in hypothalamic apelin signaling pathway.

Central apelin and glucose metabolism

Peripheral apelin improves glucose and lipids metabolism in muscle, and conserves its effect during metabolic disorders leading to consider apelin as a promising target for therapeutic advances [20,41], like leptin and adiponectin. These major adi-

pokines could act on periphery but also in the brain, more precisely in the hypothalamus. This structure is located in the floor of the third ventricle and could receive hormonal and metabolic informations via a physiologically modified blood-brain barrier conferring the property of the hypothalamus to sense directly peripheral variations like all neurohemal structures [66]. Higuchi et al. have demonstrated that hypothalamic apelin concentration is increased after intra-peritoneal (ip) apelin injection [67]. Moreover, ip apelin injection increases c-Fos staining especially in the hypothalamus (PVN, lateral hypothalamic area) and brainstem [67], reinforcing the hypothesis that peripheral apelin can target brain structures. Then, we can speculate that apelin, as an adipokine released by adipose tissue, could reach hypothalamus and modulate its apelin levels directly or by action on apelinergic neurons (see Fig. 2). Duparc et al. [61] showed that plasma levels of apelin in normal mice during 24h are increased during feeding activity (night period) and conversely decreased during the day. This regulation is completely lost in obese/diabetic mice where the levels are substantially increased during the entire 24h-day. These results can be linked with hypothalamic apelin levels which are also increased in these models [46]. Recently, we have shown that apelin stimulates hypothalamic NO release, which generates improving of glucose metabolism in fed mice [61]. This central effect could be mediated by the rise of plasma apelin levels during fed period. Based on all these informations, we propose that glucose utilization observed during the fed period could be linked to a dual effect of apelin on brain and peripheral tissue, via a common NO signaling.

Beneficial effect of central apelin is blunted in obese/diabetic mice, which 1) are not sensitive to a slight physiological increase of central apelin level [61] and 2) present an altered hypothalamic eNOS expression [68]. However, icv injection of high dose of apelin, similar to that observed in the hypothalamus of obese/diabetic mice, triggers fasted hyperglycemia in normal mice and increases hyperglycemia of obese/diabetic mice. This suggests that unlike leptin resistance observed in the brain if obese/diabetic mice, hypothalamus is still able to be stimulated by apelin in pathophysiological state. Then, we can suppose that a rise of hypothalamic apelin levels could be involved in the transition

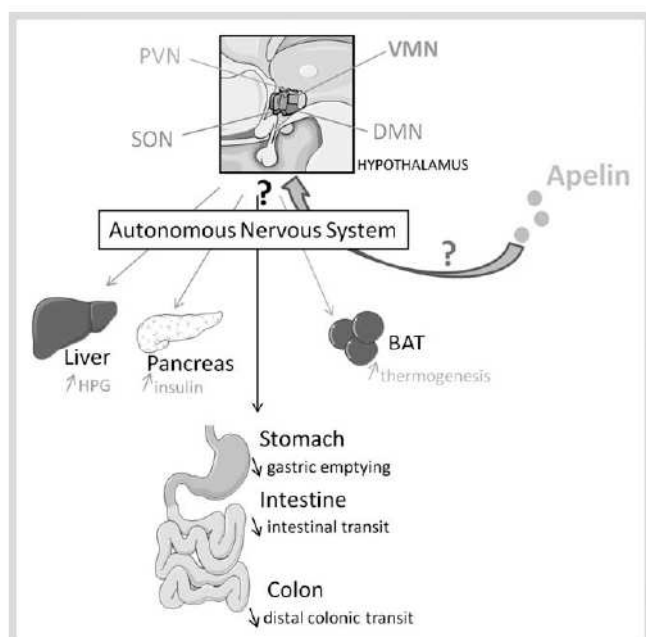


Fig. 3 Communication between the hypothalamus and peripheral organs in the glucose metabolism. Different hypothalamic nuclei could be targeted by central and/or peripheral apelin such as the supraoptic nucleus (SON), paraventricular nucleus (PVN), the dorsal medial nucleus (DMN), and the ventromedial nucleus (VMN). Then, peripheral tissues activity could be modified via the autonomous nervous system.

from normal to diabetic condition, and participates to the maintenance of a diabetic state in a long term period.

In response to icv apelin injection at a high-dose during fasted period, the c-Fos staining is increased in the ventro-medial hypothalamus (VMN) and decreased in the ARC without changing the c-Fos staining in dorso-medial hypothalamus (DMN). At the opposite, icv low-dose of apelin with beneficial properties generates a c-Fos signal in the DMN during fast and fed periods. These data confirm that hypothalamus is still sensitive to apelin, but bring into the light the complexity of the action of central apelin, which has differential effects depending on the nutritional condition, the quantity of apelin presents in the hypothalamus, and the evolution of the diabetic state.

Which peripheral organs could be targeted by central apelin during the establishment of a type 2 diabetes? (► **Fig. 3**). As previously explained, icv injection of high levels of apelin generates fasted hyperglycemia and hyperinsulinemia, characteristic of a type 2 diabetes, suggesting that 1) the pancreas can modify its insulin release to generate hyperinsulinemia and 2) the liver can increase glucose production output leading to hyperglycemia [69]. Numerous studies have implicated the autonomous nervous system (ANS) in the control of pancreatic and hepatic functions. It has been recognized as a powerful additional modulator of peripheral tissues such as liver [70], and dysfunction of ANS is observed during diabetes [71]. To focus on central targets of apelin's action, the specific injection of apelin into the PVN can increase sympathetic nerve activity innervating BAT, resulting to an increase in BAT temperature [72]. These data are of potential interest for the control of energy balance by central apelin since BAT is a crucial organ involved in the control of glucose metabolism. Central apelin can also act on gastrointestinal motility via the ANS. Thus, icv injection of apelin inhibits distal colonic transit in mice [73], gastric emptying and intestinal transit [74] com-

plementing its direct established role in the glucose absorption in the intestine [34].

Conclusion

Since the discovery of apelinergic system, many implications of this adipokine and/or neurotransmitter in physiological systems have been revealed. The demonstration that apelin belongs to the family of the rare adipokines, which are expressed in both adipose tissue and brain, gives a prominent role in the treatment of metabolic diseases. Therapeutic strategies have to take into account the dual role of apelin in periphery and in the brain on glucose metabolism. To this aim, central molecular actors mediating the deleterious effect of apelin on glucose metabolism have to be determined.

Acknowledgements

The authors thank the Société Française de Nutrition (SFN) for its financial support.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest in the authorship or publication of this contribution.

References

- 1 Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251: 471–476
- 2 O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, Heng HH, Tsui LC, Kennedy JL, Shi X, Petronis A, George SR, Nguyen T. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 1993; 136: 355–360
- 3 De Mota N, Lenkei Z, Llorens-Cortes C. Cloning, pharmacological characterization and brain distribution of the rat apelin receptor. *Neuroendocrinology* 2000; 72: 400–407
- 4 Pope GR, Roberts EM, Lolait SJ, O'Carroll AM. Central and peripheral apelin receptor distribution in the mouse: species differences with rat. *Peptides* 2012; 33: 139–148
- 5 Hosoya M, Kawamata Y, Fukusumi S, Fujii R, Habata Y, Hinuma S, Kitada C, Honda S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J Biol Chem* 2000; 275: 21061–21067
- 6 Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S, Hosoya M, Fujii R, Hinuma S, Nishizawa N, Kitada C, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1538: 162–171
- 7 Lee DK, Cheng R, Nguyen T, Fan T, Kariyawasam AP, Liu Y, Osmond DH, George SR, O'Dowd BF. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J Neurochem* 2000; 74: 34–41
- 8 Boucher J, Masri B, Daviaud D, Gesta S, Guigne C, Mazzucotelli A, Castan-Laurell I, Tack I, Knibiehler B, Carpene C, Audigier Y, Saulnier-Blache JS, Valet P. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 2005; 146: 1764–1771
- 9 De Mota N, Reaux-Le Goazigo A, El Messari S, Chartrel N, Roesch D, Dujardin C, Kordon C, Vaudry H, Moos F, Llorens-Cortes C. Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 10464–10469
- 10 Castan-Laurell I, Dray C, Knauf C, Kunduzova O, Valet P. Apelin, a promising target for type 2 diabetes treatment? *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23: 234–241

- 11 Maguire JJ, Klein MJ, Pitkin SL, Davenport AP. [Pyr1]apelin-13 identified as the predominant apelin isoform in the human heart: vasoactive mechanisms and inotropic action in disease. *Hypertension* 2009; 54: 598–604
- 12 Bo Y, Yuan LP. Glomerular expression of apelin and its association with proteinuria. *Indian J Pediatr* 2012; 79: 1028–1032
- 13 Klein MJ, Davenport AP. Emerging roles of apelin in biology and medicine. *Pharmacol Ther* 2005; 107: 198–211
- 14 Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A, Tummino P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2002; 277: 14838–14843
- 15 Lee DK, Ferguson SS, George SR, O'Dowd BF. The fate of the internalized apelin receptor is determined by different isoforms of apelin mediating differential interaction with beta-arrestin. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 395: 185–189
- 16 Reaux A, De Mota N, Skultetyova I, Lenkei Z, El Messari S, Gallatz K, Corvol P, Palkovits M, Llorens-Cortes C. Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J Neurochem* 2001; 77: 1085–1096
- 17 Masri B, Lahlou H, Mazarguil H, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin (65–77) activates extracellular signal-regulated kinases via a PTX-sensitive G protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 539–545
- 18 Masri B, Morin N, Cornu M, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin (65–77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *FASEB J* 2004; 18: 1909–1911
- 19 Zhong JC, Yu XY, Huang Y, Yung LM, Lau CW, Lin SG. Apelin modulates aortic vascular tone via endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway in diabetic mice. *Cardiovasc Res* 2007; 74: 388–395
- 20 Dray C, Knauf C, Daviaud D, Waget A, Boucher J, Buleon M, Cani PD, Attane C, Guigne C, Carpenne C, Burcelin R, Castan-Laurell I, Valet P. Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 2008; 8: 437–445
- 21 Liu C, Su T, Li F, Li L, Qin X, Pan W, Feng F, Chen F, Liao D, Chen L. PI3K/Akt signaling transduction pathway is involved in rat vascular smooth muscle cell proliferation induced by apelin-13. *Acta Biochim Biophys Sinica* 2010; 42: 396–402
- 22 Kidoya H, Kunii N, Naito H, Muramatsu F, Okamoto Y, Nakayama T, Takakura N. The apelin/APJ system induces maturation of the tumor vasculature and improves the efficiency of immune therapy. *Oncogene* 2012; 31: 3254–3264
- 23 Eyries M, Siegfried G, Ciumas M, Montagne K, Agrapart M, Lebrin F, Soubrier F. Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. *Circ Res* 2008; 103: 432–440
- 24 Kasai A, Shintani N, Kato H, Matsuda S, Gomi F, Haba R, Hashimoto H, Takada M, Tano Y, Baba A. Retardation of retinal vascular development in apelin-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 1717–1722
- 25 Rayalam S, Della-Fera MA, Kasser T, Warren W, Baile CA. Emerging role of apelin as a therapeutic target in cancer: a patent review. *Recent Patents Anticancer Drug Discov* 2011; 6: 367–372
- 26 Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, Kumaki I, Zhang W, Kumano K, Fujimiya M. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept* 2001; 99: 87–92
- 27 Szokodi I, Tavi P, Foldes G, Voutilainen-Myllyla S, Ilves M, Tokola H, Pikkariainen S, Piihola J, Rysa J, Toth M, Ruskoaho H. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res* 2002; 91: 434–440
- 28 Zhang Z, Yu B, Tao GZ. Apelin protects against cardiomyocyte apoptosis induced by glucose deprivation. *Chin Med J (Engl)* 2009; 122: 2360–2365
- 29 Foussal C, Lairez O, Calise D, Pathak A, Guilbeau-Frugier C, Valet P, Parini A, Kunduzova O. Activation of catalase by apelin prevents oxidative stress-linked cardiac hypertrophy. *FEBS Lett* 2010; 584: 2363–2370
- 30 Chong KS, Gardner RS, Morton JJ, Ashley EA, McDonagh TA. Plasma concentrations of the novel peptide apelin are decreased in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2006; 8: 355–360
- 31 Wang G, Anini Y, Wei W, Qi X, AM OC, Mochizuki T, Wang HQ, Hellmich MR, Englander EW, Greeley GH Jr. Apelin, a new enteric peptide: localization in the gastrointestinal tract, ontogeny, and stimulation of gastric cell proliferation and of cholecystokinin secretion. *Endocrinology* 2004; 145: 1342–1348
- 32 Flemstrom G, Makela K, Purhonen AK, Sjoblom M, Jedstedt G, Walkowiak J, Herzig KH. Apelin stimulation of duodenal bicarbonate secretion: feeding-dependent and mediated via apelin-induced release of enteric cholecystokinin. *Acta Physiologica* 2011; 201: 141–150
- 33 Ohno S, Yakabi K, Ro S, Ochiai M, Onouchi T, Sakurada T, Takabayashi H, Ishida S, Takayama K. Apelin-12 stimulates acid secretion through an increase of histamine release in rat stomachs. *Regul Pept* 2012; 174: 71–78
- 34 Dray C, Sakar Y, Vinel C, Daviaud D, Masri B, Garrigues L, Wanecq E, Galvani S, Negre-Salvayre A, Barak LS, Monsarrat B, Bulet-Schiltz O, Valet P, Castan-Laurell I, Ducroc R. The intestinal glucose-apelin cycle controls carbohydrate absorption in mice. *Gastroenterology* 2013; 144: 771–780
- 35 Biddinger SB, Kahn CR. From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. *Annu Rev Physiol* 2006; 68: 123–158
- 36 Harwood HJ Jr. The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology* 2012; 63: 57–75
- 37 Sorhede Winzell M, Magnusson C, Ahren B. The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice. *Regul Pept* 2005; 131: 12–17
- 38 Boucher J, Castan-Laurell I, Daviaud D, Guigne C, Buleon M, Carpenne C, Saulnier-Blache JS, Valet P. Adipokine expression profile in adipocytes of different mouse models of obesity. *Horm Metab Res* 2005; 37: 761–767
- 39 Yue P, Jin H, Aillaud M, Deng AC, Azuma J, Asagami T, Kundu RK, Reaven GM, Quertermous T, Tsao PS. Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 298: E59–E67
- 40 Higuchi K, Masaki T, Gotoh K, Chiba S, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T, Yoshimatsu H. Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology* 2007; 148: 2690–2697
- 41 Attane C, Foussal C, Le Gonidec S, Benani A, Daviaud D, Wanecq E, Guzman-Ruiz R, Dray C, Bezaire V, Rancoule C, Kuba K, Ruiz-Gayo M, Levade T, Penninger J, Burcelin R, Penicaud L, Valet P, Castan-Laurell I. Apelin treatment increases complete Fatty Acid oxidation, mitochondrial oxidative capacity, and biogenesis in muscle of insulin-resistant mice. *Diabetes* 2012; 61: 310–320
- 42 Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmee E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrieres J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56: 1761–1772
- 43 Delzenne NM, Neyrinck AM, Cani PD. Gut microbiota and metabolic disorders: How prebiotic can work? *Br J Nutr* 2013; 109 (Suppl 2): S81–S85
- 44 Geurts L, Lazarevic V, Derrien M, Everard A, Van Roye M, Knauf C, Valet P, Girard M, Muccioli GG, Francois P, de Vos WM, Schrenzel J, Delzenne NM, Cani PD. Altered gut microbiota and endocannabinoid system tone in obese and diabetic leptin-resistant mice: impact on apelin regulation in adipose tissue. *Front Microbiol* 2011; 2: 149
- 45 Soriguer F, Garrido-Sanchez L, Garcia-Serrano S, Garcia-Almeida JM, Garcia-Arnes J, Tinahones FJ, Garcia-Fuentes E. Apelin levels are increased in morbidly obese subjects with type 2 diabetes mellitus. *Obes Surg* 2009; 19: 1574–1580
- 46 Reaux-Le Goazigo A, Bodineau L, De Mota N, Jeandel L, Chartrel N, Knauf C, Raad C, Valet P, Llorens-Cortes C. Apelin and the proopiomelanocortin system: a new regulatory pathway of hypothalamic alpha-MSH release. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 301: E955–E966
- 47 Choe W, Albright A, Sulcove J, Jaffer S, Hesselgesser J, Lavi E, Crino P, Kolson DL. Functional expression of the seven-transmembrane HIV-1 co-receptor APJ in neural cells. *J Neurovirol* 2000; 6 (Suppl 1): S61–S69
- 48 Kasai A, Kinjo T, Ishihara R, Sakai I, Ishimaru Y, Yoshioka Y, Yamamuro A, Ishige K, Ito Y, Maeda S. Apelin deficiency accelerates the progression of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* 2011; 6: e23968
- 49 Lv SY, Qin YJ, Wang NB, Yang YJ, Chen Q. Supraspinal antinociceptive effect of apelin-13 in a mouse visceral pain model. *Peptides* 2012; 37: 165–170
- 50 Telegdy G, Adamik A, Jaszberenyi M. Involvement of neurotransmitters in the action of apelin-13 on passive avoidance learning in mice. *Peptides* 2013; 39: 171–174
- 51 Zeng XJ, Yu SP, Zhang L, Wei L. Neuroprotective effect of the endogenous neural peptide apelin in cultured mouse cortical neurons. *Exp Cell Res* 2010; 316: 1773–1783
- 52 O'Carroll AM, Lolait SJ. Regulation of rat APJ receptor messenger ribonucleic acid expression in magnocellular neurones of the paraventricular and supraoptic nuclei by osmotic stimuli. *J Neuroendocrinol* 2003; 15: 661–666
- 53 Newstrom MJ, Pope GR, Roberts EM, Lolait SJ, O'Carroll AM. Stress-dependent and gender-specific neuroregulatory roles of the apelin receptor in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to acute stress. *J Endocrinol* 2013; 216: 99–109

- 54 Roberts EM, Pope GR, Newson MJ, Landgraf R, Lolait SJ, O'Carroll AM. Stimulus-specific neuroendocrine responses to osmotic challenges in apelin receptor knockout mice. *J Neuroendocrinol* 2010; 22: 301–308
- 55 Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; 404: 661–671
- 56 Sunter D, Hewson AK, Dickson SL. Intracerebroventricular injection of apelin-13 reduces food intake in the rat. *Neurosci Lett* 2003; 353: 1–4
- 57 Clarke KJ, Whitaker KW, Reyes TM. Diminished metabolic responses to centrally-administered apelin-13 in diet-induced obese rats fed a high-fat diet. *J Neuroendocrinol* 2009; 21: 83–89
- 58 Taheri S, Murphy K, Cohen M, Sujkovic E, Kennedy A, Dhillon W, Dakin C, Sajedi A, Ghatei M, Bloom S. The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 1208–1212
- 59 O'Donnell LA, Agrawal A, Sabnekar P, Dichter MA, Lynch DR, Kolson DL. Apelin, an endogenous neuronal peptide, protects hippocampal neurons against excitotoxic injury. *J Neurochem* 2007; 102: 1905–1917
- 60 Tang SY, Xie H, Yuan LQ, Luo XH, Huang J, Cui RR, Zhou HD, Wu XP, Liao EY. Apelin stimulates proliferation and suppresses apoptosis of mouse osteoblastic cell line MC3T3-E1 via JNK and PI3-K/Akt signaling pathways. *Peptides* 2007; 28: 708–718
- 61 Duparc T, Colom A, Cani PD, Massaly N, Rastrelli S, Drougard A, Le Gondec S, Mouldous L, Frances B, Leclercq J, Llorens-Cortes C, Pospisilik JA, Delzenne NM, Valet P, Castan-Laurell I, Knauf C. Central apelin controls glucose homeostasis via a nitric oxide-dependent pathway in mice. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15: 1477–1496
- 62 Yao F, Modgil A, Zhang Q, Pingili A, Singh N, O'Rourke ST, Sun C. Pressor effect of apelin-13 in the rostral ventrolateral medulla: role of NAD(P)H oxidase-derived superoxide. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 336: 372–380
- 63 Leloup C, Tourrel-Cuzin C, Magnan C, Karaca M, Castel J, Carneiro L, Colombani AL, Ktorza A, Casteilla L, Penicaud L. Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 2009; 58: 673–681
- 64 Leloup C, Casteilla L, Carriere A, Galinier A, Benani A, Carneiro L, Penicaud L. Balancing mitochondrial redox signaling: a key point in metabolic regulation. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14: 519–530
- 65 Jaillard T, Roger M, Galinier A, Guillou P, Benani A, Leloup C, Casteilla L, Penicaud L, Lorsignol A. Hypothalamic reactive oxygen species are required for insulin-induced food intake inhibition: an NADPH oxidase-dependent mechanism. *Diabetes* 2009; 58: 1544–1549
- 66 Rodriguez EM, Blazquez JL, Guerra M. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides* 2010; 31: 757–776
- 67 Takayama K, Iwazaki H, Hirabayashi M, Yakabi K, Ro S. Distribution of c-Fos immunoreactive neurons in the brain after intraperitoneal injection of apelin-12 in Wistar rats. *Neurosci Lett* 2008; 431: 247–250
- 68 Cabou C, Cani PD, Campistron G, Knauf C, Mathieu C, Sartori C, Amar J, Scherrer U, Burcelin R. Central insulin regulates heart rate and arterial blood flow: an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism altered during diabetes. *Diabetes* 2007; 56: 2872–2877
- 69 Drougard A, Duparc T, Brenachot X, Carneiro L, Gouazé A, Fournel A, Geurts L, Cadoudal T, Prats AC, Pénicaud L, Vieau D, Lesage J, Leloup C, Benani A, Cani PD, Valet P, Knauf C. Hypothalamic apelin/ROS signaling controls hepatic glucose metabolism in the onset of diabetes. *Antioxid Redox Signal* 2013, in press
- 70 Kalsbeek A, Yi CX, La Fleur SE, Fliers E. The hypothalamic clock and its control of glucose homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21: 402–410
- 71 Penicaud L, Cousin B, Leloup C, Lorsignol A, Casteilla L. The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energy balance. *Nutrition* 2000; 16: 903–908
- 72 Masaki T, Yasuda T, Yoshimatsu H. Apelin-13 microinjection into the paraventricular nucleus increased sympathetic nerve activity innervating brown adipose tissue in rats. *Brain Res Bull* 2012; 87: 540–543
- 73 Yang YJ, Lv SY, Xiu MH, Xu N, Chen Q. Intracerebroventricular administration of apelin-13 inhibits distal colonic transit in mice. *Peptides* 2010; 31: 2241–2246
- 74 Lv SY, Yang YJ, Qin YJ, Xiong W, Chen Q. Effect of centrally administered apelin-13 on gastric emptying and gastrointestinal transit in mice. *Peptides* 2011; 32: 978–982

Le dialogue intestin, tissu adipeux et hypothalamus influence l'obésité et le diabète de type 2

Communication between intestine, adipose tissue and hypothalamus is involved in obesity and type 2 diabetes

A. Drougard · A. Fournel · P. Valet · C. Knauf

© Springer-Verlag France 2013

Résumé Le cerveau, et plus particulièrement l'hypothalamus, est le centre intégrateur de nombreux signaux d'origines diverses impliqués dans le contrôle de la satiété et du métabolisme énergétique. Par l'intermédiaire des systèmes endocrinien et/ou nerveux, les tissus périphériques (tube digestif, tissu adipeux parmi les principaux) peuvent alors envoyer des messages à l'hypothalamus, qui en retour modulera la prise alimentaire et l'utilisation périphérique du glucose. Ainsi, la genèse d'un message périphérique aberrant et/ou l'arrivée d'une information erronée dans l'hypothalamus peuvent participer à l'apparition des maladies métaboliques (obésité, diabète de type 2). En plus des troubles périphériques liés à ces pathologies, il devient d'une importance majeure de traiter ces « troubles hypothalamiques » en agissant, dans la mesure du possible, directement sur des cibles hypothalamiques ou au contraire en ciblant des acteurs moléculaires, cellulaires et tissulaires périphériques connus pour communiquer avec l'hypothalamus. Dès lors, le traitement des maladies métaboliques passerait par une vision globale de l'organisme via la communication inter-organes et le système nerveux central comme centre intégrateur.

Mots clés Hypothalamus · Métabolisme · Obésité · Adipokines · Intestin

Abstract The brain, and more particularly the hypothalamus, is an integrative center for numerous signals from various origins implicated in the control of satiety and energy metabolism. Peripheral tissues (gut, adipose tissue)

are able to send endocrine and/or nervous messages to the hypothalamus which, in turn controls food intake and peripheral glucose utilization. Then, the generation of an abnormal peripheral message and/or the arrival of aberrant information directly in the hypothalamus could be involved in the settlement of metabolic disorders (obesity and type 2 diabetes). In addition to peripheral disorders related to such diseases, it becomes of crucial importance to address these major "hypothalamic disorders" by acting, when possible, directly on hypothalamic targets or instead targeting molecular, cellular and tissue actors known to be in close communication with the hypothalamus. Therefore, the treatment of metabolic disorders needs a global vision of the body through the inter-organ communication, and the central nervous system behaving as an integrative center.

Keywords Hypothalamus · Metabolism · Obesity · Adipokines · Intestine

Introduction

La communication inter-organe est essentielle au maintien du contrôle du métabolisme énergétique. Dans ce dialogue complexe impliquant les systèmes nerveux et endocrinien, l'hypothalamus prend une part non-négligeable dans la régulation de l'homéostasie énergétique en jouant le rôle de centre intégrateur d'informations d'origines diverses. Ainsi, l'hypothalamus va recevoir des messages de type nerveux, endocriniens ou métaboliques, et va générer une réponse adaptée permettant de moduler la prise alimentaire et la dépense énergétique. Son rôle majeur dans le contrôle de l'homéostasie énergétique a été démontré par l'utilisation de modèles animaux présentant des lésions de noyaux hypothalamiques [1,2], ce qui a permis d'identifier l'implication de différentes régions, à savoir l'hypothalamus ventromédian (VMN), l'hypothalamus dorsomédian (DMN), l'aire latérale hypothalamique (LHA), le noyau paraventriculaire

A. Drougard · A. Fournel · P. Valet · C. Knauf (✉)
Institut national de la santé et de la recherche médicale
(INSERM), U1048, Toulouse, France
e-mail : claude.knauf@inserm.fr

Université Paul Sabatier, UPS,
Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires (I2MC),
CHU Rangueil, 1, avenue Jean Poulhès,
BP84225, 31432 Toulouse cedex 4, France

(NPV) et le noyau arqué (ARC). Les projections neuronales entre ces différentes régions sont nombreuses, augmentant ainsi les échanges d'informations entre les différentes structures, mais augmentant également la difficulté de compréhension des mécanismes de régulation (Fig. 1). Parmi toutes les structures hypothalamiques, l'ARC présente l'originalité d'être localisé au dessus de l'éminence médiane, zone où la barrière hémato-encéphalique présente des modifications morpho-fonctionnelles permettant le passage de certaines molécules informatives telles que les hormones et les métabolites [3]. L'ARC est donc une des premières structures capables de détecter des variations du taux d'hormones périphériques circulantes. De plus, l'ARC est en connexion avec le tronc cérébral, ce qui lui donne la possibilité de recevoir également des informations périphériques via une voie nerveuse afférente [4,5].

En ciblant l'ARC, l'ensemble de ces facteurs va moduler l'activité de neurones orexigènes, le système NPY/AgRP (Neuropeptide Y/Agouti and Related Peptide) ; et de neurones anorexigènes, le système POMC/CART (ProOpiomelanocortin et Cocaine-and-Amphetamine-Related Transcript), connu également pour augmenter la dépense énergétique en activant les récepteurs à la mélanocortine (MC3R et MC4R) [6]. Ainsi, une dérégulation de ces systèmes au cours du développement et/ou en réponse à un régime alimentaire ina-

dapté participe à l'apparition de maladies métaboliques. Dès lors, l'identification des acteurs moléculaires impliqués dans le contrôle central de l'homéostasie énergétique est d'une importance cruciale dans la mise en place de nouveaux traitements luttant contre l'obésité ou le diabète de type 2.

L'objectif général de cette revue est de faire un bilan des acteurs moléculaires impliqués dans des communications inter-organes mettant en jeu l'hypothalamus dans les conditions physiopathologiques. Ainsi, l'intestin, le tissu adipeux et certaines hormones métaboliques vont pouvoir moduler l'activité neuronale hypothalamique.

Obésité/Diabète et axe « intestin-cerveau »

Lors de la prise alimentaire, le glucose est détecté par des cellules spécialisées, cellules « senseurs » au glucose, localisées au niveau du pancréas [7], du tractus digestif [8] et du cerveau [9]. Lors de la prise alimentaire, les premiers senseurs détectant les variations de glucose sont ceux présents dans le tube digestif, et plus précisément dans la paroi intestinale et dans la veine hépato-portale [10-12]. Ces senseurs transmettent alors des messages nerveux et/ou hormonaux aux autres tissus périphériques (pancréas, muscles,...), mais également à l'hypothalamus [13]. Chez la souris, l'injection

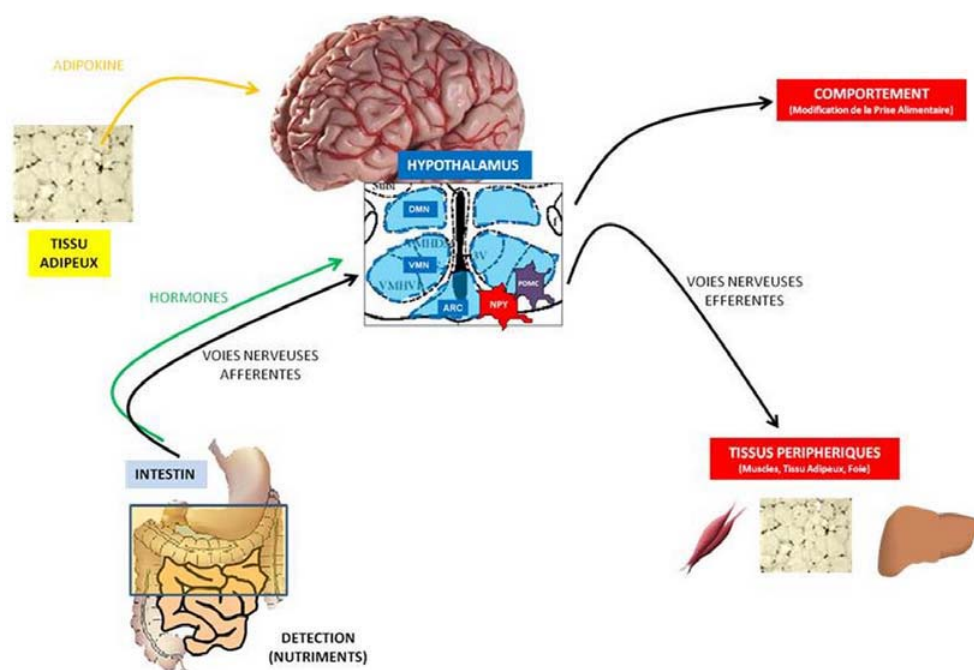


Fig. 1 Communication inter-organes dans le contrôle du métabolisme énergétique et de la prise alimentaire. L'hypothalamus reçoit des informations nerveuses et/ou hormonales en provenance de l'intestin (capable de détecter la présence de certains nutriments) et du tissu adipeux (adipokines). La modification d'activité des neurones à NPY et à POMC résultant de la sommation de ces informations aboutit à une modification du comportement alimentaire et à une modification de l'utilisation périphérique du glucose. Au cours de l'obésité, des perturbations de détection de nutriments dans l'intestin et de la sécrétion des adipokines aboutissent à une réponse inadaptée de l'hypothalamus, augmentant la prise alimentaire et provoquant une insulino-résistance périphérique

intra-gastrique (ig) de glucose, à une dose stimulant spécifiquement ces senseurs entériques (sans modifier la glycémie périphérique et donc sans stimuler les autres senseurs), génère un message nerveux afférent se traduisant par une augmentation de l'expression de c-Fos (marqueur d'activité neuronale) dans le tronc cérébral, et une diminution de ce même marqueur dans l'ARC, le VMN et le DMN [13]. La modification d'activité neuronale mesurée dans l'hypothalamus correspond à un ciblage des neurones à NPY à la base de la création d'un message nerveux efférent permettant d'augmenter l'utilisation du glucose au niveau musculaire [13]. Chez la souris en régime hyperlipidique, cet axe intestin-cerveau-périphérie est fortement perturbé. En effet, le même type d'injection ig de glucose ne modifie ni l'expression de c-Fos dans le cerveau, ni l'utilisation du glucose en périphérie suggérant ainsi que 1) les senseurs entériques détectent mal le glucose et/ou envoient un message erroné au cerveau, et 2) une altération des systèmes de détection entérique au glucose participe à la mise en place de l'obésité (modification de l'activité des neurones à NPY) et du diabète de type 2 (insulino-résistance). Cette dernière hypothèse est renforcée par le travail de Duparc et al [14] qui montre, dans un modèle de souris obèses/diabétiques génétiquement modifiées (db/db), l'absence d'augmentation de libération hypothalamique de monoxyde d'azote (NO) en réponse à une injection ig de glucose comparée aux souris contrôles [14]. Le NO étant un acteur moléculaire hypothalamique contrôlant l'utilisation périphérique de glucose [15], une altération des systèmes de détection entérique au glucose pourrait participer à l'apparition de troubles métaboliques. Des données de la littérature suggèrent actuellement qu'une inflammation intestinale, liée à un régime nutritionnel inadapté [13] ou liée à une modification génétique [14], serait à l'origine des perturbations de l'axe intestin-cerveau.

L'implication de cet axe intestin-cerveau-périphérie est clairement démontré au cours de la chirurgie bariatrique, notamment lors du gastric bypass, permettant une perte de poids pouvant atteindre 50 % du poids initial. Dans ce type de chirurgie, l'ensemble des mécanismes nerveux et endocriniens, qui étaient perturbés chez l'individu obèse/diabétique, sont à nouveau "remaniés" afin de permettre une réponse améliorée de l'axe intestin-cerveau en agissant aussi bien sur les hormones gastro-intestinales que sur les voies nerveuses afférentes [16]. Les conséquences de cette chirurgie bariatrique sur le tronc cérébral et l'hypothalamus ont largement été décrites dans différents modèles expérimentaux, et le ciblage indirect de ces régions du système nerveux aboutit à une diminution de la prise alimentaire et de la prise de poids. Récemment, Breen et al [17] ont montré que la détection des nutriments au niveau intestinal, via un relais central, jouait un rôle clé dans l'amélioration de l'homéostasie glucidique chez le rat opéré d'un « gastric bypass ».

Enfin, certains chercheurs tentent de faire le lien entre les modifications de la flore intestinale observées au cours du diabète et de l'obésité, et des modifications potentielles de l'activité hypothalamique (prise alimentaire, dépense énergétique) [18].

Obésité/Diabète et axe « tissu adipeux-cerveau »

Le tissu adipeux est capable de sécréter de nombreux facteurs appelés adipokines connus pour être impliqués dans le contrôle du métabolisme énergétique, et dont la sécrétion est fortement perturbée lors des maladies métaboliques [19,20]. Leurs interactions avec les tissus périphériques (muscles, pancréas, foie,...) et le cerveau sont extrêmement nombreuses [21]. Récemment, en plus de la leptine, l'adipokine la plus étudiée dans le contrôle central de l'obésité et des maladies métaboliques, notre groupe a été le premier à identifier le rôle de l'apeline dans le maintien de l'homéostasie glucidique [22].

Leptine

Les effets hypothalamiques de la leptine sont largement décrits dans la littérature à savoir inhibition de la prise alimentaire, diminution de la prise de poids et de la glycémie, stimulation de la thermogenèse et de l'oxydation des acides gras [23]. En agissant sur son récepteur fortement exprimé dans l'hypothalamus [23], la leptine peut ainsi inhiber l'activité des neurones à NPY [24,25] et stimuler celle des neurones à POMC [24]. La délétion génique du récepteur à la leptine dans l'hypothalamus [26] ou spécifiquement dans les neurones à POMC chez la souris [27] aboutit à l'apparition d'un phénotype obèse. De plus, il est clairement établi que l'obésité provoque une résistance centrale à la leptine. Cette résistance pourrait être liée à une diminution du transport à la leptine dans le cerveau et/ou une altération de la transduction du signal de la leptine [28].

Apeline

Parmi les adipokines potentiellement impliquées dans le contrôle du métabolisme glucidique, notre groupe s'intéresse au rôle de l'apeline, découverte en 1998 [29], et identifiée par notre équipe comme adipokine en 2005 [30]. L'apeline est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 77 acides aminés qui va ensuite être clivé en un peptide de 55 acides aminés, lequel pourra donner à son tour des peptides de différentes tailles (l'apeline 13 pyroglutaminée étant la forme la plus active). L'ARNm du gène codant l'apeline est exprimé dans de nombreux tissus périphériques comme le tissu adipeux, les poumons, le cœur et les gonades, mais

également au niveau central. En périphérie, l'apeline possède un effet inotrope positif sur le système cardiovasculaire, une action sur l'homéostasie des fluides corporels et est capable de stimuler la prolifération cellulaire [31]. Au niveau central, et plus précisément au niveau de l'hypothalamus, l'apeline a 1) des effets controversés sur la prise alimentaire, effets semblant dépendre du modèle animal et des doses perfusées [32-34], et 2) une puissante action diurétique via l'inhibition de la libération de vasopressine [35]. L'apeline est le ligand endogène du récepteur orphelin APJ, récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine de type Gi/Go, dont l'activation conduit à une réponse cellulaire impliquant de nombreuses voies de signalisation. Ce récepteur est exprimé dans presque tout l'organisme, mais de façon plus marquée dans l'hypothalamus, le cœur, les poumons et le tissu adipeux [36]. L'apeline a donc la particularité d'être une des rares adipokines ayant également un rôle de neurotransmetteur : il a été mis en évidence l'existence de neurones apelinergiques au niveau de l'hypothalamus, du noyau supra-optique et du noyau caudé [37].

Notre groupe a récemment montré que l'apeline, injectée en périphérie par voie intraveineuse (iv), avait des effets bénéfiques chez des souris normales mais également chez des souris rendues obèses et diabétiques suite à un régime hyperlipidique [22]. En effet, une injection iv d'apeline provoque une diminution de la glycémie, une amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline [22,38], ainsi qu'une augmentation de l'utilisation du glucose par les muscles et le tissu adipeux blanc [22]. De plus, l'apeline est capable d'augmenter l'absorption du glucose au niveau intestinal [39]. Concernant ses effets dans le système nerveux, notre groupe a démontré que l'injection intracérébro-ventriculaire (icv) d'apeline a des effets différentiels en fonction du statut nutritionnel et de la dose injectée. Ainsi, de faibles doses d'apeline injectées en icv, doses similaires à celles retrouvées chez la souris normale, améliorent la tolérance au glucose et à l'insuline chez la souris normale en condition nourrie [40]. A l'inverse, de fortes doses d'apeline injectées en icv, similaires à celles retrouvées dans l'hypothalamus de souris obèses/diabétiques [41], provoquent une insulino-résistance périphérique chez la souris normale à jeun [40]. Ces résultats suggèrent que 1) l'action directe de l'apeline sur les neurones hypothalamiques est totalement différente en fonction de l'état diabétique du modèle étudié, et 2) l'apeline par son action centrale participe à la mise en place de l'obésité et du diabète de type 2. Contrairement au phénomène de résistance à la leptine observé au cours de l'obésité, l'action de l'apeline dans le système nerveux central est conservée, puisque l'injection icv chez la souris obèse augmente la glycémie à jeun, amplifiant l'hyperglycémie à jeun caractéristique d'un diabète de type 2 [40]. Une partie des effets hypothalamiques de l'apeline pourrait passer par une action sur les neurones à POMC, qui exprime le

récepteur APJ, et dont la stimulation par l'apeline génère une libération d'alpha-MSH [41]. Les effets centraux de l'apeline sur le contrôle des fonctions périphériques impliquent également le système nerveux autonome [42].

Conclusion

Ainsi, un régime alimentaire inadapté génère l'apparition d'un message périphérique aberrant (nerveux, hormonal) pouvant avoir une origine adipocytaire et/ou intestinale. En plus des modifications périphériques largement décrites dans la littérature, ces messages erronés peuvent moduler l'activité du système nerveux central, et plus précisément l'hypothalamus, ce dernier étant l'élément intégrateur final contrôlant la prise alimentaire et l'utilisation périphérique du glucose. Ainsi, cibler les actions moléculaires hypothalamiques de messages périphériques pourrait être à la base de futures approches thérapeutiques pour les maladies métaboliques.

Références

1. Mayer J, Thomas DW (1967) Regulation of food intake and obesity. *Science* 156:328–37.
2. Stellar E (1954) The physiology of motivation. *Psychol Rev* 61:5–22
3. Rodríguez EM, Blázquez JL, Guerra M (2010) The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieu: The former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides*. *Peptides* 31:757–76
4. Thorens B, Larsen PJ (2004) Gut-derived signaling molecules and vagal afferents in the control of glucose and energy homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7:471–8
5. Williams G, Bing C, Cai XJ, et al (2001) The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav* 74:683–701
6. Suzuki K, Jayasena CN, Bloom SR (2012) Obesity and appetite control. *Exp Diabetes Res* doi: 10.1155/2012/824305. Epub 2012 Aug 1
7. Thorens B (2001) GLUT2 in pancreatic and extra-pancreatic gluco-detection (review). *Mol Membr Biol* 18:265–73
8. Shirazi-Beechey SP, Moran AW, Batchelor D.J, et al (2011) Glucose sensing and signalling; regulation of intestinal glucose transport. *Proc Nutr Soc* 70:185–93
9. Routh VH (2010) Glucose sensing neurons in the ventromedial hypothalamus. *Sensors (Basel)* 10:9002–25
10. Burcelin R, Dolci W, Thorens B (2000) Glucose sensing by the hepatoportal sensor is GLUT-2 dependent. In vivo analysis in GLUT-2null mice. *Diabetes* 49:1643–8
11. Burcelin R, Dolci W, Thorens B (2000) Portal glucose infusion in the mouse induces hypoglycemia. Evidence that the hepatoportal glucose sensor stimulates glucose utilization. *Diabetes* 49: 1635–42
12. Burcelin R, Da Costa A, Drucker D, Thorens B (2001) Glucose competence of the hepatoportal vein sensor requires the presence of an activated glucagon-like peptide-1 receptor. *Diabetes* 50:1720–8

13. Knauf C, Cani PD, Kim DH, et al (2008) Role of central nervous system glucagon-like Peptide-1 receptors in enteric glucose sensing. *Diabetes* 57:2603–12.
14. Duparc T, Naslain D, Colom A, et al (2011) Jejunum inflammation in obese and diabetic mice impairs enteric glucose detection and modifies nitric oxide release in the hypothalamus. *Antioxid Redox Signal* 14:415–23
15. Shankar R, Zhu J, Ladd B, et al (1998) Central nervous system nitric oxide synthase activity regulates insulin secretion and insulin action. *J Clin Invest* 102:1403–12
16. Berthoud HR, Shin AC, Zheng H (2011) Obesity surgery and gut-brain communication. *Physiol Behav* 105:106–19
17. Breen DM, Rasmussen BA, Kokorovic A, et al (2012) Jejunal nutrient sensing is required for duodenal-jejunal bypass surgery to rapidly lower glucose concentrations in uncontrolled diabetes. *Nat Med* 18:950–5
18. Pimentel GD, Micheletti TO, Pace F, et al (2012) Gut-central nervous system axis is a target for nutritional therapies. *Nutr J* doi: 10.1186/1475-2891-11-22.
19. Cook KS, Min HY, Johnson D, et al (1987) Adipsin: a circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science* 237:402–5
20. Flier JS, Cook KS, Usher P, Spiegelman BM (1987) Severely impaired adipsin expression in genetic and acquired obesity. *Science* 237:405–8
21. Harwood HJ Jr (2012) The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology* 63:57–75
22. Dray C, Knauf C, Daviaud D, et al (2008) Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 8:437–45
23. Flier JS (2004) Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116:337–50
24. Ahima RS, Qi Y, Singhal NS (2006) Adipokines that link obesity and diabetes to the hypothalamus. *Prog Brain Res* 153:155–74
25. Israel D, Chua S Jr (2010) Leptin receptor modulation of adiposity and fertility. *Trends Endocrinol Metab* 21:10–6
26. Cohen P, Zhao C, Cai X, et al (2001) Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. *J Clin Invest* 108:1113–21
27. Balthasar N, Dalgaard LT, Lee CE, et al (2005) Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell* 123:493–505
28. Jung CH, Kim MS (2013) Molecular mechanisms of central leptin resistance in obesity. *Arch Pharm Res* 36:201–7
29. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, et al (1998) Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 251:471–6
30. Boucher J, Masri B, Daviaud D, et al (2005) Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 146:1764–71
31. Masri B, Knibiehler B, Audigier Y (2005) Apelin signalling: a promising pathway from cloning to pharmacology. *Cell Signal* 17:415–26
32. Clarke KJ, Whitaker KW, Reyes TM (2009) Diminished metabolic responses to centrally-administered apelin-13 in diet-induced obese rats fed a high-fat diet. *J Neuroendocrinol* 21:83–9
33. Lv SY, Qin YJ, Wang HT, et al (2012) Centrally administered apelin-13 induces depression-like behavior in mice. *Brain Res Bull* 88:574–80
34. Sunter D, Hewson AK, Dickson SL (2003) Intracerebroventricular injection of apelin-13 reduces food intake in the rat. *Neurosci Lett* 353:1–4
35. Llorens-Cortes C, Moos F (2012) Apelin and vasopressin: two work better than one. *J Neuroendocrinol* 24:1085–6
36. Castan-Laurell I, Dray C, Knauf C, et al (2012) Apelin, a promising target for type 2 diabetes treatment? *Trends Endocrinol Metab* 23:234–41
37. Reaux A, De Mota N, Skultetyova I, et al (2001) Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J Neurochem* 77:1085–96
38. Attane, C., Foussal, C., Le Gonidec, S., Benani, A., Daviaud, D., Wanecq, E., Guzman-Ruiz, R., Dray C, Bezaire V, Rancoule C, et al (2012) Apelin treatment increases complete Fatty Acid oxidation, mitochondrial oxidative capacity, and biogenesis in muscle of insulin-resistant mice. *Diabetes* 61:310–20
39. Dray C, Sakar Y, Vinel C, et al (2013) The Intestinal Glucose-Apelin Cycle Controls Carbohydrate Absorption in Mice. *Gastroenterology* doi: 10.1053/j.gastro.2013.01.004
40. Duparc T, Colom A, Cani PD, et al (2011) Central apelin controls glucose homeostasis via a nitric oxide-dependent pathway in mice. *Antioxid Redox Signal* 15:1477–96
41. Reaux-Le Goazigo A, Bodineau L, De Mota N, et al (2011) Apelin and the proopiomelanocortin system: a new regulatory pathway of hypothalamic alpha-MSH release. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301:E955–66
42. Masaki T, Yasuda T, Yoshimatsu H (2012) Apelin-13 microinjection into the paraventricular nucleus increased sympathetic nerve activity innervating brown adipose tissue in rats. *Brain Res Bull* 87:540–3

Références

- [1] Cota D, Proulx K, Seeley RJ (2007) The role of CNS fuel sensing in energy and glucose regulation. *Gastroenterology* 132: 2158-2168
- [2] Schwartz MW, Porte D, Jr. (2005) Diabetes, obesity, and the brain. *Science* 307: 375-379
- [3] Bernard C (1849). *Comptes rendu des séances de l'académie des Sciences*
- [4] Kennedy GC (1953) The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing papers of a Biological character Royal Society* 140: 578-596
- [5] Rodriguez EM, Blazquez JL, Guerra M (2010) The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides* 31: 757-776
- [6] Brobeck JR (1946) Mechanism of the development of obesity in animals with hypothalamic lesions. *Physiological reviews* 26: 541-559
- [7] Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM (2013) Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med* 19: 1584-1596
- [8] Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews Neuroscience* 7: 41-53
- [9] Rodriguez EM, Blazquez JL, Pastor FE, et al. (2005) Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. *International review of cytology* 247: 89-164
- [10] Daneman R (2012) The blood-brain barrier in health and disease. *Annals of neurology* 72: 648-672
- [11] Starr JM, Wardlaw J, Ferguson K, MacLulich A, Deary IJ, Marshall I (2003) Increased blood-brain barrier permeability in type II diabetes demonstrated by gadolinium magnetic resonance imaging. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 74: 70-76
- [12] Pardridge WM, Triguero D, Farrell CR (1990) Downregulation of blood-brain barrier glucose transporter in experimental diabetes. *Diabetes* 39: 1040-1044
- [13] Gross PM, Weindl A (1987) Peering through the windows of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 7: 663-672
- [14] Luiten PG, ter Horst GJ, Steffens AB (1987) The hypothalamus, intrinsic connections and outflow pathways to the endocrine system in relation to the control of feeding and metabolism. *Prog Neurobiol* 28: 1-54
- [15] Vinik AI, Erbas T (2001) Recognizing and treating diabetic autonomic neuropathy. *Cleveland Clinic journal of medicine* 68: 928-930, 932, 934-944
- [16] Prior LJ, Eikelis N, Armitage JA, et al. (2010) Exposure to a high-fat diet alters leptin sensitivity and elevates renal sympathetic nerve activity and arterial pressure in rabbits. *Hypertension* 55: 862-868
- [17] Greenfield JR, Campbell LV (2008) Role of the autonomic nervous system and neuropeptides in the development of obesity in humans: targets for therapy? *Curr Pharm Des* 14: 1815-1820
- [18] Iyngkaran P, Anavekar N, Majoni W, Thomas MC (2013) The role and management of sympathetic overactivity in cardiovascular and renal complications of diabetes. *Diabetes Metab* 39: 290-298
- [19] Legradi G, Lechan RM (1999) Agouti-related protein containing nerve terminals innervate thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 140: 3643-3652
- [20] Fekete C, Legradi G, Mihaly E, Tatro JB, Rand WM, Lechan RM (2000) alpha-Melanocyte stimulating hormone prevents fasting-induced suppression of corticotropin-releasing hormone gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Neurosci Lett* 289: 152-156
- [21] Jitrapakdee S (2012) Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 44: 33-45
- [22] Meruvu S, Ayers SD, Winnier G, Webb P (2013) Thyroid hormone analogues: where do we stand in 2013? *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 23: 1333-1344

- [23] Bjorntorp P, Rosmond R (2000) The metabolic syndrome--a neuroendocrine disorder? *Br J Nutr* 83 Suppl 1: S49-57
- [24] Olney JW (1969) Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164: 719-721
- [25] Allen YS, Adrian TE, Allen JM, et al. (1983) Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science* 221: 877-879
- [26] Morris BJ (1989) Neuronal localisation of neuropeptide Y gene expression in rat brain. *J Comp Neurol* 290: 358-368
- [27] Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW (1998) Coexpression of *Agrp* and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* 1: 271-272
- [28] Schwartz MW, Marks JL, Sipols AJ, et al. (1991) Central insulin administration reduces neuropeptide Y mRNA expression in the arcuate nucleus of food-deprived lean (Fa/Fa) but not obese (fa/fa) Zucker rats. *Endocrinology* 128: 2645-2647
- [29] Mizuno TM, Mobbs CV (1999) Hypothalamic agouti-related protein messenger ribonucleic acid is inhibited by leptin and stimulated by fasting. *Endocrinology* 140: 814-817
- [30] Bewick GA, Gardiner JV, Dhillo WS, et al. (2005) Post-embryonic ablation of *AgRP* neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype. *FASEB J* 19: 1680-1682
- [31] Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP (1984) Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology* 115: 427-429
- [32] Rossi M, Kim MS, Morgan DG, et al. (1998) A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 139: 4428-4431
- [33] Billington CJ, Briggs JE, Grace M, Levine AS (1991) Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *Am J Physiol* 260: R321-327
- [34] Egawa M, Yoshimatsu H, Bray GA (1991) Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. *Am J Physiol* 260: R328-334
- [35] Fekete C, Sarkar S, Rand WM, et al. (2002) Agouti-related protein (AGRP) has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis; comparisons between the effect of AGRP and neuropeptide Y on energy homeostasis and the HPT axis. *Endocrinology* 143: 3846-3853
- [36] Widdowson PS (1997) Regionally-selective down-regulation of NPY receptor subtypes in the obese Zucker rat. Relationship to the Y5 'feeding' receptor. *Brain Res* 758: 17-25
- [37] Cheng X, Broberger C, Tong Y, et al. (1998) Regulation of expression of neuropeptide Y Y1 and Y2 receptors in the arcuate nucleus of fasted rats. *Brain Res* 792: 89-96
- [38] Kushi A, Sasai H, Koizumi H, Takeda N, Yokoyama M, Nakamura M (1998) Obesity and mild hyperinsulinemia found in neuropeptide Y-Y1 receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15659-15664
- [39] Fuxe K, Tinner B, Caberlotto L, Bunnemann B, Agnati LF (1997) NPY Y1 receptor like immunoreactivity exists in a subpopulation of beta-endorphin immunoreactive nerve cells in the arcuate nucleus: a double immunolabelling analysis in the rat. *Neurosci Lett* 225: 49-52
- [40] Horvath TL, Bechmann I, Naftolin F, Kalra SP, Leranath C (1997) Heterogeneity in the neuropeptide Y-containing neurons of the rat arcuate nucleus: GABAergic and non-GABAergic subpopulations. *Brain Res* 756: 283-286
- [41] King PJ, Widdowson PS, Doods HN, Williams G (1999) Regulation of neuropeptide Y release by neuropeptide Y receptor ligands and calcium channel antagonists in hypothalamic slices. *J Neurochem* 73: 641-646
- [42] Elias CF, Lee C, Kelly J, et al. (1998) Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 21: 1375-1385
- [43] Watson SJ, Akil H, Berger PA, Barchas JD (1979) Some observations on the opiate peptides and schizophrenia. *Archives of general psychiatry* 36: 35-41
- [44] Kim MS, Small CJ, Stanley SA, et al. (2000) The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. *J Clin Invest* 105: 1005-1011
- [45] Yasuda T, Masaki T, Kakuma T, Yoshimatsu H (2004) Hypothalamic melanocortin system regulates sympathetic nerve activity in brown adipose tissue. *Exp Biol Med (Maywood)* 229: 235-239

- [46] Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, et al. (1997) Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 46: 2119-2123
- [47] Harrold JA, Widdowson PS, Williams G (1999) Altered energy balance causes selective changes in melanocortin-4(MC4-R), but not melanocortin-3 (MC3-R), receptors in specific hypothalamic regions: further evidence that activation of MC4-R is a physiological inhibitor of feeding. *Diabetes* 48: 267-271
- [48] Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, et al. (1997) Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88: 131-141
- [49] Benoit SC, Schwartz MW, Lachey JL, et al. (2000) A novel selective melanocortin-4 receptor agonist reduces food intake in rats and mice without producing aversive consequences. *J Neurosci* 20: 3442-3448
- [50] Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, et al. (1997) Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278: 135-138
- [51] Wang R, Liu X, Hentges ST, et al. (2004) The regulation of glucose-excited neurons in the hypothalamic arcuate nucleus by glucose and feeding-relevant peptides. *Diabetes* 53: 1959-1965
- [52] Leibowitz SF, Hammer NJ, Chang K (1981) Hypothalamic paraventricular nucleus lesions produce overeating and obesity in the rat. *Physiol Behav* 27: 1031-1040
- [53] Giraudo SQ, Billington CJ, Levine AS (1998) Feeding effects of hypothalamic injection of melanocortin 4 receptor ligands. *Brain Res* 809: 302-306
- [54] Couceyro PR, Koylu EO, Kuhar MJ (1997) Further studies on the anatomical distribution of CART by in situ hybridization. *Journal of chemical neuroanatomy* 12: 229-241
- [55] Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, et al. (2004) AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428: 569-574
- [56] Shimizu N, Oomura Y, Plata-Salaman CR, Morimoto M (1987) Hyperphagia and obesity in rats with bilateral ibotenic acid-induced lesions of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Brain Res* 416: 153-156
- [57] Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hokfelt T (1998) The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15043-15048
- [58] Guan XM, Yu H, Van der Ploeg LH (1998) Evidence of altered hypothalamic pro-opiomelanocortin/ neuropeptide Y mRNA expression in tubby mice. *Brain Res Mol Brain Res* 59: 273-279
- [59] Xu B, Goulding EH, Zang K, et al. (2003) Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci* 6: 736-742
- [60] Majdic G, Young M, Gomez-Sanchez E, et al. (2002) Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology* 143: 607-614
- [61] Kim KW, Zhao L, Donato J, Jr., et al. (2011) Steroidogenic factor 1 directs programs regulating diet-induced thermogenesis and leptin action in the ventral medial hypothalamic nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 10673-10678
- [62] Bernardis LL, Bellinger LL (1993) The lateral hypothalamic area revisited: neuroanatomy, body weight regulation, neuroendocrinology and metabolism. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 17: 141-193
- [63] Broberger C, De Lecea L, Sutcliffe JG, Hokfelt T (1998) Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol* 402: 460-474
- [64] Marsh DJ, Weingarth DT, Novi DE, et al. (2002) Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 3240-3245
- [65] Haynes AC, Jackson B, Overend P, et al. (1999) Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides* 20: 1099-1105
- [66] Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, et al. (2001) Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* 30: 345-354

- [67] Girault EM, Yi CX, Fliers E, Kalsbeek A (2012) Orexins, feeding, and energy balance. *Prog Brain Res* 198: 47-64
- [68] Viggiano A, Monda M, Viggiano A, Fuccio F, De Luca B (2004) Extracellular GABA in the medial hypothalamus is increased following hypocretin-1 administration. *Acta Physiol Scand* 182: 89-94
- [69] Yi CX, Serlie MJ, Ackermans MT, et al. (2009) A major role for perifornical orexin neurons in the control of glucose metabolism in rats. *Diabetes* 58: 1998-2005
- [70] Yoshimichi G, Yoshimatsu H, Masaki T, Sakata T (2001) Orexin-A regulates body temperature in coordination with arousal status. *Exp Biol Med (Maywood)* 226: 468-476
- [71] Shiuchi T, Haque MS, Okamoto S, et al. (2009) Hypothalamic orexin stimulates feeding-associated glucose utilization in skeletal muscle via sympathetic nervous system. *Cell Metab* 10: 466-480
- [72] Lewis DE, Shellard L, Koeslag DG, et al. (1993) Intense exercise and food restriction cause similar hypothalamic neuropeptide Y increases in rats. *Am J Physiol* 264: E279-284
- [73] Broberger C (1999) Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y. *Brain Res* 848: 101-113
- [74] Bi S, Ladenheim EE, Schwartz GJ, Moran TH (2001) A role for NPY overexpression in the dorsomedial hypothalamus in hyperphagia and obesity of OLETF rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R254-260
- [75] Bellinger LL, Bernardis LL (2002) The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies. *Physiol Behav* 76: 431-442
- [76] Lynch RM, Tompkins LS, Brooks HL, Dunn-Meynell AA, Levin BE (2000) Localization of glucokinase gene expression in the rat brain. *Diabetes* 49: 693-700
- [77] Ter Horst GJ, de Boer P, Luiten PG, van Willigen JD (1989) Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A Phaseolus vulgaris lectin tracing study in the rat. *Neuroscience* 31: 785-797
- [78] Ellacott KL, Cone RD (2004) The central melanocortin system and the integration of short- and long-term regulators of energy homeostasis. *Recent progress in hormone research* 59: 395-408
- [79] Yoshihara T, Honma S, Honma K (1996) Effects of restricted daily feeding on neuropeptide Y release in the rat paraventricular nucleus. *Am J Physiol* 270: E589-595
- [80] Kawai Y, Inagaki S, Shiosaka S, et al. (1984) The distribution and projection of gamma-melanocyte stimulating hormone in the rat brain: an immunohistochemical analysis. *Brain Res* 297: 21-32
- [81] Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB, Cone RD (1994) Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol* 8: 1298-1308
- [82] Ritter S, Dinh TT, Zhang Y (2000) Localization of hindbrain glucoresponsive sites controlling food intake and blood glucose. *Brain Res* 856: 37-47
- [83] Bronstein DM, Schafer MK, Watson SJ, Akil H (1992) Evidence that beta-endorphin is synthesized in cells in the nucleus tractus solitarius: detection of POMC mRNA. *Brain Res* 587: 269-275
- [84] Glatzle J, Kreis ME, Kawano K, Raybould HE, Zittel TT (2001) Postprandial neuronal activation in the nucleus of the solitary tract is partly mediated by CCK-A receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R222-229
- [85] Elmquist JK, Coppari R, Balthasar N, Ichinose M, Lowell BB (2005) Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. *J Comp Neurol* 493: 63-71
- [86] Kalia M, Sullivan JM (1982) Brainstem projections of sensory and motor components of the vagus nerve in the rat. *J Comp Neurol* 211: 248-265
- [87] Berthoud HR (2002) Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 26: 393-428
- [88] Luckman SM, Lawrence CB (2003) Anorectic brainstem peptides: more pieces to the puzzle. *Trends Endocrinol Metab* 14: 60-65

- [89] Ahn S, Phillips AG (1999) Dopaminergic correlates of sensory-specific satiety in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of the rat. *J Neurosci* 19: RC29
- [90] Luquet SC-GC (2009) Le contrôle central de la balance énergétique. *Cahiers de nutrition et de diététique* 44: 17-25
- [91] King BM, Sam H, Arceneaux ER, Kass JM (1994) Effect on food intake and body weight of lesions in and adjacent to the posterodorsal amygdala in rats. *Physiol Behav* 55: 963-966
- [92] Saito Y, Cheng M, Leslie FM, Civelli O (2001) Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. *J Comp Neurol* 435: 26-40
- [93] Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813-820
- [94] Biddinger SB, Kahn CR (2006) From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. *Annu Rev Physiol* 68: 123-158
- [95] Monteiro R, Azevedo I (2010) Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators of inflammation* 2010
- [96] Mayer J (1953) Glucostatic mechanism of regulation of food intake. *N Engl J Med* 249: 13-16
- [97] Miselis RR, Epstein AN (1975) Feeding induced by intracerebroventricular 2-deoxy-D-glucose in the rat. *Am J Physiol* 229: 1438-1447
- [98] Oomura Y, Kimura K, Ooyama H, Maeno T, Iki M, Kuniyoshi M (1964) Reciprocal Activities of the Ventromedial and Lateral Hypothalamic Areas of Cats. *Science* 143: 484-485
- [99] Oomura Y, Ono T, Ooyama H, Wayner MJ (1969) Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. *Nature* 222: 282-284
- [100] Mizuno Y, Oomura Y (1984) Glucose responding neurons in the nucleus tractus solitarius of the rat: in vitro study. *Brain Res* 307: 109-116
- [101] Nakano Y, Oomura Y, Lenard L, et al. (1986) Feeding-related activity of glucose- and morphine-sensitive neurons in the monkey amygdala. *Brain Res* 399: 167-172
- [102] Routh VH (2010) Glucose sensing neurons in the ventromedial hypothalamus. *Sensors* 10: 9002-9025
- [103] Routh VH (2002) Glucose-sensing neurons: are they physiologically relevant? *Physiol Behav* 76: 403-413
- [104] Silver IA, Erecinska M (1994) Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals. *J Neurosci* 14: 5068-5076
- [105] Fioramonti X, Lorsignol A, Taupignon A, Penicaud L (2004) A new ATP-sensitive K⁺ channel-independent mechanism is involved in glucose-excited neurons of mouse arcuate nucleus. *Diabetes* 53: 2767-2775
- [106] Ibrahim N, Bosch MA, Smart JL, et al. (2003) Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels. *Endocrinology* 144: 1331-1340
- [107] Song Z, Levin BE, McArdle JJ, Bakhos N, Routh VH (2001) Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes* 50: 2673-2681
- [108] Burdakov D, Gerasimenko O, Verkhatsky A (2005) Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentrating hormone and orexin neurons in situ. *J Neurosci* 25: 2429-2433
- [109] Kang L, Routh VH, Kuzhikandathil EV, Gaspers LD, Levin BE (2004) Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons. *Diabetes* 53: 549-559
- [110] Miki T, Liss B, Minami K, et al. (2001) ATP-sensitive K⁺ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nat Neurosci* 4: 507-512
- [111] Sutherland VL, McReynolds M, Tompkins LS, Brooks HL, Lynch RM (2005) Developmental expression of glucokinase in rat hypothalamus. *Brain research Developmental brain research* 154: 255-258
- [112] Kang L, Dunn-Meynell AA, Routh VH, et al. (2006) Glucokinase is a critical regulator of ventromedial hypothalamic neuronal glucosensing. *Diabetes* 55: 412-420

- [113] Wan HZ, Hulsey MG, Martin RJ (1998) Intracerebroventricular administration of antisense oligodeoxynucleotide against GLUT2 glucose transporter mRNA reduces food intake, body weight change and glucoprivic feeding response in rats. *J Nutr* 128: 287-291
- [114] Leloup C, Orosco M, Serradas P, Nicolaidis S, Penicaud L (1998) Specific inhibition of GLUT2 in arcuate nucleus by antisense oligonucleotides suppresses nervous control of insulin secretion. *Brain Res Mol Brain Res* 57: 275-280
- [115] Glick Z, Mayer J (1968) Hyperphagia caused by cerebral ventricular infusion of phloridzin. *Nature* 219: 1374
- [116] Zawar C, Neumcke B (2000) Differential activation of ATP-sensitive potassium channels during energy depletion in CA1 pyramidal cells and interneurons of rat hippocampus. *Pflugers Arch* 439: 256-262
- [117] Branstrom R, Corkey BE, Berggren PO, Larsson O (1997) Evidence for a unique long chain acyl-CoA ester binding site on the ATP-regulated potassium channel in mouse pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 272: 17390-17394
- [118] Spanswick D, Smith MA, Mirshamsi S, Routh VH, Ashford ML (2000) Insulin activates ATP-sensitive K⁺ channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. *Nat Neurosci* 3: 757-758
- [119] Spanswick D, Smith MA, Groppi VE, Logan SD, Ashford ML (1997) Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Nature* 390: 521-525
- [120] Rowe IC, Boden PR, Ashford ML (1996) Potassium channel dysfunction in hypothalamic glucose-receptive neurons of obese Zucker rats. *J Physiol* 497 (Pt 2): 365-377
- [121] Pellerin L (2005) How astrocytes feed hungry neurons. *Molecular neurobiology* 32: 59-72
- [122] Lam TK, Gutierrez-Juarez R, Poci A, Rossetti L (2005) Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. *Science* 309: 943-947
- [123] Pierre K, Pellerin L, Debernardi R, Riederer BM, Magistretti PJ (2000) Cell-specific localization of monocarboxylate transporters, MCT1 and MCT2, in the adult mouse brain revealed by double immunohistochemical labeling and confocal microscopy. *Neuroscience* 100: 617-627
- [124] Guillod-Maximin E, Lorsignol A, Alquier T, Penicaud L (2004) Acute intracarotid glucose injection towards the brain induces specific c-fos activation in hypothalamic nuclei: involvement of astrocytes in cerebral glucose-sensing in rats. *J Neuroendocrinol* 16: 464-471
- [125] Yang XJ, Kow LM, Funabashi T, Mobbs CV (1999) Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms. *Diabetes* 48: 1763-1772
- [126] Fioramonti X, Contie S, Song Z, Routh VH, Lorsignol A, Penicaud L (2007) Characterization of glucosensing neuron subpopulations in the arcuate nucleus: integration in neuropeptide Y and pro-opio melanocortin networks? *Diabetes* 56: 1219-1227
- [127] Oomura Y, Ooyama H, Yamamoto T, Naka F, Kobayashi N, Ono T (1967) Neuronal mechanism of feeding. *Progress in Brain Research* 27: 1-33
- [128] Canabal DD, Potian JG, Duran RG, McArdle JJ, Routh VH (2007) Hyperglycemia impairs glucose and insulin regulation of nitric oxide production in glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R592-600
- [129] Canabal DD, Song Z, Potian JG, Beuve A, McArdle JJ, Routh VH (2007) Glucose, insulin, and leptin signaling pathways modulate nitric oxide synthesis in glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R1418-1428
- [130] Hallows KR, Raghuram V, Kemp BE, Witters LA, Foskett JK (2000) Inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by novel interaction with the metabolic sensor AMP-activated protein kinase. *J Clin Invest* 105: 1711-1721
- [131] Jaffrey SR, Snyder SH (1995) Nitric oxide: a neural messenger. *Annual review of cell and developmental biology* 11: 417-440
- [132] Murphy BA, Fioramonti X, Jochowitz N, et al. (2009) Fasting enhances the response of arcuate neuropeptide Y-glucose-inhibited neurons to decreased extracellular glucose. *Am J Physiol Cell Physiol* 296: C746-756
- [133] Young JK, Baker JH, Montes MI (2000) The brain response to 2-deoxy glucose is blocked by a glial drug. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 67: 233-239

- [134] Marty N, Dallaporta M, Foretz M, et al. (2005) Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors. *J Clin Invest* 115: 3545-3553
- [135] Allard C, Carneiro L, Grall S, et al. (2014) Hypothalamic astroglial connexins are required for brain glucose sensing-induced insulin secretion. *J Cereb Blood Flow Metab* 34: 339-346
- [136] Orellana JA, Saez PJ, Cortes-Campos C, et al. (2012) Glucose increases intracellular free Ca(2+) in tanycytes via ATP released through connexin 43 hemichannels. *Glia* 60: 53-68
- [137] Frayling C, Britton R, Dale N (2011) ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanycytes. *J Physiol* 589: 2275-2286
- [138] Coppola A, Liu ZW, Andrews ZB, et al. (2007) A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell Metab* 5: 21-33
- [139] Turnley AM, Stapleton D, Mann RJ, Witters LA, Kemp BE, Bartlett PF (1999) Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. *J Neurochem* 72: 1707-1716
- [140] Hardie DG, Carling D (1997) The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem* 246: 259-273
- [141] Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, et al. (2003) LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Current biology : CB* 13: 2004-2008
- [142] Woods A, Dickerson K, Heath R, et al. (2005) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab* 2: 21-33
- [143] Hayashi T, Hirshman MF, Kurth EJ, Winder WW, Goodyear LJ (1998) Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. *Diabetes* 47: 1369-1373
- [144] Bergeron R, Previs SF, Cline GW, et al. (2001) Effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside infusion on in vivo glucose and lipid metabolism in lean and obese Zucker rats. *Diabetes* 50: 1076-1082
- [145] Foretz M, Ancellin N, Andreelli F, et al. (2005) Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver. *Diabetes* 54: 1331-1339
- [146] Zhou G, Myers R, Li Y, et al. (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108: 1167-1174
- [147] Kim EK, Miller I, Aja S, et al. (2004) C75, a fatty acid synthase inhibitor, reduces food intake via hypothalamic AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 279: 19970-19976
- [148] Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, et al. (2004) AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* 279: 12005-12008
- [149] Claret M, Smith MA, Batterham RL, et al. (2007) AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *J Clin Invest* 117: 2325-2336
- [150] Viollet B, Andreelli F, Jorgensen SB, et al. (2003) The AMP-activated protein kinase alpha2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *J Clin Invest* 111: 91-98
- [151] Perrin C, Knauf C, Burcelin R (2004) Intracerebroventricular infusion of glucose, insulin, and the adenosine monophosphate-activated kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, controls muscle glycogen synthesis. *Endocrinology* 145: 4025-4033
- [152] McCrimmon RJ, Fan X, Ding Y, Zhu W, Jacob RJ, Sherwin RS (2004) Potential role for AMP-activated protein kinase in hypoglycemia sensing in the ventromedial hypothalamus. *Diabetes* 53: 1953-1958
- [153] Martin TL, Alquier T, Asakura K, Furukawa N, Preitner F, Kahn BB (2006) Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. *J Biol Chem* 281: 18933-18941
- [154] Lindsley JE, Rutter J (2004) Nutrient sensing and metabolic decisions. *Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry & molecular biology* 139: 543-559
- [155] Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, et al. (2004) Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current biology : CB* 14: 1296-1302
- [156] Dennis PB, Jaeschke A, Saitoh M, Fowler B, Kozma SC, Thomas G (2001) Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* 294: 1102-1105

- [157] Um SH, D'Alessio D, Thomas G (2006) Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. *Cell Metab* 3: 393-402
- [158] Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, et al. (2002) mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110: 163-175
- [159] Cota D, Proulx K, Smith KA, et al. (2006) Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* 312: 927-930
- [160] Blouet C, Ono H, Schwartz GJ (2008) Mediobasal hypothalamic p70 S6 kinase 1 modulates the control of energy homeostasis. *Cell Metab* 8: 459-467
- [161] Cota D, Matter EK, Woods SC, Seeley RJ (2008) The role of hypothalamic mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in diet-induced obesity. *J Neurosci* 28: 7202-7208
- [162] Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526
- [163] Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 9265-9269
- [164] Azuma H, Ishikawa M, Sekizaki S (1986) Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 88: 411-415
- [165] Nathan C (1997) Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 100: 2417-2423
- [166] Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological reviews* 43: 109-142
- [167] Wood J, Garthwaite J (1994) Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology* 33: 1235-1244
- [168] Roy B, Halvey EJ, Garthwaite J (2008) An enzyme-linked receptor mechanism for nitric oxide-activated guanylyl cyclase. *J Biol Chem* 283: 18841-18851
- [169] Ohkuma S, Katsura M (2001) Nitric oxide and peroxynitrite as factors to stimulate neurotransmitter release in the CNS. *Prog Neurobiol* 64: 97-108
- [170] Shibuki K, Okada D (1991) Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature* 349: 326-328
- [171] Morley JE, Flood JF (1991) Evidence that nitric oxide modulates food intake in mice. *Life Sci* 49: 707-711
- [172] Fioramonti X, Marsollier N, Song Z, et al. (2010) Ventromedial hypothalamic nitric oxide production is necessary for hypoglycemia detection and counterregulation. *Diabetes* 59: 519-528
- [173] Cabou C, Cani PD, Campistron G, et al. (2007) Central insulin regulates heart rate and arterial blood flow: an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism altered during diabetes. *Diabetes* 56: 2872-2877
- [174] Sadler CJ, Wilding JP (2004) Reduced ventromedial hypothalamic neuronal nitric oxide synthase and increased sensitivity to NOS inhibition in dietary obese rats: further evidence of a role for nitric oxide in the regulation of energy balance. *Brain Res* 1016: 222-228
- [175] Cadenas JL, Montero SA, Leal C, et al. (2010) Nitric oxide in the hypothalamus-pituitary axis mediates increases in brain glucose retention induced by carotid chemoreceptor stimulation with cyanide in rats. *Nitric Oxide* 22: 296-303
- [176] Duparc T, Naslain D, Colom A, et al. (2011) Jejunal inflammation in obese and diabetic mice impairs enteric glucose detection and modifies nitric oxide release in the hypothalamus. *Antioxid Redox Signal* 14: 415-423
- [177] Zanzinger J, Czachurski J (2000) Chronic oxidative stress in the RVLM modulates sympathetic control of circulation in pigs. *Pflugers Arch* 439: 489-494
- [178] Marsollier N, Kassis N, Mezghenna K, et al. (2009) Deregulation of hepatic insulin sensitivity induced by central lipid infusion in rats is mediated by nitric oxide. *PLoS One* 4: e6649
- [179] Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews* 82: 47-95
- [180] Brand MD (2010) The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol* 45: 466-472

- [181] Carriere A, Galinier A, Fernandez Y, Carmona MC, Penicaud L, Casteilla L (2006) [Physiological and physiopathological consequences of mitochondrial reactive oxygen species]. *Med Sci (Paris)* 22: 47-53
- [182] Raha S, Robinson BH (2000) Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends in biochemical sciences* 25: 502-508
- [183] Kwong LK, Sohal RS (1998) Substrate and site specificity of hydrogen peroxide generation in mouse mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 350: 118-126
- [184] Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Fernandez-Checa JC (1997) Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem* 272: 11369-11377
- [185] Negre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, et al. (1997) A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J* 11: 809-815
- [186] Nemoto S, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, Finkel T (2000) Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism. *Mol Cell Biol* 20: 7311-7318
- [187] Hordijk PL (2006) Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. *Circ Res* 98: 453-462
- [188] Lambeth JD (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature reviews Immunology* 4: 181-189
- [189] Arnold RS, Shi J, Murad E, et al. (2001) Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5550-5555
- [190] Mahadev K, Motoshima H, Wu X, et al. (2004) The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol Cell Biol* 24: 1844-1854
- [191] Infanger DW, Sharma RV, Davissou RL (2006) NADPH oxidases of the brain: distribution, regulation, and function. *Antioxid Redox Signal* 8: 1583-1596
- [192] Leloup C, Magnan C, Benani A, et al. (2006) Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing. *Diabetes* 55: 2084-2090
- [193] Andrews ZB, Liu ZW, Wallingford N, et al. (2008) UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* 454: 846-851
- [194] Colombani AL, Carneiro L, Benani A, et al. (2009) Enhanced hypothalamic glucose sensing in obesity: alteration of redox signaling. *Diabetes* 58: 2189-2197
- [195] Benani A, Troy S, Carmona MC, et al. (2007) Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: redox regulation of food intake. *Diabetes* 56: 152-160
- [196] Jaillard T, Roger M, Galinier A, et al. (2009) Hypothalamic reactive oxygen species are required for insulin-induced food intake inhibition: an NADPH oxidase-dependent mechanism. *Diabetes* 58: 1544-1549
- [197] Gao L, Li Y, Schultz HD, et al. (2010) Downregulated Kv4.3 expression in the RVLM as a potential mechanism for sympathoexcitation in rats with chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H945-955
- [198] Infanger DW, Cao X, Butler SD, et al. (2010) Silencing nox4 in the paraventricular nucleus improves myocardial infarction-induced cardiac dysfunction by attenuating sympathoexcitation and periinfarct apoptosis. *Circ Res* 106: 1763-1774
- [199] Leloup C, Casteilla L, Carriere A, et al. (2011) Balancing mitochondrial redox signaling: a key point in metabolic regulation. *Antioxid Redox Signal* 14: 519-530
- [200] Sies H, Cadenas E (1985) Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 311: 617-631
- [201] Jones DP (2006) Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 8: 1865-1879
- [202] Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB (2006) Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116: 1793-1801
- [203] Yang R, Trevillyan JM (2008) c-Jun N-terminal kinase pathways in diabetes. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 2702-2706
- [204] Cai D (2009) NFkappaB-mediated metabolic inflammation in peripheral tissues versus central nervous system. *Cell cycle* 8: 2542-2548

- [205] Ajuwon KM, Spurlock ME (2005) Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNFalpha expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr* 135: 1841-1846
- [206] Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112: 1821-1830
- [207] Cai D, Yuan M, Frantz DF, et al. (2005) Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 11: 183-190
- [208] Cai D, Frantz JD, Tawa NE, Jr., et al. (2004) IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* 119: 285-298
- [209] Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, et al. (1999) Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48: 1270-1274
- [210] Quan W, Jo EK, Lee MS (2013) Role of pancreatic beta-cell death and inflammation in diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism* 15 Suppl 3: 141-151
- [211] Arruda AP, Milanski M, Coope A, et al. (2011) Low-grade hypothalamic inflammation leads to defective thermogenesis, insulin resistance, and impaired insulin secretion. *Endocrinology* 152: 1314-1326
- [212] De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, et al. (2005) Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 146: 4192-4199
- [213] Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D (2008) Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 135: 61-73
- [214] Osteryoung KW, Nunnari J (2003) The division of endosymbiotic organelles. *Science* 302: 1698-1704
- [215] Cerveney KL, Tamura Y, Zhang Z, Jensen RE, Sesaki H (2007) Regulation of mitochondrial fusion and division. *Trends in cell biology* 17: 563-569
- [216] Sauvanet C, Arnaune-Pelloquin L, David C, Belenguer P, Rojo M (2010) [Mitochondrial morphology and dynamics: actors, mechanisms and functions]. *Med Sci (Paris)* 26: 823-829
- [217] Okamoto K, Shaw JM (2005) Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annual review of genetics* 39: 503-536
- [218] Hoppins S, Lackner L, Nunnari J (2007) The machines that divide and fuse mitochondria. *Annual review of biochemistry* 76: 751-780
- [219] Rojo M, Legros F, Chateau D, Lombes A (2002) Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci* 115: 1663-1674
- [220] Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, et al. (2000) Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 26: 207-210
- [221] de Brito OM, Scorrano L (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456: 605-610
- [222] Mozdy AD, McCaffery JM, Shaw JM (2000) Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J Cell Biol* 151: 367-380
- [223] Hackenbrock CR, Rehn TG, Weinbach EC, Lemasters JJ (1971) Oxidative phosphorylation and ultrastructural transformation in mitochondria in the intact ascites tumor cell. *J Cell Biol* 51: 123-137
- [224] Liesa M, Palacin M, Zorzano A (2009) Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiological reviews* 89: 799-845
- [225] Yu T, Robotham JL, Yoon Y (2006) Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2653-2658
- [226] Legros F, Lombes A, Frachon P, Rojo M (2002) Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell* 13: 4343-4354
- [227] Carneiro L, Allard C, Guissard C, et al. (2012) Importance of mitochondrial dynamin-related protein 1 in hypothalamic glucose sensitivity in rats. *Antioxid Redox Signal* 17: 433-444

- [228] Chen H, Chan DC (2005) Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum Mol Genet* 14 Spec No. 2: R283-289
- [229] Schneeberger M, Dietrich MO, Sebastian D, et al. (2013) Mitofusin 2 in POMC neurons connects ER stress with leptin resistance and energy imbalance. *Cell* 155: 172-187
- [230] Dietrich MO, Liu ZW, Horvath TL (2013) Mitochondrial dynamics controlled by mitofusins regulate AgRP neuronal activity and diet-induced obesity. *Cell* 155: 188-199
- [231] Grolach A, Klappa P, Kietzmann T (2006) The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxid Redox Signal* 8: 1391-1418
- [232] Garlatti MB, R. (2002) le stress du réticulum endoplasmique: adaptation et toxicité. *Med Sci (Paris)* 18: 585-594
- [233] Flamment M, Fougère F (2013) [Endoplasmic reticulum stress: from physiology to pathogenesis of type 2 diabetes]. *Med Sci (Paris)* 29: 756-764
- [234] Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H (2003) Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* 52: 581-587
- [235] Kawasaki N, Asada R, Saito A, Kanemoto S, Imaizumi K (2012) Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. *Scientific reports* 2: 799
- [236] Wang Y, Vera L, Fischer WH, Montminy M (2009) The CREB coactivator CRTC2 links hepatic ER stress and fasting gluconeogenesis. *Nature* 460: 534-537
- [237] Koh HJ, Toyoda T, Didesch MM, et al. (2013) Tribbles 3 mediates endoplasmic reticulum stress-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Nature communications* 4: 1871
- [238] Purkayastha S, Zhang H, Zhang G, Ahmed Z, Wang Y, Cai D (2011) Neural dysregulation of peripheral insulin action and blood pressure by brain endoplasmic reticulum stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 2939-2944
- [239] Lam CK, Chari M, Lam TK (2009) CNS regulation of glucose homeostasis. *Physiology (Bethesda)* 24: 159-170
- [240] Ahren B (2000) Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia* 43: 393-410
- [241] Capeau J (2003) [Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance]. *Med Sci (Paris)* 19: 834-839
- [242] Banks WA, Jaspan JB, Kastin AJ (1997) Selective, physiological transport of insulin across the blood-brain barrier: novel demonstration by species-specific radioimmunoassays. *Peptides* 18: 1257-1262
- [243] Baura GD, Foster DM, Porte D, Jr., et al. (1993) Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *J Clin Invest* 92: 1824-1830
- [244] Havrankova J, Roth J, Brownstein M (1978) Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature* 272: 827-829
- [245] Obici S, Zhang BB, Karkanias G, Rossetti L (2002) Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med* 8: 1376-1382
- [246] Filippi BM, Yang CS, Tang C, Lam TK (2012) Insulin activates Erk1/2 signaling in the dorsal vagal complex to inhibit glucose production. *Cell Metab* 16: 500-510
- [247] Chowder I, Lavy S, Halpern L (1966) Effect of insulin administered intracisternally on the glucose level of the blood and the cerebrospinal fluid in vagotomized dogs. *Exp Neurol* 14: 383-389
- [248] Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, et al. (2000) Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289: 2122-2125
- [249] Obici S, Feng Z, Karkanias G, Baskin DG, Rossetti L (2002) Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci* 5: 566-572
- [250] Pritchard LE, Turnbull AV, White A (2002) Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. *J Endocrinol* 172: 411-421
- [251] Benoit SC, Air EL, Coolen LM, et al. (2002) The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci* 22: 9048-9052
- [252] Schwartz MW, Sipols AJ, Marks JL, et al. (1992) Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology* 130: 3608-3616

- [253] Begg DP, Mul JD, Liu M, et al. (2013) Reversal of diet-induced obesity increases insulin transport into cerebrospinal fluid and restores sensitivity to the anorexic action of central insulin in male rats. *Endocrinology* 154: 1047-1054
- [254] Berthoud HR, Bereiter DA, Jeanrenaud B (1980) Role of the autonomic nervous system in the mediation of LHA electrical stimulation-induced effects on insulinemia and glycemia. *J Auton Nerv Syst* 2: 183-198
- [255] Berthoud HR, Fox EA, Powley TL (1990) Localization of vagal preganglionics that stimulate insulin and glucagon secretion. *Am J Physiol* 258: R160-168
- [256] Fukaya M, Mizuno A, Arai H, et al. (2007) Mechanism of rapid-phase insulin response to elevation of portal glucose concentration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E515-522
- [257] Berthoud HR, Bereiter DA, Trimble ER, Siegel EG, Jeanrenaud B (1981) Cephalic phase, reflex insulin secretion. Neuroanatomical and physiological characterization. *Diabetologia* 20 Suppl: 393-401
- [258] Sainsbury A, Rohner-Jeanrenaud F, Cusin I, et al. (1997) Chronic central neuropeptide Y infusion in normal rats: status of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis, and vagal mediation of hyperinsulinaemia. *Diabetologia* 40: 1269-1277
- [259] Parton LE, Ye CP, Coppari R, et al. (2007) Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 449: 228-232
- [260] Magnan C, Collins S, Berthault MF, et al. (1999) Lipid infusion lowers sympathetic nervous activity and leads to increased beta-cell responsiveness to glucose. *J Clin Invest* 103: 413-419
- [261] Jiang G, Zhang BB (2003) Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E671-678
- [262] Inokuchi A, Oomura Y, Shimizu N, Yamamoto T (1986) Central action of glucagon in rat hypothalamus. *Am J Physiol* 250: R120-126
- [263] Hoosein NM, Gurd RS (1984) Identification of glucagon receptors in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 4368-4372
- [264] Inokuchi A, Oomura Y, Nishimura H (1984) Effect of intracerebroventricularly infused glucagon on feeding behavior. *Physiol Behav* 33: 397-400
- [265] Honda K, Kamisoyama H, Uemura T, et al. (2012) The mechanism underlying the central glucagon-induced hyperglycemia and anorexia in chicks. *Comparative biochemistry and physiology Part A, Molecular & integrative physiology* 163: 260-264
- [266] Marubashi S, Tominaga M, Katagiri T, et al. (1985) Hyperglycaemic effect of glucagon administered intracerebroventricularly in the rat. *Acta Endocrinol (Copenh)* 108: 6-10
- [267] Amir S (1986) Central glucagon-induced hyperglycemia is mediated by combined activation of the adrenal medulla and sympathetic nerve endings. *Physiol Behav* 37: 563-566
- [268] Hevener AL, Bergman RN, Donovan CM (2000) Portal vein afferents are critical for the sympathoadrenal response to hypoglycemia. *Diabetes* 49: 8-12
- [269] Zhu W, Czyzyk D, Paranjape SA, et al. (2010) Glucose prevents the fall in ventromedial hypothalamic GABA that is required for full activation of glucose counterregulatory responses during hypoglycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E971-977
- [270] Adachi A, Shimizu N, Oomura Y, Kobashi M (1984) Convergence of hepatportal glucose-sensitive afferent signals to glucose-sensitive units within the nucleus of the solitary tract. *Neurosci Lett* 46: 215-218
- [271] Oosterveer MH, Schoonjans K (2013) Hepatic glucose sensing and integrative pathways in the liver. *Cell Mol Life Sci*
- [272] Iynedjian PB, Marie S, Gjinovci A, et al. (1995) Glucokinase and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in the human liver. Regulation of gene expression in cultured hepatocytes. *J Clin Invest* 95: 1966-1973
- [273] Iynedjian PB, Pilot PR, Nospikel T, et al. (1989) Differential expression and regulation of the glucokinase gene in liver and islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7838-7842
- [274] von Wilamowitz-Moellendorff A, Hunter RW, Garcia-Rocha M, et al. (2013) Glucose-6-phosphate-mediated activation of liver glycogen synthase plays a key role in hepatic glycogen synthesis. *Diabetes* 62: 4070-4082

- [275] Muthulakshmi S, Saravanan R (2013) Efficacy of azelaic acid on hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism in high fat diet induced type 2 diabetic mice. *Biochimie* 95: 1239-1244
- [276] Bultot L, Guigas B, Von Wilamowitz-Moellendorff A, et al. (2012) AMP-activated protein kinase phosphorylates and inactivates liver glycogen synthase. *Biochem J* 443: 193-203
- [277] Lochhead PA, Salt IP, Walker KS, Hardie DG, Sutherland C (2000) 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes* 49: 896-903
- [278] Mithieux G (2010) Brain, liver, intestine: a triumvirate to coordinate insulin sensitivity of endogenous glucose production. *Diabetes Metab* 36 Suppl 3: S50-53
- [279] Cherrington AD (1999) Banting Lecture 1997. Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. *Diabetes* 48: 1198-1214
- [280] Quinn PG, Yeagley D (2005) Insulin regulation of PEPCK gene expression: a model for rapid and reversible modulation. *Current drug targets Immune, endocrine and metabolic disorders* 5: 423-437
- [281] Visinoni S, Khalid NF, Joannides CN, et al. (2012) The role of liver fructose-1,6-bisphosphatase in regulating appetite and adiposity. *Diabetes* 61: 1122-1132
- [282] Jeong YW, Lee GS, Kim JJ, et al. (2012) Establishment of a canine model of human type 2 diabetes mellitus by overexpressing phosphoenolpyruvate carboxykinase. *International journal of molecular medicine* 30: 321-329
- [283] Parker JC, VanVolkenburg MA, Levy CB, et al. (1998) Plasma glucose levels are reduced in rats and mice treated with an inhibitor of glucose-6-phosphate translocase. *Diabetes* 47: 1630-1636
- [284] Clore JN, Stillman J, Sugerman H (2000) Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes. *Diabetes* 49: 969-974
- [285] van Dijk TH, van der Sluijs FH, Wiegman CH, et al. (2001) Acute inhibition of hepatic glucose-6-phosphatase does not affect gluconeogenesis but directs gluconeogenic flux toward glycogen in fasted rats. A pharmacological study with the chlorogenic acid derivative S4048. *J Biol Chem* 276: 25727-25735
- [286] Forssmann WG, Ito S (1977) Hepatocyte innervation in primates. *J Cell Biol* 74: 299-313
- [287] Shimazu T, Fukuda A (1965) Increased activities of glycogenolytic enzymes in liver after splanchnic-nerve stimulation. *Science* 150: 1607-1608
- [288] Shimazu T, Amakawa A (1968) Regulation of glycogen metabolism in liver by the autonomic nervous system. 3. Differential effects of sympathetic-nerve stimulation and of catecholamines on liver phosphorylase. *Biochim Biophys Acta* 165: 349-356
- [289] Shimazu T, Amakawa A (1968) Regulation of glycogen metabolism in liver by the autonomic nervous system. II. Neural control of glycogenolytic enzymes. *Biochim Biophys Acta* 165: 335-348
- [290] Pocai A, Lam TK, Gutierrez-Juarez R, et al. (2005) Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature* 434: 1026-1031
- [291] Galassetti P, Chu CA, Neal DW, Reed GW, Wasserman DH, Cherrington AD (1999) A negative arterial-portal venous glucose gradient increases net hepatic glucose uptake in euglycemic dogs. *Am J Physiol* 277: E126-134
- [292] Adkins-Marshall B, Pagliassotti MJ, Asher JR, et al. (1992) Role of hepatic nerves in response of liver to intraportal glucose delivery in dogs. *Am J Physiol* 262: E679-686
- [293] Burcelin R, Dolci W, Thorens B (2000) Portal glucose infusion in the mouse induces hypoglycemia: evidence that the hepatportal glucose sensor stimulates glucose utilization. *Diabetes* 49: 1635-1642
- [294] Burcelin R, Dolci W, Thorens B (2000) Glucose sensing by the hepatportal sensor is GLUT2-dependent: in vivo analysis in GLUT2-null mice. *Diabetes* 49: 1643-1648
- [295] Campbell JE, Drucker DJ (2013) Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metab* 17: 819-837
- [296] Gu G, Roland B, Tomaselli K, Dolman CS, Lowe C, Heilig JS (2013) Glucagon-like peptide-1 in the rat brain: distribution of expression and functional implication. *J Comp Neurol* 521: 2235-2261
- [297] Knauf C, Cani PD, Kim DH, et al. (2008) Role of central nervous system glucagon-like Peptide-1 receptors in enteric glucose sensing. *Diabetes* 57: 2603-2612

- [298] Knauf C, Cani PD, Perrin C, et al. (2005) Brain glucagon-like peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage. *J Clin Invest* 115: 3554-3563
- [299] Burcelin R, Da Costa A, Drucker D, Thorens B (2001) Glucose competence of the hepatportal vein sensor requires the presence of an activated glucagon-like peptide-1 receptor. *Diabetes* 50: 1720-1728
- [300] Shulman GI, Rothman DL, Jue T, Stein P, DeFronzo RA, Shulman RG (1990) Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *N Engl J Med* 322: 223-228
- [301] Zierath JR, Handberg A, Tally M, Wallberg-Henriksson H (1996) C-peptide stimulates glucose transport in isolated human skeletal muscle independent of insulin receptor and tyrosine kinase activation. *Diabetologia* 39: 306-313
- [302] Minokoshi Y, Haque MS, Shimazu T (1999) Microinjection of leptin into the ventromedial hypothalamus increases glucose uptake in peripheral tissues in rats. *Diabetes* 48: 287-291
- [303] Haque MS, Minokoshi Y, Hamai M, Iwai M, Horiuchi M, Shimazu T (1999) Role of the sympathetic nervous system and insulin in enhancing glucose uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats. *Diabetes* 48: 1706-1712
- [304] Nevzorova J, Evans BA, Bengtsson T, Summers RJ (2006) Multiple signalling pathways involved in beta2-adrenoceptor-mediated glucose uptake in rat skeletal muscle cells. *Br J Pharmacol* 147: 446-454
- [305] Cabou C, Campistron G, Marsollier N, et al. (2008) Brain glucagon-like peptide-1 regulates arterial blood flow, heart rate, and insulin sensitivity. *Diabetes* 57: 2577-2587
- [306] Schulz TJ, Tseng YH (2013) Brown adipose tissue: development, metabolism and beyond. *Biochem J* 453: 167-178
- [307] Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J (2009) UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab* 9: 203-209
- [308] Wang C, Bomberg E, Billington C, Levine A, Kotz CM (2007) Brain-derived neurotrophic factor in the hypothalamic paraventricular nucleus increases energy expenditure by elevating metabolic rate. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R992-1002
- [309] Wang C, Bomberg E, Billington CJ, Levine AS, Kotz CM (2010) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the hypothalamic ventromedial nucleus increases energy expenditure. *Brain Res* 1336: 66-77
- [310] Collins S (2011) beta-Adrenoceptor Signaling Networks in Adipocytes for Recruiting Stored Fat and Energy Expenditure. *Frontiers in endocrinology* 2: 102
- [311] Seale P, Kajimura S, Yang W, et al. (2007) Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab* 6: 38-54
- [312] Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, et al. (2013) Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest* 123: 215-223
- [313] Coleman DL (2010) A historical perspective on leptin. *Nat Med* 16: 1097-1099
- [314] Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL (1966) Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science* 153: 1127-1128
- [315] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432
- [316] Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD (1950) Obese, a new mutation in the house mouse. *The Journal of heredity* 41: 317-318
- [317] Bjorbaek C, Elmquist JK, Michl P, et al. (1998) Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology* 139: 3485-3491
- [318] Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM (1996) Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17: 305-311
- [319] Kastin AJ, Akerstrom V (2000) Fasting, but not adrenalectomy, reduces transport of leptin into the brain. *Peptides* 21: 679-682

- [320] Elmquist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB (1998) Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol* 395: 535-547
- [321] Ring LE, Zeltser LM (2010) Disruption of hypothalamic leptin signaling in mice leads to early-onset obesity, but physiological adaptations in mature animals stabilize adiposity levels. *J Clin Invest* 120: 2931-2941
- [322] Steinberg GR, Kemp BE (2009) AMPK in Health and Disease. *Physiological reviews* 89: 1025-1078
- [323] Oral EA, Simha V, Ruiz E, et al. (2002) Leptin-replacement therapy for lipodystrophy. *N Engl J Med* 346: 570-578
- [324] Howard JK, Flier JS (2006) Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends Endocrinol Metab* 17: 365-371
- [325] Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P (1995) Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269: 546-549
- [326] Kolaczynski JW, Considine RV, Ohannesian J, et al. (1996) Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: a link with ketogenesis but not ketones themselves. *Diabetes* 45: 1511-1515
- [327] Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, et al. (1995) Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377: 527-529
- [328] Elmquist JK, Ahima RS, Elias CF, Flier JS, Saper CB (1998) Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 741-746
- [329] Elmquist JK, Ahima RS, Maratos-Flier E, Flier JS, Saper CB (1997) Leptin activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem. *Endocrinology* 138: 839-842
- [330] Bagnasco M, Dube MG, Kalra PS, Kalra SP (2002) Evidence for the existence of distinct central appetite, energy expenditure, and ghrelin stimulation pathways as revealed by hypothalamic site-specific leptin gene therapy. *Endocrinology* 143: 4409-4421
- [331] Banks WA, DiPalma CR, Farrell CL (1999) Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity. *Peptides* 20: 1341-1345
- [332] Diano S, Liu ZW, Jeong JK, et al. (2011) Peroxisome proliferation-associated control of reactive oxygen species sets melanocortin tone and feeding in diet-induced obesity. *Nat Med* 17: 1121-1127
- [333] Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, et al. (2001) Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1930-1935
- [334] Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE (2001) The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 7: 947-953
- [335] Maeda N, Shimomura I, Kishida K, et al. (2002) Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 8: 731-737
- [336] Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, et al. (2003) Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423: 762-769
- [337] Kos K, Harte AL, da Silva NF, et al. (2007) Adiponectin and resistin in human cerebrospinal fluid and expression of adiponectin receptors in the human hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 1129-1136
- [338] Guillod-Maximin E, Roy AF, Vacher CM, et al. (2009) Adiponectin receptors are expressed in hypothalamus and colocalized with proopiomelanocortin and neuropeptide Y in rodent arcuate neurons. *J Endocrinol* 200: 93-105
- [339] Spranger J, Verma S, Gohring I, et al. (2006) Adiponectin does not cross the blood-brain barrier but modifies cytokine expression of brain endothelial cells. *Diabetes* 55: 141-147
- [340] Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, et al. (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8: 1288-1295
- [341] Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L (2001) Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 108: 1875-1881

- [342] Ouchi N, Kihara S, Arita Y, et al. (2000) Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 102: 1296-1301
- [343] Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, et al. (2004) Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med* 10: 524-529
- [344] Coope A, Milanski M, Araujo EP, et al. (2008) AdipoR1 mediates the anorexigenic and insulin/leptin-like actions of adiponectin in the hypothalamus. *FEBS Lett* 582: 1471-1476
- [345] Psilopanagioti A, Papadaki H, Kranioti EF, Alexandrides TK, Varakis JN (2009) Expression of adiponectin and adiponectin receptors in human pituitary gland and brain. *Neuroendocrinology* 89: 38-47
- [346] Park S, Kim DS, Kwon DY, Yang HJ (2011) Long-term central infusion of adiponectin improves energy and glucose homeostasis by decreasing fat storage and suppressing hepatic gluconeogenesis without changing food intake. *J Neuroendocrinol* 23: 687-698
- [347] Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, et al. (1998) Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 251: 471-476
- [348] Boucher J, Masri B, Daviaud D, et al. (2005) Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 146: 1764-1771
- [349] Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S, et al. (2001) Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim Biophys Acta* 1538: 162-171
- [350] Lee DK, Cheng R, Nguyen T, et al. (2000) Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *J Neurochem* 74: 34-41
- [351] Reaux-Le Goazigo A, Bodineau L, De Mota N, et al. (2011) Apelin and the proopiomelanocortin system: a new regulatory pathway of hypothalamic alpha-MSH release. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301: E955-966
- [352] Brailoiu GC, Dun SL, Yang J, Ohsawa M, Chang JK, Dun NJ (2002) Apelin-immunoreactivity in the rat hypothalamus and pituitary. *Neurosci Lett* 327: 193-197
- [353] O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, et al. (1993) A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 136: 355-360
- [354] Pope GR, Roberts EM, Lolait SJ, O'Carroll AM (2012) Central and peripheral apelin receptor distribution in the mouse: species differences with rat. *Peptides* 33: 139-148
- [355] De Mota N, Lenkei Z, Llorens-Cortes C (2000) Cloning, pharmacological characterization and brain distribution of the rat apelin receptor. *Neuroendocrinology* 72: 400-407
- [356] Takayama K, Iwazaki H, Hirabayashi M, Yakabi K, Ro S (2008) Distribution of c-Fos immunoreactive neurons in the brain after intraperitoneal injection of apelin-12 in Wistar rats. *Neurosci Lett* 431: 247-250
- [357] Eyries M, Siegfried G, Ciumas M, et al. (2008) Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. *Circ Res* 103: 432-440
- [358] Kidoya H, Kunii N, Naito H, et al. (2012) The apelin/APJ system induces maturation of the tumor vasculature and improves the efficiency of immune therapy. *Oncogene* 31: 3254-3264
- [359] Szokodi I, Tavi P, Foldes G, et al. (2002) Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res* 91: 434-440
- [360] Foussal C, Lairez O, Calise D, et al. (2010) Activation of catalase by apelin prevents oxidative stress-linked cardiac hypertrophy. *FEBS Lett* 584: 2363-2370
- [361] Dray C, Sakar Y, Vinel C, et al. (2013) The intestinal glucose-apelin cycle controls carbohydrate absorption in mice. *Gastroenterology* 144: 771-780
- [362] Flemstrom G, Makela K, Purhonen AK, et al. (2011) Apelin stimulation of duodenal bicarbonate secretion: feeding-dependent and mediated via apelin-induced release of enteric cholecystokinin. *Acta physiologica* 201: 141-150
- [363] Ohno S, Yakabi K, Ro S, et al. (2012) Apelin-12 stimulates acid secretion through an increase of histamine release in rat stomachs. *Regul Pept* 174: 71-78
- [364] Wang G, Anini Y, Wei W, et al. (2004) Apelin, a new enteric peptide: localization in the gastrointestinal tract, ontogeny, and stimulation of gastric cell proliferation and of cholecystokinin secretion. *Endocrinology* 145: 1342-1348

- [365] Dray C, Knauf C, Daviaud D, et al. (2008) Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 8: 437-445
- [366] Zhong JC, Yu XY, Huang Y, Yung LM, Lau CW, Lin SG (2007) Apelin modulates aortic vascular tone via endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway in diabetic mice. *Cardiovasc Res* 74: 388-395
- [367] Masri B, Morin N, Cornu M, Knibiehler B, Audigier Y (2004) Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *FASEB J* 18: 1909-1911
- [368] Attane C, Foussal C, Le Gonidec S, et al. (2012) Apelin treatment increases complete Fatty Acid oxidation, mitochondrial oxidative capacity, and biogenesis in muscle of insulin-resistant mice. *Diabetes* 61: 310-320
- [369] Boucher J, Castan-Laurell I, Daviaud D, et al. (2005) Adipokine expression profile in adipocytes of different mouse models of obesity. *Horm Metab Res* 37: 761-767
- [370] Sorhede Winzell M, Magnusson C, Ahren B (2005) The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice. *Regul Pept* 131: 12-17
- [371] Yue P, Jin H, Aillaud M, et al. (2010) Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E59-67
- [372] Higuchi K, Masaki T, Gotoh K, et al. (2007) Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology* 148: 2690-2697
- [373] Sakimoto S, Kidoya H, Naito H, et al. (2012) A role for endothelial cells in promoting the maturation of astrocytes through the apelin/APJ system in mice. *Development* 139: 1327-1335
- [374] Telegdy G, Adamik A, Jaszberenyi M (2013) Involvement of neurotransmitters in the action of apelin-13 on passive avoidance learning in mice. *Peptides* 39: 171-174
- [375] Lv SY, Yang YJ, Qin YJ, et al. (2012) Central apelin-13 inhibits food intake via the CRF receptor in mice. *Peptides* 33: 132-138
- [376] Newson MJ, Pope GR, Roberts EM, Lolait SJ, O'Carroll AM (2013) Stress-dependent and gender-specific neuroregulatory roles of the apelin receptor in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to acute stress. *J Endocrinol* 216: 99-109
- [377] Reaux A, De Mota N, Skultetyova I, et al. (2001) Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J Neurochem* 77: 1085-1096
- [378] Taheri S, Murphy K, Cohen M, et al. (2002) The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 1208-1212
- [379] Sunter D, Hewson AK, Dickson SL (2003) Intracerebroventricular injection of apelin-13 reduces food intake in the rat. *Neurosci Lett* 353: 1-4
- [380] Clarke KJ, Whitaker KW, Reyes TM (2009) Diminished metabolic responses to centrally-administered apelin-13 in diet-induced obese rats fed a high-fat diet. *J Neuroendocrinol* 21: 83-89
- [381] Duparc T, Colom A, Cani PD, et al. (2011) Central apelin controls glucose homeostasis via a nitric oxide-dependent pathway in mice. *Antioxid Redox Signal* 15: 1477-1496
- [382] Masaki T, Yasuda T, Yoshimatsu H (2012) Apelin-13 microinjection into the paraventricular nucleus increased sympathetic nerve activity innervating brown adipose tissue in rats. *Brain research bulletin* 87: 540-543
- [383] Yao F, Modgil A, Zhang Q, et al. (2011) Pressor effect of apelin-13 in the rostral ventrolateral medulla: role of NAD(P)H oxidase-derived superoxide. *J Pharmacol Exp Ther* 336: 372-380
- [384] Leloup C, Turrel-Cuzin C, Magnan C, et al. (2009) Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 58: 673-681
- [385] Purkayastha S, Cai D (2013) Neuroinflammatory basis of metabolic syndrome. *Molecular metabolism* 2: 356-363
- [386] Consoli A, Nurjhan N, Capani F, Gerich J (1989) Predominant role of gluconeogenesis in increased hepatic glucose production in NIDDM. *Diabetes* 38: 550-557
- [387] Bao L, Avshalumov MV, Patel JC, et al. (2009) Mitochondria are the source of hydrogen peroxide for dynamic brain-cell signaling. *J Neurosci* 29: 9002-9010

- [388] Tolias CM, McNeil CJ, Kazlauskaitė J, Hillhouse EW (1999) Astrocytes rather than neurones mediate interleukin-1beta dependent nitric oxide and superoxide radical release in primary hypothalamic rat cell cultures. *Neurosci Lett* 273: 57-60
- [389] Burmeister MA, Young CN, Braga VA, Butler SD, Sharma RV, Davisson RL (2011) In vivo bioluminescence imaging reveals redox-regulated activator protein-1 activation in paraventricular nucleus of mice with renovascular hypertension. *Hypertension* 57: 289-297
- [390] Yu Y, Zhong MK, Li J, et al. (2007) Endogenous hydrogen peroxide in paraventricular nucleus mediating cardiac sympathetic afferent reflex and regulating sympathetic activity. *Pflugers Arch* 454: 551-557
- [391] Erraji-Benchekroun L, Couton D, Postic C, et al. (2005) Overexpression of beta2-adrenergic receptors in mouse liver alters the expression of gluconeogenic and glycolytic enzymes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E715-722
- [392] Yi CX, Sun N, Ackermans MT, et al. (2010) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates glucose production via the hepatic sympathetic innervation in rats. *Diabetes* 59: 1591-1600
- [393] German JP, Thaler JP, Wisse BE, et al. (2011) Leptin activates a novel CNS mechanism for insulin-independent normalization of severe diabetic hyperglycemia. *Endocrinology* 152: 394-404
- [394] Milanski M, Arruda AP, Coope A, et al. (2012) Inhibition of hypothalamic inflammation reverses diet-induced insulin resistance in the liver. *Diabetes* 61: 1455-1462
- [395] Beck-Nielsen H, Hother-Nielsen O, Staehr P (2002) Is hepatic glucose production increased in type 2 diabetes mellitus? *Curr Diab Rep* 2: 231-236
- [396] Shah P, Basu A, Rizza R (2003) Fat-induced liver insulin resistance. *Curr Diab Rep* 3: 214-218
- [397] Ruderman NB, Saha AK, Kraegen EW (2003) Minireview: malonyl CoA, AMP-activated protein kinase, and adiposity. *Endocrinology* 144: 5166-5171
- [398] Cohen P, Levy JD, Zhang Y, et al. (2014) Ablation of PRDM16 and Beige Adipose Causes Metabolic Dysfunction and a Subcutaneous to Visceral Fat Switch. *Cell* 156: 304-316
- [399] Kagiya S, Fukuhara M, Matsumura K, Lin Y, Fujii K, Iida M (2005) Central and peripheral cardiovascular actions of apelin in conscious rats. *Regul Pept* 125: 55-59
- [400] Yang H, Nyby MD, Ao Y, et al. (2012) Role of brainstem thyrotropin-releasing hormone-triggered sympathetic overactivation in cardiovascular mortality in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 35: 157-165
- [401] Stevanovic D, Starcevic V, Vilimanovich U, et al. (2012) Immunomodulatory actions of central ghrelin in diet-induced energy imbalance. *Brain, behavior, and immunity* 26: 150-158
- [402] Askevold ET, Gullestad L, Dahl CP, Yndestad A, Ueland T, Aukrust P (2014) Interleukin-6 Signaling, Soluble Glycoprotein 130, and Inflammation in Heart Failure. *Current heart failure reports*
- [403] Xu Q, Tam M, Anderson SA (2008) Fate mapping Nkx2.1-lineage cells in the mouse telencephalon. *J Comp Neurol* 506: 16-29