



HAL
open science

Détection hypothalamique de l'hyperglycémie : rôle de la dynamique mitochondriale dans la signalisation par les espèces actives de l'oxygène

Lionel Carneiro

► **To cite this version:**

Lionel Carneiro. Détection hypothalamique de l'hyperglycémie : rôle de la dynamique mitochondriale dans la signalisation par les espèces actives de l'oxygène. Médecine humaine et pathologie. Université de Bourgogne, 2011. Français. NNT : 2011DIJOS003 . tel-00689166

HAL Id: tel-00689166

<https://theses.hal.science/tel-00689166>

Submitted on 19 Apr 2012

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

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



UNIVERSITE DE BOURGOGNE

UFR Sciences de la Vie et de la Terre

ENVIRONNEMENTS, SANTÉ, STIC
ECOLE DOCTORALE
UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

THÈSE

**Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne**

Discipline : Physiologie, Science de l'aliment (Physiologie-Neurobiologie)

par **Lionel Carneiro**

le 27 Septembre 2011

**Détection hypothalamique de l'hyperglycémie: rôle de la
dynamique mitochondriale dans la signalisation par les espèces
actives de l'oxygène**

Directeur de thèse : **Pr Corinne Leloup**

Jury

Pr Philippe BESNARD, Président

Pr Michel RIGOULET, Rapporteur

Pr Christophe Magnan, Rapporteur

Dr Béatrice MORIO, Examinatrice

Dr Jennifer RIEUSSET, Examinatrice

Pr Corinne LELOUP, Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Parce qu'une thèse est un travail collectif, je tiens à associer tous ceux qui ont participé de près ou de loin à mon travail. Je les en remercie car sans chacun d'entre eux ce manuscrit n'existerait pas.

C'est tout d'abord Corinne Leloup que je veux remercier. Probablement la première personne qui ait cru en moi (avant moi-même). En plus de 4 ans de thèse ?, tu m'as accompagné dans mon travail et m'a appris ce qu'était ton métier. Toutes les connaissances que tu m'as transmises, tous les conseils que tu m'as donnés, tous tes encouragements, et tout ce temps où tu m'as supporté m'ont permis d'atteindre mon but. Je suis fier et très agréablement étonné de te voir développer de nouvelles choses et de nouvelles idées : ta capacité à créer de la science m'étonne ! J'espère pouvoir travailler avec toi encore de nombreuses fois à l'avenir. Tu n'es plus ma directrice de thèse, tu deviens mon amie.

Je tiens également à remercier Luc Pénicaud, le « patron de l'équipe de Toulouse » à Dijon. L'une de mes préoccupations aura été d'être à la hauteur de vos attentes. Les discussions scientifiques auront été angoissantes pour moi en attendant votre avis sur mon travail, mais enrichissantes. Merci de m'avoir accepté et accueilli dans votre équipe, merci aussi de votre grande disponibilité malgré les milliers de choses que vous semblez toujours avoir à faire !

Je remercie aussi Xavier Fioramonti pour son aide apportée dans cette fin de thèse. Dommage que tu ne sois pas arrivé plus tôt ! Il faudra qu'on continue de bosser ensemble à l'avenir. Cela aura été cependant suffisant pour qu'on puisse devenir amis. J'associe Stéphanie et Clément, pour les moments passés avec vous. Nous aurons l'occasion d'en avoir d'autres, j'en suis sûr.

J'associe à cette fin de thèse l'ensemble de l'équipe d'enseignants de Biologie Animale qui m'ont permis de préparer ma thèse et m'ont offert une expérience dans l'enseignement via un poste d'ATER. Merci à Aleth Lemoine, Georges Alves, Fawzia Baba Aissa, Gérard Manière et Dehbia Abed Vieillard, pour les concessions sur les heures d'enseignement, sur les dépannages et l'aide durant les TP de biologie animale qui n'étaient pas ma spécialité !

Je vais bien sûr aussi remercier tous mes partenaires de bureau : Alexandra Gouazé qu'on ne peut pas ne pas remarquer, Camille Allard qui veille toujours à ce que tout soit en ordre, et Xavier Brenachot qui est parfois un peu étrange... et enfin Imad Aoude (les autres me diront s'il a fini par remarquer toutes les « surprises » qu'on a faites sur son bureau !).

Ce fut un vrai bonheur de travailler avec des amis, je vous souhaite à tous une belle thèse et de nombreux moments de rigolade ensemble ! J'espère avoir l'occasion de participer à ces moments avec vous !

Je remercie enfin l'ensemble de ma famille, en particulier mes parents qui m'ont soutenu tout au long de ma thèse. Je sais que ça a été long, et pourtant vous m'avez toujours incité à continuer et persévérer : si je n'ai pas peur des efforts, c'est parce que vous n'avez pas ménagé les vôtres non plus pour vos enfants. Mes 2 sœurs, mon ainée, Ivette, et ma petite sœur, Marlène, sont également associées dans ces remerciements. Pour vous tous, merci pour la confiance et les encouragements.

Je terminerai par un mot de remerciement à l'ensemble des personnes (thésards ou autres) rencontrés au long de ma thèse, en particulier depuis mon arrivée à Dijon, ainsi que toutes les personnes rencontrées de Toulouse à Dijon et qui auront contribué d'une manière ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail.

RÉSUMÉ

Mots clés : Homéostasie énergétique, hypothalamus, détection du glucose, dynamique mitochondriale, Espèces Actives de l'Oxygène mitochondriales (mEAOs).

L'homéostasie énergétique se définit comme le maintien de l'équilibre entre les apports et les dépenses d'énergie. La régulation nerveuse de cet équilibre est principalement assurée par l'hypothalamus. Il existe dans cette structure des neurones spécialisés dont l'activité électrique est modifiée par des signaux nerveux, métaboliques et hormonaux. Nous avons travaillé sur la détection du glucose dans cette structure, qui permet l'élaboration d'une réponse adaptée en termes de prise alimentaire et de contrôle du métabolisme. Lors de cette détection, l'utilisation du glucose conduit à la formation d'Espèces Actives de l'Oxygène d'origine mitochondriale (mEAOs) par la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM), constituant une signalisation redox indispensable aux réponses physiologiques. De récentes études *in vitro* (cultures de myoblastes, hépatocytes) ont par ailleurs mis en évidence le rôle de la dynamique mitochondriale, qui contrôle la morphologie des mitochondries par des mécanismes de fission et de fusion, sur la production de mEAOs induite par une hyperglycémie. Cette dernière déclenche la fission des mitochondries de façon concomitante à la production de mEAOs. En revanche, le blocage de la fission empêche la production de mEAOs lors de l'hyperglycémie dans ces cultures. Ces études suggéraient donc que la fission soit déclenchée par l'hyperglycémie et permette alors la production de mEAOs.

Mon projet de thèse a consisté à déterminer l'implication de la dynamique mitochondriale dans la signalisation mEAOs lors de la détection hypothalamique du glucose. Nos résultats nous ont permis de mettre en évidence, dans un premier temps, un adressage de la protéine de fission DRP1 à la mitochondrie dans l'hypothalamus lors d'une hyperglycémie cérébrale, événement nécessaire au déclenchement de la fragmentation des mitochondries. Cette fragmentation est confirmée en imagerie où l'analyse morphologique montre des mitochondries plus petites, plus sphériques et moins allongées que celles des témoins. Dans un deuxième temps, nous avons déterminé l'implication de cette fission mitochondriale dans la détection hypothalamique du glucose. Son importance a pu être évaluée en bloquant la fission des mitochondries par l'inhibition de l'expression de la protéine de fission DRP1 spécifiquement dans le VMH, par interférence ARN. Cette stratégie nous a permis d'obtenir une inhibition de l'expression de DRP1 de près de 80%, 72h après l'injection. Cette inhibition est localisée au VMH et a pour conséquence une élongation des mitochondries qui présente un réseau mitochondrial plus filamenteux. L'étude du phénotype des animaux a mis en évidence une hyperphagie associée à l'inhibition de la fission mitochondriale dans le VMH. Cette hyperphagie n'entraîne cependant aucune modification du poids corporel. Ceci suggère une augmentation des dépenses énergétiques chez ces animaux. De plus, ils présentent une perte de sensibilité hypothalamique au glucose qui conduit à un défaut du contrôle nerveux de la sécrétion d'insuline, ainsi qu'à une perte de l'effet satiétogène du glucose lors d'un test de réalimentation. Nous montrons que cette perte de sensibilité au glucose est due à un défaut de production hypothalamique des mEAOs en réponse au glucose, production qui est nécessaire à la signalisation responsable des réponses effectrices. Ce défaut de production de mEAOs est associé à un dysfonctionnement de la CRM. L'ensemble de ce travail permet donc de montrer pour la première fois, *in vivo*, que la fission mitochondriale est indispensable à la production hypothalamique de mEAOs lors d'une hyperglycémie cérébrale. Cette production est nécessaire au déclenchement du contrôle nerveux permettant d'une part la sécrétion d'insuline et d'autre part le rassasiement induit par le glucose intra-hypothalamique.

ABSTRACT

Keywords: Energetic homeostasis, hypothalamus, glucose sensing, mitochondrial dynamics, mitochondrial Reactive Oxygen Species (mROS).

Energetic homeostasis results in the balance between energy intake and expenditure. The hypothalamus plays an important role in the regulation of both energetic metabolism and food intake in sensing hormonal and metabolic signals. For instance, changes in hypothalamic glucose level modulate food intake and insulin secretion. We have previously found that 1) increased hypothalamic glucose level triggers production of mitochondrial reactive oxygen species (mROS) from the electron transport chain; 2) hypothalamic mROS production is involved in glucose homeostasis and food intake control. The molecular mechanisms involved in glucose-induced hypothalamic mROS production are still unknown. Mitochondrial dynamics control mitochondrial morphology through fission or fusion mechanisms. Recent *in vitro* studies have shown that mitochondrial fission is involved in glucose-induced myoblasts and hepatocytes mROS production.

The main hypothesis of my thesis was that mitochondrial dynamics were involved in 1) hypothalamic glucose-induced mROS signaling and 2) hypothalamic glucose sensitivity. We first showed *in vivo* that increased hypothalamic glucose level in response to an intracarotid glucose injection induces recruitment of the mitochondrial fission protein DRP1 at the mitochondria and triggers mitochondrial fragmentation. The second part of my work was to determine whether mitochondrial fission is involved in hypothalamic glucose sensitivity. Therefore, we inhibited DRP1 expression in the ventromedial hypothalamus (VMH) by siRNA injection. 72h post siDRP1 injection, VMH DRP1 expression was decreased by 80%. At this time, we found that increased hypothalamic glucose level failed to increase hypothalamic mROS production. In addition, intracarotid glucose injection-induced insulin secretion was decreased. Finally, VMH glucose injection-induced food intake inhibition was attenuated in siDRP1 treated animals. In a last set of experiments, we found *ex vivo* by oxygraphy that hypothalamic mROS production is associated with electron transport chain dysfunction. Altogether, our work shows for the first time that mitochondrial fission is involved in mROS dependent hypothalamic glucose sensitivity. Furthermore, this work demonstrates that mitochondrial fission plays a critical role in the regulation of glucose homeostasis and food intake.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	Erreur ! Signet non défini.
Résumé	3
Abstract	5
Abréviations	12
Liste des figures	14
Introduction	18
Préambule	19
I. Régulation nerveuse de l'homéostasie énergétique	22
A. Principales structures impliquées	22
1. Le système nerveux central : cas de l'hypothalamus	22
II. Le contrôle du métabolisme énergétique par le SNA	24
III. Populations neuronales de l'hypothalamus	28
A. Le noyau arqué	28
B. Les autres noyaux hypothalamiques	33
C. Signaux circulants du contrôle de l'homéostasie énergétique	36
1. Les hormones.....	36
a. La leptine	36
b. L'insuline.....	37
c. La ghréline	38
2. Les nutriments.....	40
a. Les acides gras	40
b. Les protéines	42

c.	Le glucose	43
IV.	La détection du glucose : implication dans le contrôle de l'homéostasie énergétique	43
A.	La détection du glucose dans le pancréas endocrine.....	44
1.	La cellule β	44
B.	La détection du glucose par le système nerveux entérique.....	45
C.	La détection du glucose de la veine hépatoportale	46
D.	La détection du glucose par les corps carotidiens	47
V.	La détection hypothalamique du glucose	48
A.	Etudes in vivo.....	49
B.	Etudes in vitro.....	51
1.	Existence de 4 populations neuronales	51
2.	Phénotypes des neurones sensibles au glucose.....	52
3.	Rôle des astrocytes dans la détection du glucose.....	53
4.	Voies de signalisation de la détection du glucose.....	54
5.	L'étape du transport du glucose	55
6.	La phosphorylation du glucose	56
7.	L'AMPK.....	56
8.	Transmission du signal : implication du canal K_{ATP}	57
VI.	La mitochondrie et la « détection » énergétique.....	58
A.	Le fonctionnement mitochondrial.....	58
1.	Phosphorylation oxydative	59
B.	Composition de la CRM	62
C.	Production des mEAOs.....	64
1.	La modulation de la production des mEAOs	65
D.	Chimie des EAOs et source subcellulaire.....	66
1.	Réduction monoélectrique de l'oxygène et EAOs	66
2.	Les différentes EAOs	66
a.	L'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$	66

b.	Le peroxyde d'hydrogène H ₂ O ₂	67
c.	Autres espèces radicalaires	67
3.	Sources non mitochondriales des EAOs.....	67
E.	Système de gestion des EAOs	68
1.	Inhibition de la formation des EAOs.....	68
2.	Détoxification directe des EAOs	69
a.	Système enzymatique	69
b.	Les «piègesurs» d'EAOs	71
3.	Régulation des mécanismes oxydatifs.....	72
4.	Synergie des systèmes	73
5.	Gestion spécifique des mEAOs : activité des UCPs	74
a.	Le «mild uncoupling»	74
b.	L'activation d' UCP2 par les EAOs : un rétrocontrôle négatif	75
F.	Importance physiologique des EAOs	75
1.	L'homéostasie redox	75
2.	Régulation des voies de signalisation et de l'expression génique	78
a.	Mécanisme biochimique : oxydation des résidus cystéine.....	78
b.	Régulation redox des protéines kinases et phosphatases.....	78
c.	Régulation redox des facteurs de transcription	79
G.	Métabolisme redox – pathologies métaboliques	80
H.	Les EAOs mitochondriales : de véritables « senseurs » métaboliques	81
VII.	La dynamique mitochondriale	84
A.	La dynamique des mitochondries	85
1.	Les acteurs de la dynamique mitochondriale	87
2.	Régulation de la fission/fusion de mitochondries	89
B.	Rôle physiologique de la dynamique mitochondriale	91
1.	Dynamique mitochondriale et transport d'énergie dans les neurones	91
2.	Dynamique mitochondriale et intégrité de l'ADN mitochondrial	92
3.	Morphologie mitochondriale, stress et apoptose	93
C.	Dynamique mitochondriale et maladies neurodégénératives.....	94

D.	Mitose et dynamique mitochondriale	95
E.	Dynamique mitochondriale et métabolisme	96
1.	Dynamique mitochondriale et cellule β	97
2.	Dynamique mitochondriale lors de l'hyperglycémie et production d'EAOs	99
	Objecif du travail et démarches scientifiques	102
	Résultats et Discussion.....	106
	Résultats	107
I.	Fission mitochondriale lors d'une hyperglycémie cérébrale.....	107
A.	Adressage de DRP1 à la mitochondrie en réponse à une hyperglycémie cérébrale.....	107
B.	L'adressage de DRP1 est responsable d'une fragmentation mitochondriale lors d'une hyperglycémie dans le VMH.	109
II.	Implication de la fission des mitochondries dépendante de DRP1 dans la détection hypothalamique du glucose	110
A.	L'inhibition transitoire de DRP1 dans le VMH inhibe la fission mitochondriale <i>in vivo</i>	110
B.	L'inhibition de DRP1 entraine une inhibition de la fission et un allongement des mitochondries	113
C.	Effet de l'inhibition de la fission mitochondriales sur la prise alimentaire et le poids corporel	114
D.	Conséquence de l'inhibition de la fission mitochondriale dépendante de DRP1 sur la sensibilité du VMH au glucose	119
1.	Inhibition de DRP1 et détection hypothalamique du glucose : signalisation mEAOs et sécrétion d'insuline	120
2.	Inhibition de DRP1, détection hypothalamique du glucose : signalisation mEAOs et signal satiétogène	124
3.	Inhibition de la fission dépendante de DRP1 dans le VMH et activité de la CRM	128
	Discussion	135

Conclusion et Perspectives	144
Articles.....	149
Bibliographie.....	213

ABRÉVIATIONS

SNC : Système nerveux central

SNA : Système nerveux autonome

PA : Prise alimentaire

TC : Tronc cérébral

DMX : Noyau dorsal moteur du nerf vague

NTS : Noyau du tractus solitaire

NA : Noyau arqué

VMN : Noyau ventromédian

DMN : Noyau dorsomédian

PVN : Noyau paraventriculaire

LH : Hypothalamus latéral

SNPS : Système nerveux parasympathique

SNS : Système nerveux sympathique

IML : Colonne inter-médio-latérale

PP : Polypeptide P

CCK : Choécystokinine

GIP : Glucose-dependent insulintropic peptide

GLP-1 : Glucagon like peptide 1

VIP: Vasoactive intestinal peptide

PACAP: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide

GRP: Gastrin releasing peptide

CGRP : Calcitonin gene-related peptide

NPY: Neuropeptide Y

PI3K : Phosphoinositide 3 kinase

PKA : protéine kinase A

TG : Triglycérides

AGL : Acides gras libres

HSL : Hormone Sensitive Lipase

PRV : Pseudorabies Virus

α -MSH : α -melanocyte stimulating hormone

pRB : retinoblastoma protein

PV1 : Plasmalemmal vesicle-associated protein 1

AgRP : Agouti Related Peptide

CART : Cocaïne and Amphetamine Regulated Peptide

Icv: Intra-cérébro-ventriculaire

POMC: Pro-opiomélanocortine

α -MSH : α -Melanocyte stimulating hormone

GABA : γ -aminobutyrique

CRH : Corticotropin Releasing Hormone

TRH : Thyrotropin Releasing Hormone

MCH: Melanin Concentrating Hormone

SF-1 : facteur stéroïdogénique 1

BDNF: brain-derived neurotrophic factor

VTA : Aire tegmentale ventrale

Nac : noyau accumbens

ACTH: Adreno Cortico Tropic Hormone

TSH : Thyroid Stimulating Hormone

IRS : Insulin Receptor Substrate

AGL: Acides Gras Libres

mEAOs : d'Espèces Actives de l'Oxygène mitochondriales

CPT : carnitine palmitoyltransférase

acyl-CoA LC : acyl-coenzyme A L-Carnitine

AMP: Adenosine Mono Phosphate

AMPK: Adenosine Mono Phosphate kinase

ACC : Acétyl-CoA Carboxylase

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de l'homéostasie énergétique.	19
Figure 2 : Boucle de rétrocontrôle des nutriments et hormones circulants, intégrés au niveau central et permettant la régulation de l'homéostasie énergétique et de la prise alimentaire.....	21
Figure 3 : Schéma d'un cerveau de rongeur montrant les différentes régions hypothalamiques impliquées dans la régulation nerveuse du métabolisme énergétique.....	23
Figure 4 : Représentation schématique en trois dimensions des différents noyaux hypothalamiques.....	24
Figure 5 : Organisation générale du SNA Sympathique et parasympathique sur les principaux organes cibles du métabolisme énergétique.....	25
Figure 6 : Effets de la stimulation du système nerveux autonome à partir des noyaux de l'hypothalamus ventromédian (VMH) et latéral (LH) sur différents organes impliqués dans la régulation du métabolisme.	26
Figure 7 : Représentation schématique des connexions entre l'hypothalamus, le tronc cérébral, les principales voies nerveuses du système nerveux autonome et leurs tissus ou organes cibles.....	27
Figure 8 : Représentation schématique de la détection et de l'intégration des paramètres métaboliques et endocriniens périphériques par les neurones du NA.	30
Figure 9 : Circuits neuronaux activés lors de la détection hypothalamique de nutriments.	32
Figure 10 : Schéma représentant l'action de l'insuline et de la leptine sur le NA.....	39
Figure 11 : Représentation schématique potentielle du contrôle de la prise alimentaire <i>via</i> la modulation du métabolisme mitochondrial par les facteurs métaboliques et hormonaux.....	42
Figure 12 : Schéma représentant le mécanisme impliqué dans la sécrétion d'insuline par la cellule β du pancréas	45
Figure 13 : Schéma présentant la régulation nerveuse de la sécrétion d'insuline par le système nerveux autonome lors d'une hyperglycémie cérébrale.....	50

Figure 14 : Activation hypothalamique de cfos lors d'une hyperglycémie cérébrale.	51
Figure 15 : Représentation schématique de l'activation électrique des 4 sous types neuronaux du NA en réponse à une variation de glucose.....	52
Figure 16 : Représentation schématique du couplage Astrocyte / Neurones de la détection du glucose.	54
Figure 17 : Le transit des électrons au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale.	60
Figure 18 : Principe du découplage	61
Figure 19 : Le transit des électrons au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale	63
Figure 20 : Schéma simplifié du fonctionnement mitochondrial.....	64
Figure 21 : Mécanisme d'action des enzymes antioxydantes et localisation subcellulaire	70
Figure 22 : La thiorédoxine réduite, réducteur de résidus cystéine oxydés.	73
Figure 23 : Régénération du glutathion réduit par la glutathion réductase	73
Figure 24 : L'activation des UCPs par les Espèces Actives de l'Oxygène.....	76
Figure 25 : L'homéostasie redox.	77
Figure 26 : Étude <i>in vivo</i> de l'implication des mEAOs dans le « glucose sensing » hypothalamique.....	83
Figure 27 : Tests utilisés pour l'étude de la fusion mitochondriale basés sur l'échange de protéines fluorescentes entre mitochondries.....	86
Figure 28 : La dynamique mitochondriale.....	88
Figure 29 : Une hyperglycémie cérébrale transitoire provoque un adressage de DRP1 à la mitochondrie dans le VMH.....	108
Figure 30 : Immunohistochimie sur coupe au niveau du noyau arqué, représentative du réseau mitochondrial après injection carotidienne de glucose.	110
Figure 31 : L'injection de siRNA dirigés contre l'ARNm codant pour DRP1 permet d'atteindre une inhibition maximale d'environ 80% 72h après l'injection.....	112
Figure 32 : Immunohistochimie sur coupe au niveau du NA, représentative du réseau mitochondrial après injection des siRNA DRP1 ou Control.....	113
Figure 33 : L'inhibition de DRP1 dans le VMH est associée à une hyperphagie sans modification du poids corporel.	115
Figure 34 : Absence de modification de l'expression des ARNm des neuropeptides NPY et POMC du VMH chez les animaux siDRP1.	116

Figure 35 : Augmentation d'expression de l'ARNm codant pour UCP1 dans le tissu adipeux brun interscapulaire chez les rats siDRP1.....	117
Figure 36 : Absence de modification de la glycémie et de l'insulinémie à 72hchez les rats siDRP1.....	118
Figure 37 : Diminution du contenu hépatique en glycogène chez les rats siDRP1.	119
Figure 38 : Diminution de la sensibilité au glucose du VMH associée à une inhibition de la production de mEAOs lors de l'hyperglycémie.....	121
Figure 39 : Aucune modification de la sensibilité au glucose des îlots pancréatiques des animaux siDRP1.....	123
Figure 40 : Augmentation de la libération d'insuline en réponse à la stimulation par l'acétylcholine dans les îlots des rats siDRP1.....	124
Figure 41 : Inhibition de la prise alimentaire par l'injection de glucose dans le NA lors d'un test de réalimentation.....	125
Figure 42 : Perte de l'inhibition de la prise alimentaire lors d'un test de réalimentation en réponse à une injection de Glucose dans le NA chez les rats siDRP1.	126
Figure 43 : Inhibition de la production d'EAOs lors de l'injection cérébrale de glucose au cours du test de réalimentation.....	127
Figure 44 : Aucune modification de la consommation basale d'O ₂ dans le VMH entre les rats siControl et siDRP1	128
Figure 45 : Diminution de la stimulation de la consommation d'O ₂ dans le VMH chez les rats siDRP1 après stimulation par du glutamate.....	129
Figure 46 : Diminution de la stimulation de la consommation d'O ₂ dans le VMH chez les rats siDRP1 après stimulation par l'ADP.....	130
Figure 47 : La respiration indépendante du couplage n'est pas modifiée chez les rats siDRP1.....	131
Figure 48 : Diminution du quotient respiratoire chez les rats siDRP1.....	132
Figure 49 : Aucune modification de la respiration maximale dans le VMH entre les rats siControl et siDRP1.....	133
Figure 50 : Pas de modification de l'expression des ARNm d'UCP2 dans le VMH des rats siDRP1.....	134
Figure 51 : Conclusion du travail.....	143

INTRODUCTION

Préambule

L'homéostasie énergétique est un état d'équilibre dynamique entre les apports et les dépenses d'énergie permettant le maintien d'un milieu intérieur stable, à l'échelle d'une journée ou de la vie. Les apports trouvent leur origine dans l'alimentation, tandis que les dépenses résultent principalement de l'ensemble des réactions biochimiques nécessaires au fonctionnement minimal de toutes les cellules (le métabolisme basal), de la thermogénèse et de l'activité physique (**Figure 1**).

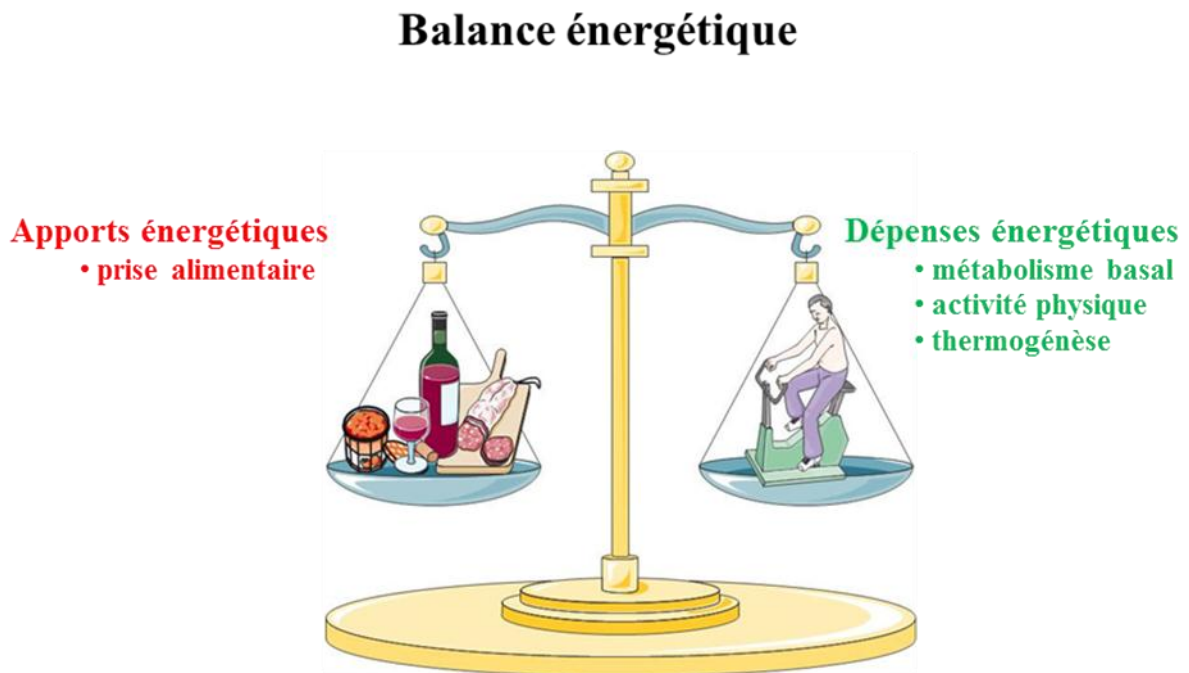


Figure 1 : Représentation schématique de l'homéostasie énergétique.

Par la tenue de cet équilibre, un individu conserve au cours de sa vie adulte un poids corporel stable. En cas de déséquilibre, tout un système de régulations se met en place afin de rétablir le poids corporel à sa valeur de référence, c'est la notion de pondérostasie.

L'homéostasie énergétique est contrôlée à la fois par les organes périphériques (foie, pancréas, muscle, tissu adipeux...) et le système nerveux central (SNC). La régulation nerveuse de l'homéostasie énergétique à court- ou long-terme implique que le SNC soit informé en permanence du statut énergétique de l'organisme par des signaux issus de la périphérie. Il existe donc un dialogue entre périphérie et SNC, faisant intervenir des signaux complémentaires et en interaction, de nature hormonale (insuline, leptine, ghréline,...), métabolique (glucose, acides gras, protéines...) et nerveuse (SNC et système nerveux autonome (SNA)) (**Figure 2**).

L'analyse de ces informations périphériques par le SNC déclenche des réponses adaptées à la fois comportementale (ajustement de la prise alimentaire (PA)), neuro-endocrine (système hypothalamo-hypophysaire) et végétatives (modification de l'activité d'organes et tissus périphériques par l'intermédiaire du SNA). Cet équilibre est également sous l'influence de facteurs indépendants au métabolisme de l'organisme comme par exemple les phénomènes sociaux, cognitifs ou, d'une manière plus générale, l'environnement. Ils sont importants, notamment chez l'Homme, mais difficilement contrôlables ou mesurables.

Dès 1953, Jean Mayer énonçait une théorie dite « glucostatique » permettant d'expliquer la régulation de la PA à court-terme (Mayer, 1953). En effet, ses travaux montraient que la PA était augmenté en quelques minutes en réponse à une hypoglycémie. Il postula ainsi l'existence d'un mécanisme central de régulation à court-terme permettant d'ajuster les dépenses énergétiques et la PA en fonction des besoins afin de maintenir un statut énergétique constant. Ce mécanisme dépendrait étroitement des réserves et de la disponibilité en glucides de l'organisme. Cette théorie suppose donc l'existence de mécanismes centraux permettant de détecter des variations du taux de glucose circulant pour permettre une réponse adaptée. Sur un modèle similaire, l'hypothèse d'un mécanisme « lipostatique » fondé sur le maintien de la proportion de graisses mobilisées en fonction de la masse adipeuse a été proposée. Dans ce cadre, les concentrations de deux hormones majeures du métabolisme, l'insuline et la leptine, sont sur le long terme des informations pour le SNC de l'état d'adiposité de l'organisme. Ainsi, une augmentation des réserves en graisse augmenterait proportionnellement leur mobilisation et donc leur utilisation par les tissus, diminuant ainsi les besoins en glucides. Les mécanismes de régulation à long-terme qui seraient ainsi dictés par le statut lipidique, permettraient de corriger ou d'ajuster les mécanismes de régulation à court-terme dépendants du statut glucidique (van Itallie, 1990).

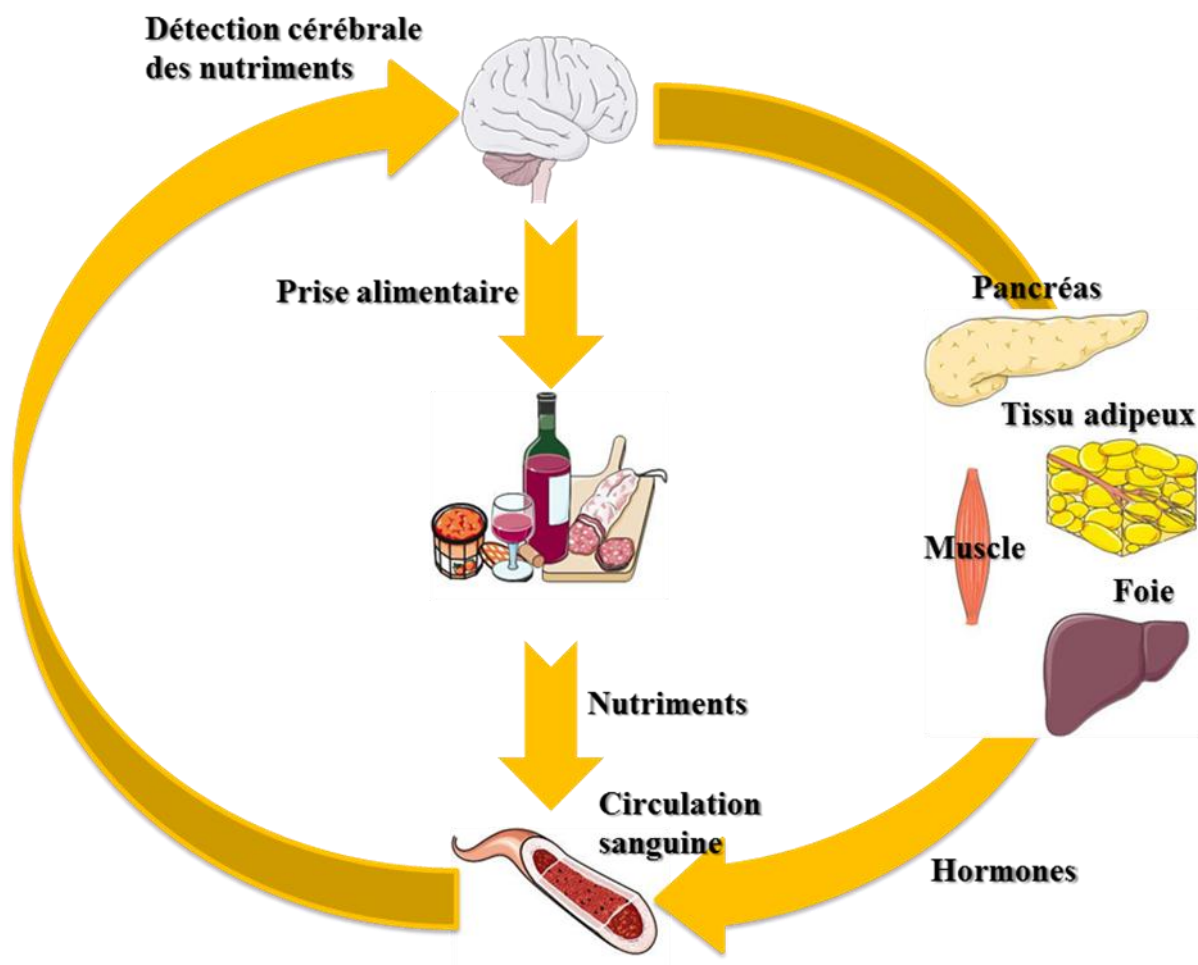


Figure 2 : Boucle de rétrocontrôle des nutriments et hormones circulants, intégrés au niveau central et permettant la régulation de l'homéostasie énergétique et de la prise alimentaire.

Anand et Chhina en 1964, puis Oomura en 1969 révèlent l'existence de neurones hypothalamiques répondant au glucose en termes d'activité électrique, mettant ainsi en évidence le rôle crucial du SNC dans la détection et l'intégration des signaux énergétiques (Anand et al., 1964; Oomura et al., 1969).

Le glucose est un substrat circulant majeur pour informer le SNC de l'état énergétique de l'organisme. En effet, sa concentration est précisément contrôlée, ce qui lui confère, mis à part son rôle énergétique, une valeur informative particulière au regard des autres signaux dont les concentrations sont contenues dans un intervalle plus variable. Ainsi, la concentration circulante en glucose est en permanence maintenue à 1g/L. Tout éloignement de cette valeur de référence met en jeu des systèmes de détection qui aboutissent à un retour précis à cette

valeur. Ces systèmes représentent des processus fondamentaux du maintien de l'homéostasie énergétique. De plus, les mécanismes de régulation de la glycémie sont parmi les mieux connus, et de nombreux sites de détection de la glycémie sont identifiés aussi bien en périphérie qu'au niveau du SNC.

Au cours de ce travail, je me suis intéressé aux mécanismes mis en jeu lors de la détection du glucose au niveau hypothalamique. Je m'attacherai donc dans cette introduction à présenter en particulier la détection du glucose au niveau du SNC et la régulation nerveuse du métabolisme en lien avec cette détection. Finalement, je focaliserai mon exposé sur la mitochondrie, en effet, dans l'équipe, il a été montré que celle-ci est indispensable aux signalisations qui permettent une réponse adaptée par l'hypothalamus lors de la détection d'une hyperglycémie.

I. Régulation nerveuse de l'homéostasie énergétique

A. Principales structures impliquées

1. Le système nerveux central : cas de l'hypothalamus

Parmi les structures du SNC impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique, le tronc cérébral (TC) et l'hypothalamus occupent une place primordiale. Ils jouent notamment le rôle de point d'arrivée des informations. Les afférences issues de différents organes périphériques (foie, pancréas, tractus digestif, tissu adipeux, etc...) arrivent principalement au TC au niveau du bulbe rachidien. Les informations circulantes, elles, (hormones et nutriments) arrivent également à ces deux niveaux (**Figure3**).

Le TC comporte des noyaux-relais primordiaux entre l'hypothalamus et le SNA, comme le noyau dorsal moteur du nerf vague (DMX) et le noyau du tractus solitaire (NTS) (Fox and Powley, 1985; Powley, 2000a, b). Il contient la majorité des neurones pré-ganglionnaires vagues qui sont les cibles de projections issues notamment de l'hypothalamus

(Luckman and Lawrence, 2003). Son organisation lui permet d'être ainsi un centre intégrateur et un relais essentiel, par le nerf vague, jusqu'aux organes du métabolisme.

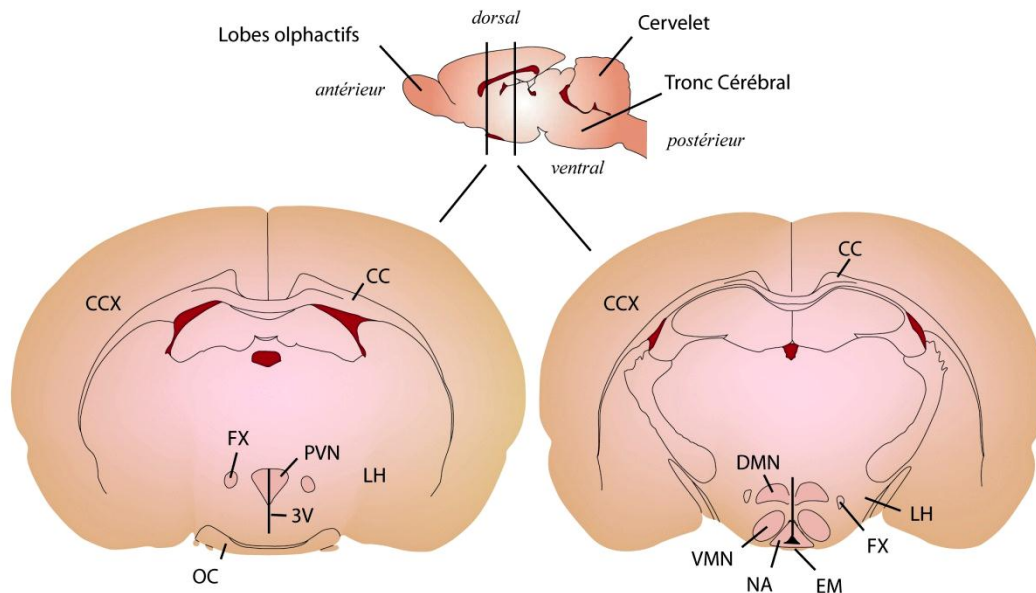


Figure 3 : Schéma d'un cerveau de rongeur montrant les différentes régions hypothalamiques impliquées dans la régulation nerveuse du métabolisme énergétique. L'insert du haut représente une coupe longitudinale du cerveau. Les deux traits verticaux localisent le niveau des deux coupes frontales représentées en dessous. Abréviations : CC (corps calleux), CCX (cortex cérébral), FX (fornix), PVN (noyau paraventriculaire), DMN (noyau dorsomédian), LH (hypothalamus latéral), VMN (noyau ventromédian), 3V (3^{ème} ventricule), NA (noyau arqué), EM (éminence médiane), OC (chiasma optique).

Dans le cadre de la détection du glucose, l'hypothalamus est le centre intégrateur le plus étudié et le mieux documenté (Horvath et al., 2009). C'est une structure diencephalique constituée de plusieurs noyaux, parmi lesquels les noyaux arqué (NA), ventromédian (VMN), dorsomédian (DMN), paraventriculaire (PVN) ainsi que l'hypothalamus latéral (LH). Ces principaux noyaux jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'homéostasie énergétique (**Figure 4**). De façon générale, la région périventriculaire de l'hypothalamus est impliquée dans la détection des signaux circulants (issus du sang et du liquide céphalorachidien) et dans l'organisation des réponses endocriniennes (*via* les projections sur l'hypophyse et l'éminence médiane). La région médiane, composée de noyaux tels le DMN et le VMN, reçoit de nombreuses afférences nerveuses et est impliquée dans les comportements adaptatifs. Enfin,

la région latérale, qui ne comprend pas de noyaux clairement identifiés, est considérée comme étant l'interface entre l'hypothalamus, et les systèmes moteurs autonome et somatique. Le PVN présente la particularité d'être impliqué dans le contrôle à la fois des sécrétions hypophysaires, du SNA et de nombreux comportements (Williams et al., 2001).

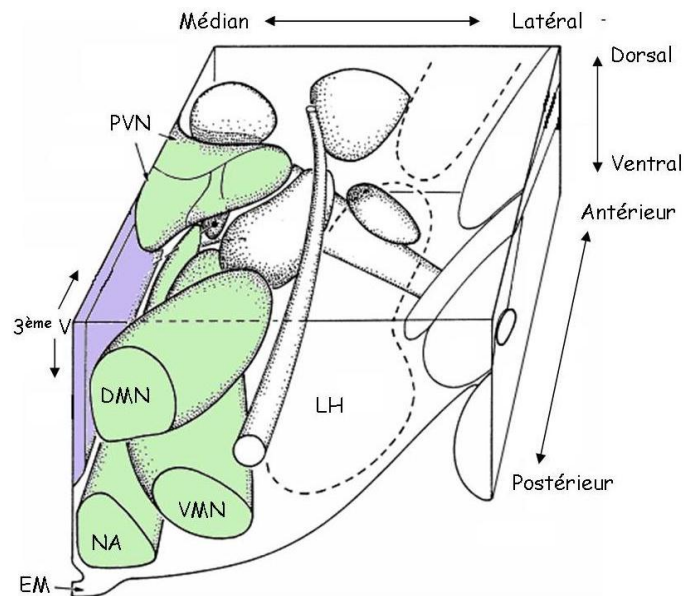


Figure 4 : Représentation schématique en trois dimensions des différents noyaux hypothalamiques. D'après Berthoud, 2002.

II. Le contrôle du métabolisme énergétique par le SNA

Le SNA contrôle les fonctions végétatives de l'organisme constitué des systèmes nerveux parasympathique (SNPS) et sympathique (SNS). C'est une voie efférente majeure, en effet, il innervé la majorité des organes et tissus périphériques impliqués dans le métabolisme (**Figure 5**). Ainsi, de façon schématique, l'augmentation du tonus parasympathique a lieu en situation d'excès énergétique et son action est anabolique (activé au cours du repas puis en phase post-prandiale). Son activation induit principalement le stockage énergétique (glycogénogénèse et lipogénèse). A l'inverse, le SNS est activé lors d'un déficit énergétique (lors d'un jeûne ou à distance d'un repas) et son action est catabolique : il induit la mobilisation du glucose et des acides gras libres (AGL) à partir des tissus de réserves, ou

encore la cétoxygénèse hépatique (Scheurink and Nolan, 1996). Les effets du SNA sont soit directs sur les tissus cibles qu'il innerve, soit indirects par la libération d'hormones que son activation provoque (pancréas, glandes surrénales) (**Figure 6**).

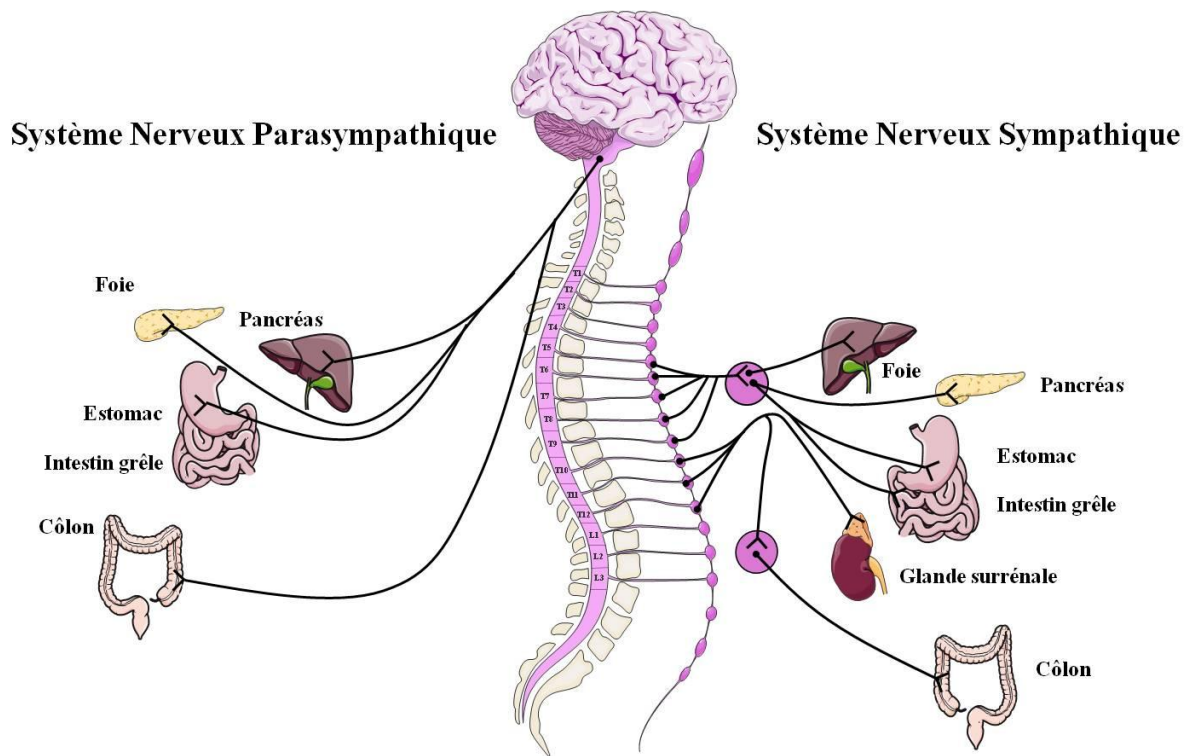


Figure 5 : Organisation générale du SNA Sympathique et parasympathique sur les principaux organes cibles du métabolisme énergétique.

L'information traitée au niveau hypothalamique est transmise au SNA par le LH et le VMN principalement (Luiten et al., 1987). Les fibres du LH sont en relation directe avec le DMX, le NTS et les noyaux ambigus qui contiennent la majorité des fibres pré-ganglionnaires du SNPS. Le VMN est lui en connexion avec les fibres pré-ganglionnaires sympathiques situées dans la colonne inter-médio-latérale (IML) de la moelle épinière (**Figure 7**).

Les noyaux DMN et PVN modulent également l'activité du SNA. Le DMN reçoit des projections du LH et du VMN et se projette sur le DMX, alors que le PVN émet des projections à la fois sur les groupements cellulaires médullaires parasympathiques et sur l'IML sympathique au niveau thoraco-lombaire (Shapiro and Miselis, 1985a, b).

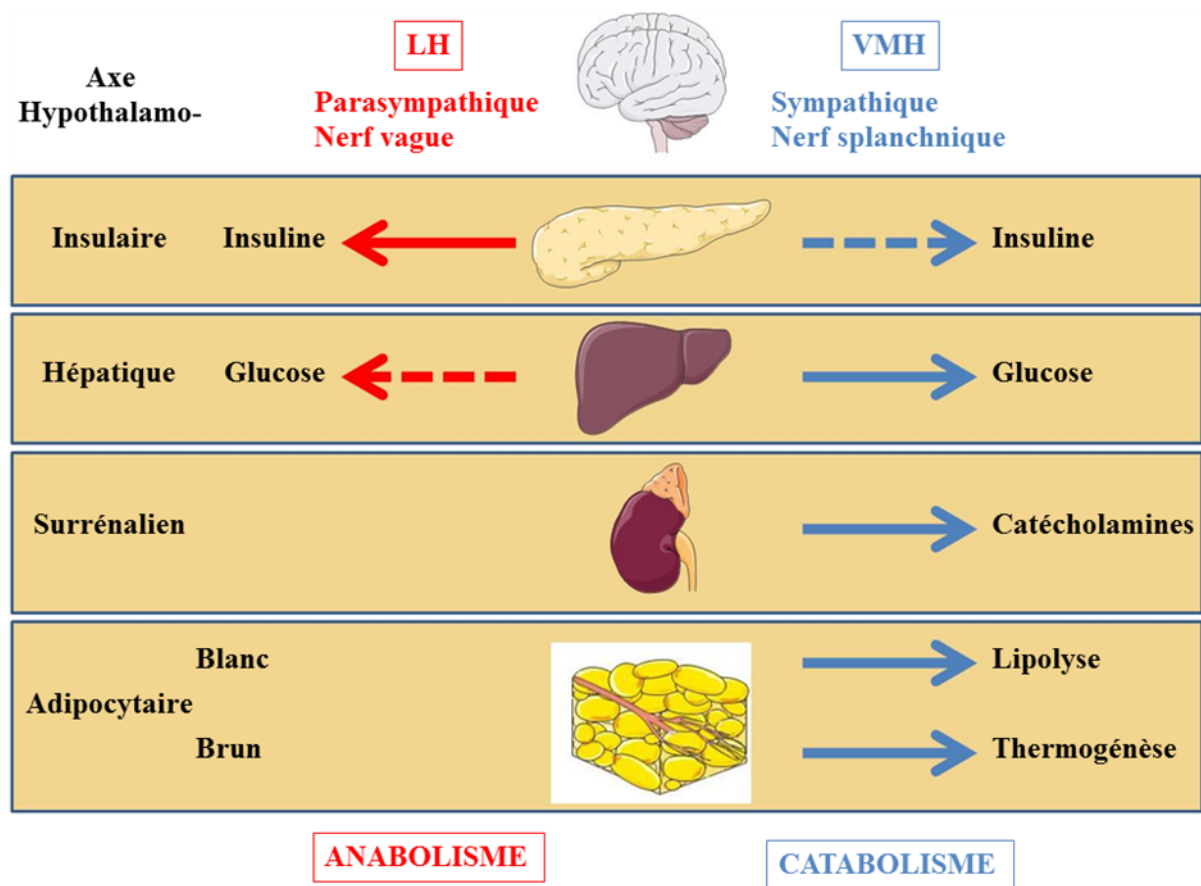


Figure 6 : Effets de la stimulation du système nerveux autonome à partir des noyaux de l'hypothalamus ventromédian (VMH) et latéral (LH) sur différents organes impliqués dans la régulation du métabolisme.

—▶ Activation, ▶ Inhibition

Les interrelations entre l'hypothalamus et l'activité du SNA seront détaillées plus loin, uniquement en relation avec les signaux perçus par l'hypothalamus et les populations neuronales identifiées (quand elles sont connues) dans cette structure.

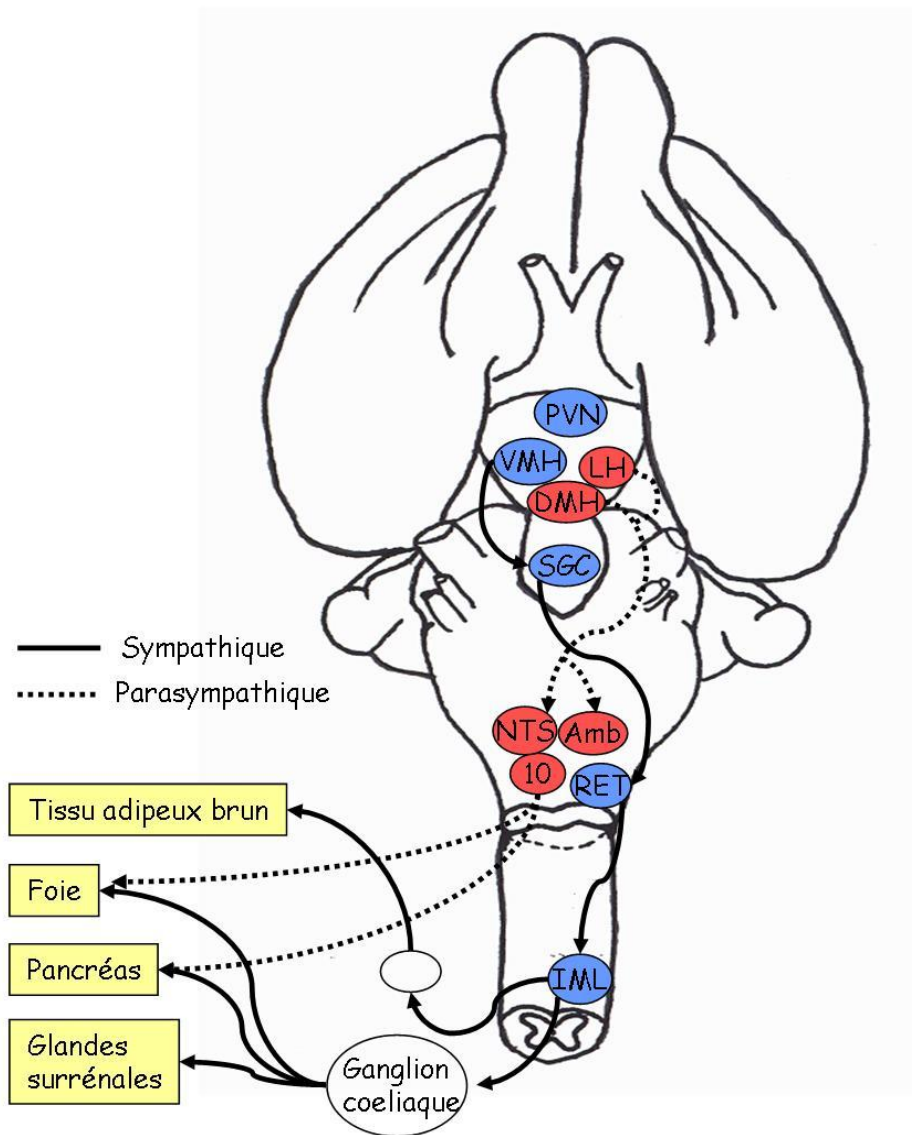


Figure 7 : Représentation schématique des connexions entre l'hypothalamus, le tronc cérébral, les principales voies nerveuses du système nerveux autonome et leurs tissus ou organes cibles.

PVN : noyau paraventriculaire, VMH : hypothalamus ventro-médian, LH : hypothalamus latéral, DMH : hypothalamus dorso-médian, SGC : substancia grisea centralis, NTS : noyau du tractus solitaire, 10 : noyau moteur du vague, Amb : Noyau ambigu, RET : formation réticulée, IML : colonne intermedio-latérale

III. Populations neuronales de l'hypothalamus

De nombreuses populations neuronales ont été identifiées au niveau hypothalamique et ont un impact sur l'activité de celui-ci. Ces populations sont dites de premier ou second ordre selon qu'elles détectent directement ou secondairement les signaux humoraux. Elles sont en grande partie identifiées par leur effet orexigène ou anorexigène. Les neurones de 2nd ordre sont principalement localisés dans le PVN et le LH et reçoivent des projections des neurones NPY et POMC (**Tableau 1**). On trouve aussi des neurones de 2nd ordre dans le DMN et le VMN mais leur identité en termes de neuropeptides reste mal connue.

	Effets Orexigènes	Effets Anorexigènes
Neuropeptides synthétisés dans le NA	NPY / AgRP	α -MSH / CART Neuromédine U
Neuropeptides synthétisés essentiellement dans le PVN et le LH	Orexines MCH Ghréline	TRH CRH Ocytocine

Tableau 1 : Principaux neuropeptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique.

NPY (Neuropeptide Y), AgRP (Agouti Related peptide), α -MSH (α -Melanocyte Stimulating Hormone), CART (Cocaïne & Amphetamine-Related Transcript), MCH (Melanin-Concentrating Hormone), TRH (Thyrotropin-Releasing Hormone), CRH (Corticotropin-Releasing Hormone).

A. Le noyau arqué

La lésion spécifique du NA conduit au développement d'une obésité associée à une hyperphagie (Bergen et al., 1998; Meister et al., 1989). Ainsi, un certain nombre de travaux

ont permis d'attribuer au NA un rôle fondamental dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Ce rôle est lié à la fois à sa localisation et son organisation. En effet, le NA est localisé à la base du 3^{ème} ventricule et à proximité de l'éminence médiane au niveau de laquelle la barrière hémato encéphalique (BHE) est perméable (Ganong, 2000; Norsted et al., 2008). En effet, à ce niveau, l'endothélium est fenestré, et on observe l'expression de la «Plasmalemmal vesicle-associated protein 1 » (PV1), protéine également exprimée au niveau des capillaires irriguant des organes où les échanges avec la circulation sanguine sont importants (comme les tubules rénaux). Dans la région hypothalamique, PV1 est exprimée à proximité des neurones du NA impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et du métabolisme énergétique (Ciofi et al., 2009). Cette fenestration permettrait donc le passage paracellulaire de facteurs circulants (glucose, lipides, hormones...) vers le parenchyme nerveux. Le NA serait ainsi le premier noyau hypothalamique à détecter les signaux humoraux périphériques (Berthoud, 2002; Ciofi et al., 2009; Cone et al., 2001; Shin et al., 2009). Cette hypothèse est par ailleurs renforcée par les études montrant que ce noyau exprime tous les acteurs nécessaires à la détection de ces signaux permettant à certains neurones d'y répondre directement. Enfin, le NA présente des projections vers tous les autres noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique, ainsi que vers le tronc cérébral (**Figure 8**).

On classe ainsi les neurones du NA comme étant les premiers qui détectent les signaux humoraux. Le NA est le relais des informations vers les autres noyaux hypothalamiques. Ces derniers contiennent des neurones dits de 2nd ordre qui reçoivent les afférences des neurones du NA (**Figure 9**) (Blouet and Schwartz, 2010; Levin et al., 2004). Toutefois, la détection directe des signaux circulants dans le LH et dans le VMN, a été mise en évidence récemment (Karnani and Burdakov, 2011). Le NA renferme schématiquement deux grandes populations neuronales (les plus étudiées) qui se projettent sur les autres noyaux hypothalamiques d'intérêt. Ces deux populations, aux rôles antagonistes sont, les neurones orexigènes à neuropeptide Y (NPY) qui coexpriment l'Agouti Related Peptide (AgRP) et les neurones anorexigènes à pro-opiomélanocortine (POMC) coexprimant le Cocaïne and amphetamine Regulated Transcript (CART) (Grill and Kaplan, 2002; Hillebrand et al., 2002; Williams et al., 2004) (**Figure 9**).

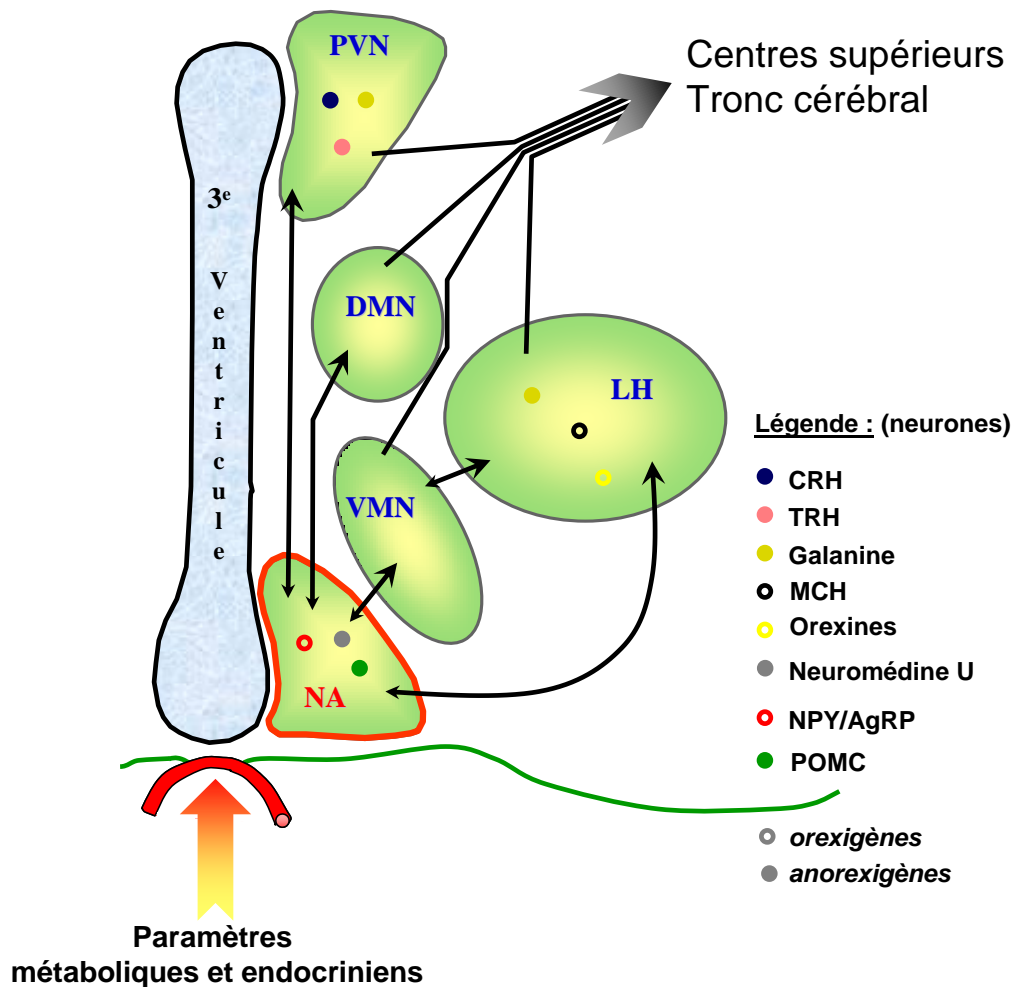


Figure 8 : Représentation schématique de la détection et de l'intégration des paramètres métaboliques et endocriniens périphériques par les neurones du NA. Les informations sont alors relayées aux neurones présents dans les autres noyaux hypothalamiques avant d'être acheminées vers des centres supérieurs et le tronc cérébral.

L'AgRP est co-localisée dans 90% des neurones à NPY du NA (Hahn et al., 1998) et serait libéré en même temps que ce dernier. Les neurones à NPY/AgRP font partie du système orexigène ou anabolique. Les effets du NPY ont fait l'objet d'un grand nombre d'études. Le NPY est un puissant orexigène, comme l'AgRP. Les études montrent que l'injection intracérébro-ventriculaire (icv) ou intra hypothalamique de NPY stimule la PA (Stanley et al., 1986) et diminue les dépenses énergétiques en diminuant l'activité thermogénique du tissu adipeux brun (Billington et al., 1991). De plus, l'injection continue ou répétée de NPY conduit au développement d'une obésité associée à une hyperphagie, une augmentation de l'insulinémie basale et de la lipogenèse dans le foie et le tissu adipeux (Zarjevski et al., 1993). L'expression du gène et la libération du peptide sont stimulées lorsque l'équilibre énergétique

est négatif, c'est-à-dire lorsque les dépenses d'énergie sont supérieures aux apports (jeûne, hypoglycémie...) (Leibowitz and Wortley, 2004; Schwartz, 2001). Ainsi, les nutriments circulants et les hormones modulent son expression. Des taux élevés de ghréline et de glucocorticoïdes augmentent son expression alors que des concentrations élevées de leptine et d'insuline la diminuent (Williams et al., 2001). Enfin, les nutriments sont également responsables de l'activation des neurones NPY et de son augmentation d'expression/relargage (glucose et régime hyperlipidique ou riche en carbohydrates) (Beck, 2006).

Néanmoins, la délétion du gène n'entraîne pas de diminution de la PA et du poids aussi fortement qu'attendu (Erickson et al., 1996). Cette quasi-absence phénotypique laisse suggérer que les nombreux systèmes orexigènes sont redondants et peuvent se compenser.

Le NPY exerce ses effets orexigènes ou anaboliques par l'intermédiaire, essentiellement, des récepteurs de type Y1 et Y5 (Kushi et al., 1998; Schaffhauser et al., 1997). En revanche, le mode d'action de l'AgRP est sensiblement différent puisqu'il n'active pas de récepteur qui lui soit propre. Il exerce son effet orexigène en inhibant le système anorexigène à mélanocortine du NA. En effet, le peptide AgRP est un antagoniste des récepteurs MC4-R et MC3-R, qui lie l' α -Melanocyte Stimulating Hormone (α -MSH), anorexigène, libérée par les terminaisons des neurones POMC (Fan et al., 1997; Leibowitz and Wortley, 2004; Ollmann et al., 1997) (**Figure 9**).

Les neurones POMC co-expriment un autre peptide : CART (Elias et al., 1998). Ces neurones font partie du système anorexigène ou catabolique. Le peptide précurseur POMC est clivé pour donner, entre autres, l' α -MSH. L'implication de ce peptide dans le maintien de l'homéostasie énergétique a été mise en évidence suite au clonage des récepteurs MC3-R et MC4-R. La délétion du gène MC4-R entraîne le développement d'une hyperphagie accompagnée d'une obésité sévère chez la souris (Huszar et al., 1997). De plus, différentes mutations de ce gène sont associées au développement de l'obésité chez l'enfant (Vaisse et al., 1998; Yeo et al., 1998). Enfin, les neurones POMC ont été montrés comme étant activés uniquement après un repas (Olszewski et al., 2001) (**Figure 9**).

Des injections icv de CART diminuent la PA, alors que celle-ci est augmentée suite à l'injection d'anticorps dirigés contre ce peptide (Kristensen et al., 1998). Les neurones POMC du NA constituent la population la plus importante du SNC, et on en trouve également au niveau de l'hippocampe et du NTS (Berthoud et al., 2006; Cone, 2005).

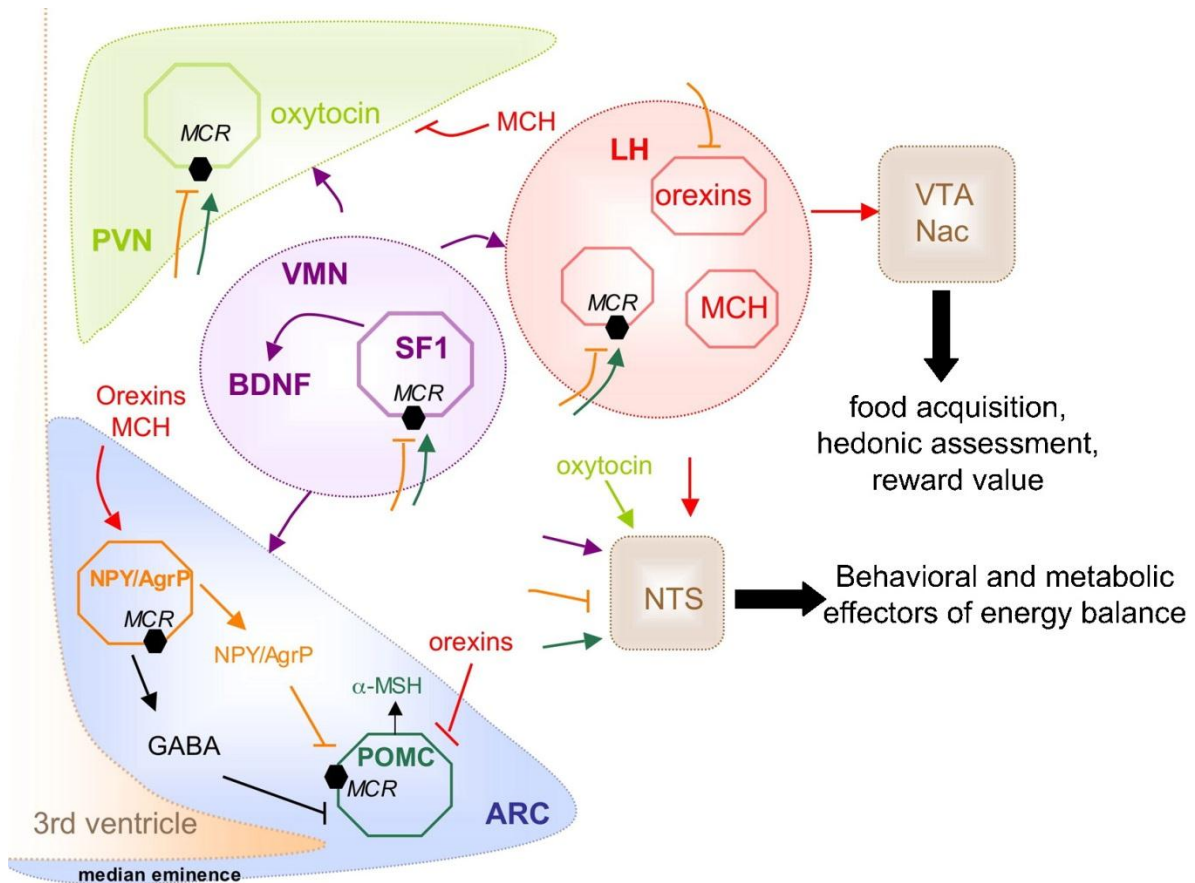


Figure 9 : Circuits neuronaux activés lors de la détection hypothalamique de nutriments. Le système mélanocortinergique est le mieux caractérisé lors de la détection hypothalamique des nutriments. Les neurones POMC anorexigènes et NPY orexigènes du NA se projettent sur différents noyaux, dont le PVN, VMN et le LH. En retour, le NA reçoit des informations provenant du VMN et du LH ; ces deux noyaux sont interconnectés et se projettent également sur le PVN, centre intégrateur. Les neurones à orexines et MCH du LH interagissent avec le système à mélanocortine et intègrent les informations de ce système avec celles de la récompense/motivation, préalablement traitées dans l'aire tegmentale ventrale (VTA) et le noyau accumbens (Nac). Le NTS reçoit des projections provenant du NA, du PVN, du VMN et du LH, et intègre ces informations hypothalamiques descendantes ainsi que des signaux issue de la sphère digestive. L'ensemble permet de contrôler de multiples effecteurs comportementaux et métaboliques pour le maintien de l'homéostasie énergétique.
D'après Blouet, 2010.

Les neurones POMC du NA, comme les neurones NPY, projettent majoritairement vers le PVN et le LH (Kawano and Masuko, 2000; Legradi and Lechan, 1998, 1999; Lu et al., 2003). Ces deux populations projettent sur les mêmes neurones dans le PVN. Il s'agit de neurones à Corticotropin Releasing Hormone (CRH) et à Thyreotropin Releasing Hormone (TRH). Au niveau du LH, il s'agit de neurones à Melanin Concentrating Hormone (MCH) et à

orexines (Elias et al., 1998; Fekete et al., 2000a; Fekete et al., 2000b; Legradi and Lechan, 1999). Ces deux populations neuronales sont d'autant plus liées qu'elles établissent au niveau du NA des connexions fonctionnelles entre elles (Bagnol et al., 1999; Cowley et al., 2001; Roseberry et al., 2004). Dans ce circuit neuronal, les neurones NPY sont capables d'inhiber les neurones POMC via la libération d'acide γ -aminobutyrique (GABA), ainsi que d'avoir un effet antagoniste via l'AgRP. Ces neurones NPY et POMC peuvent également être la cible de l' α -MSH et de l'AgRP puisque ces neurones expriment les récepteurs MC4R (neurones POMC et NPY) et MC3-R (neurones NPY) (Mounien et al., 2005), ainsi, les agonistes des MC3/4-R dépolarisent alors que l'AgRP hyperpolarise les neurones POMC (Smith et al., 2007). Des neurones exprimant les récepteurs MC3/4R sont abondamment retrouvés dans le LH, VMN, PVN et le DMN au niveau hypothalamique, ainsi que dans le NTS et la moelle épinière (Mountjoy et al., 1994). De la même manière, les récepteurs au NPY sont retrouvés largement dans tout le SNC. Dans l'hypothalamus, les récepteurs au NPY de type Y1, Y2 et Y5 sont fortement exprimés dans le NA, le PVN et le VMN (Parker and Herzog, 1999). **(Figure 9)**

Le NA innerve également directement le tronc cérébral, en particulier le NTS. Ainsi, l'activation des MC4-R dans le tronc cérébral modifie l'activité électrique des neurones et conduit à une réduction de la PA (Grill et al., 1998; Williams et al., 2000), qui peut se produire via une modulation pré-synaptique glutamatergique de la transmission synaptique vagale depuis le tractus digestif (Wan et al., 2008). Cependant ces circuits restent à explorer plus amplement.

B. Les autres noyaux hypothalamiques

La destruction bilatérale du PVN conduit à une obésité associée à une hyperphagie (Aravich and Sclafani, 1983). Le PVN exerce donc un effet global anorexigène.

Au moins trois neuropeptides synthétisés dans le PVN diminuent la PA et la croissance pondérale : la CRH, la TRH et l'ocytocine (Glowa et al., 1992; Kow and Pfaff, 1991; Olson et al., 1991a; Olson et al., 1991b). La CRH stimule également la sécrétion d'Adreno Cortico Tropic Hormone (ACTH) par l'adénohypophyse, ce qui conduit à la production de glucocorticoïdes par les glandes surrénales. La TRH, elle, stimule la libération

d'hormones thyroïdiennes T3 et T4 via la sécrétion de Thyroid Stimulating Hormone (TSH). Les glucocorticoïdes et les hormones thyroïdiennes participent au contrôle de l'homéostasie énergétique en régulant notamment la production hépatique de glucose et la thermogénèse (Freake and Oppenheimer, 1995; Seitz et al., 1976). Une partie des neurones de 2nd ordre du PVN projettent sur les neurones pré-ganglionnaires du SNA en utilisant la CRH, la TRH et l'ocytocine comme neurotransmetteur (Leibowitz and Wortley, 2004; Sawchenko and Swanson, 1982; Williams et al., 2001) (**Figure 9**).

Le PVN est un important noyau dans l'intégration d'informations neuroendocrines ou du SNA, et c'est l'une des régions les plus innervées par les neurones POMC et NPY (Bagnol et al., 1999; Cone, 2005). L'injection d' α -MSH dans le PVN régule la prise alimentaire et les dépenses énergétiques (Cowley et al., 1999). Les fibres à ocytocine du PVN, activées lors de la prise alimentaire (Johnstone et al., 2006), innervent le NTS (Blevins et al., 2003; Sawchenko, 1987) qui intègre les signaux satiétogènes également issus de la sphère digestive. Il reçoit également des efférences corticales permettant de limiter la PA (Berthoud et al., 2006; Moran et al., 2001). *In vivo*, la stimulation électrique du PVN entraîne une libération d'ocytocine dans le NTS (Landgraf et al., 1990), et l'activation ocytocinergique du PVN par la PA contrôle les neurones du NTS. Ce contrôle met en jeu le système mélanocortinergique (Blevins et al., 2004; Kublaoui et al., 2008; Lokrantz et al., 1997; Maejima et al., 2009) (**Figure 9**).

Le VMN participe au contrôle de la satiété. La majorité des neurones qui constituent ce noyau sont glutamatergiques (Ziegler et al., 2002). Ce noyau est également impliqué dans le déclenchement de la réponse contre régulatrice lors d'une hypoglycémie. Ainsi, on trouve dans ce noyau des neurones dont l'activité est diminuée (neurones GI (gluco-inhibés)), ou augmentée (neurones GE (gluco-excités)), lors de l'augmentation de la glycémie et vice versa (Fioramonti et al., 2011; Song et al., 2001). Le VMN reçoit des projections mélanocortinergiques du NA, et envoie également des projections vers ce dernier, dont des projections glutamatergiques vers les neurones POMC (Sternson et al., 2005). Le VMN présente également des projections vers le PVN, LH, DMN et le NTS (Canteras et al., 1994; McClellan et al., 2006; Sclafani et al., 1975). Récemment, le facteur stéroïdogénique 1 (SF-1), exprimé dans des neurones du VMN a été suggéré comme impliqué dans le contrôle de l'homéostasie énergétique (Bingham et al., 2008; Kim et al., 2009; Zhang et al., 2008). Les

neurones SF-1 du VMN expriment MC4-R et libèrent le brain-derived neurotrophic factor (BDNF), un modulateur de la prise alimentaire (Majdic et al., 2002; Unger et al., 2007; Wang et al., 2007). En réponse, les tonus mélanocortinergiques contrôlent l'expression du BDNF (Xu et al., 2003). La perte de fonction du récepteur au BDNF conduit à une hyperphagie et une obésité (Lyons et al., 1999; Yeo et al., 2004). A l'inverse, l'administration (centrale ou en périphérie) de BDNF entraîne une diminution du poids corporel et de la PA, appuyant le rôle du BDNF comme un signal anorexigène en aval du système à mélanocortine (Xu et al., 2003). Enfin, plusieurs études montrent des réponses de ce circuit neuronal à des modifications de l'état nutritionnel ou lors d'injections icv de glucose (Sternson et al., 2005; Unger et al., 2007). **(Figure 9)**

Enfin, le LH est aussi un noyau hypothalamique où une détection directe des nutriments a été identifiée. De plus, les neurones du LH reçoivent et intègrent des informations sensorielles et de motivation, et se projettent vers le cortex, le système limbique, le thalamus et la moelle épinière en particulier, déclenchant alors des réponses comportementales ou nerveuses via le SNA (Berthoud, 2002). Deux groupes de neurones peptidergiques sont connus dans le LH, il s'agit des neurones à MCH et à orexines (A et B, aussi appelées hypocrélines), qui jouent un rôle majeur dans l'équilibre énergétique (Sakurai et al., 1998), en particulier via les interactions avec le système à mélanocortine. En effet, les neurones NPY du NA sont entourés par des terminaisons nerveuses à orexines (Muroya et al., 2004), qui exercent une action excitatrice sur les neurones NPY du NA (van den Top et al., 2004) et inhibitrice sur les neurones POMC du NA (Ma et al., 2007). Par ailleurs, les fibres à orexine A innervent les neurones pré-moteurs du raphé caudal, et ce circuit est impliqué dans la régulation de la thermogénèse, ainsi que la fonction cardiovasculaire et gastrointestinale (Berthoud et al., 2005). **(Figure 9)**

Les neurones MCH du LH sont également capables de moduler l'activité mélanocortinergique du NA chez le rat. Ainsi, l'injection de MCH dans le NA augmente la libération d'AgRP et diminue celle d' α -MSH, augmentant ainsi la prise alimentaire (Abbott et al., 2003). Différentes études pharmacologiques ou génétiques impliquent la MCH dans le contrôle de l'homéostasie énergétique et du glucose (Ludwig et al., 2001; Segal-Lieberman et al., 2003). Son rôle dans le contrôle des dépenses énergétiques via des projections sur le NTS a également été montré (Zheng et al., 2005a). **(Figure 9)**

Enfin, il a été montré une activation des neurones à orexines/ hypocrélines du LH lors d'une hypoglycémie. Ces neurones sont inhibés par l'augmentation de concentration en glucose. L'étude de cette population de neurones sensibles au glucose dans le LH reste à approfondir. Cependant, il semble que l'inhibition par le glucose de leur activité soit dépendante de canaux K_{ATP} . De plus, leur sensibilité serait indépendante des voies de signalisations impliquant les transporteurs de glucose de type GLUT2, hSGLT3 et 1, et leur réponse est insensible à l'inhibition de la glucokinase et ne peut être mimé par l'augmentation de concentration d'ATP intracellulaire ou de lactate extracellulaire, ce qui suggère que ces neurones ne sont pas dépendants de la métabolisation du glucose pour leur réponse au glucose (Fioramonti et al., 2011; Karnani and Burdakov, 2011).

C. Signaux circulants du contrôle de l'homéostasie énergétique

Les signaux de types hormonaux et métaboliques susceptibles de moduler l'activité hypothalamique puis le contrôle de la PA et du métabolisme énergétique sont très nombreux. Je ne m'attacherai à développer que certains d'entre eux.

1. Les hormones

Parmi les hormones susceptibles de contrôler les apports et/ou les dépenses d'énergie, la leptine, l'insuline et la ghréline apparaissent aujourd'hui comme les plus importantes. Les concentrations circulantes de leptine et d'insuline sont parfaitement corrélées au poids corporel et à la masse adipeuse (Benoit et al., 2004; Le Magnen, 1973; Le Magnen et al., 1973; Woods et al., 1998).

a. La leptine

La leptine a été identifiée grâce au clonage des gènes *ob* et *db* (Tartaglia et al., 1995; Zhang et al., 1994). Les études ont commencé avec l'observation de deux modèles murins

d'obésité monogéniques : les souris *ob/ob* et *db/db*. Le gène *ob* code la leptine, protéine essentiellement synthétisée et libérée par le tissu adipeux blanc. La leptine conduit à une réduction importante de la PA et à une normalisation du syndrome d'obésité (Weigle et al., 1995). Elle agit par l'intermédiaire d'un récepteur (Ob-R) codé par le gène *db* chez la souris ou *fa* chez le rat. La mutation de ce gène résulte en une obésité chez les deux espèces. Il existe plusieurs isoformes du récepteur (Ob-Ra à Ob-Re) présentant des variations dans la longueur de leur domaine cytoplasmique. Seule l'isoforme Ob-Rb possède une région cytoplasmique longue, permettant la transduction complète des signaux intracellulaires. Cette isoforme est exprimée dans différentes régions du cerveau (Tartaglia et al., 1995), et est responsable des effets centraux de la leptine (Bjorbaek et al., 1998; Cui et al., 2004; Meister, 2000; Morrison et al., 2005; Yamashita et al., 1998).

Parmi les nombreux effets de la leptine, la diminution de la PA et du poids corporel sont les mieux connus. L'administration périphérique ou centrale de leptine produit une diminution dose-dépendante de la quantité calorique ingérée et du poids de l'animal (Baskin et al., 1999). Cet effet anorexigène s'explique au moins en partie par une régulation des neurones NPY et POMC (Baskin et al., 1999; Elias et al., 1999) (**Figure 12**). En périphérie, cela se traduit par la stimulation des dépenses énergétiques en augmentant la locomotion, la thermogénèse, la consommation d'oxygène et l'expression de la protéine découplante UCP1 dans le tissu adipeux brun via le SNA (Scarpace et al., 1997).

b. L'insuline

L'insuline est une hormone peptidique sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans. L'insuline a une action hypoglycémiant dont les effets s'opposent à ceux du glucagon. De façon plus générale, son rôle est anabolique, en stimulant la mise en réserve dans les tissus et organes.

Au niveau cérébral, l'insuline exerce de nombreux effets allant d'une action neurotrophique lors du développement (Recio-Pinto and Ishii, 1988) à une implication dans les phénomènes de plasticité lors des processus mnésiques (Zhao et al., 2004). Surtout, l'insuline a de nombreux rôles dans la régulation centrale du métabolisme (Benoit et al., 2004; Schwartz et al., 1992). Une injection cérébrale d'insuline entraîne une diminution de la PA de

manière dose dépendante (Belgardt and Bruning, 2010; McGowan et al., 1992; Woods et al., 1996). Cet effet est corrélé à la forte densité de récepteurs à l'insuline dans les régions hypothalamiques, notamment le NA (Marks et al., 1990). L'insuline conduit à une diminution de l'expression de NPY (Obici et al., 2001) et à une augmentation de l'expression de POMC (Benoit et al., 2002). Comme la leptine, l'insuline au niveau central joue un rôle important sur les dépenses énergétiques et la mobilisation des réserves (Diamant, 2007; Gerozissis, 2003, 2008; Sanchez-Lasheras et al., 2010) (**Figure 10**). Enfin, plusieurs études montrent un effet potentialisateur de l'insuline sur certains signaux tels que le glucose et la Cholécystokinine (CCK), impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique (Alquier et al., 2003; Riedy et al., 1995).

L'insuline exerce ses effets en se fixant à un récepteur à activité tyrosine kinase intrinsèque (Van Obberghen et al., 2001). Ce récepteur est formé de l'association de deux sous-unités α et deux sous-unités β . Les effets de l'insuline passent principalement par la phosphorylation des résidus tyrosines sur différents substrats tels que les Insulin Receptor Substrate (IRS). Ceux-ci interagissent alors avec des protéines cytoplasmiques telles que la Phosphoinositide 3 kinase (PI3K), la principale cible de l'insuline au niveau du SNC (Niswender et al., 2003) ou la voie de signalisation JAK/STAT créant un cross-talk avec la signalisation de la leptine.

c. La ghréline

La ghréline est un peptide d'origine gastrique qui stimule la sécrétion de l'hormone de croissance et augmente l'adiposité (Hassouna et al., 2010). La ghréline est produite et sécrétée principalement par les cellules P/D1 du fundus de l'estomac (Yoshihara et al., 2002). C'est le premier ligand naturel identifié pour un récepteur d'un sécrétagogue de l'hormone de croissance (GHS-R), présent dans l'hypothalamus (Horvath et al., 2001). Le récepteur à la ghréline est retrouvé dans 98% des neurones NPY/AgRP (Willeesen et al., 1999). Ainsi, l'action centrale de la ghréline est directe en augmentant la synthèse et la libération de NPY et d'AgRP. Son action est donc une stimulation puissante de la PA (Andrews et al., 2008; Cowley et al., 2003; Kamegai et al., 2000; Nakazato et al., 2001). En outre, des souris invalidées pour l'AgRP ou le NPY ne répondent pas à la ghréline, et l'injection hypothalamique d'un antagoniste du NPY inhibe l'effet orexigène de la ghréline (Nakazato et

al., 2001). L'action excitatrice de la ghréline sur les neurones NPY/AgRP est couplée avec l'action inhibitrice de ces neurones sur les neurones POMC/CART, renforçant son effet orexigène. L'activation des neurones NPY/AgRP par la ghréline est vraisemblablement due à la fois à ses variations de taux circulant mais aussi à une libération centrale au niveau de l'hypothalamus (Cowley et al., 2003). Enfin, l'effet central de la ghréline sur la périphérie, via la stimulation du SNA, est une augmentation de l'adipogénèse (Ellacott et al., 2006).

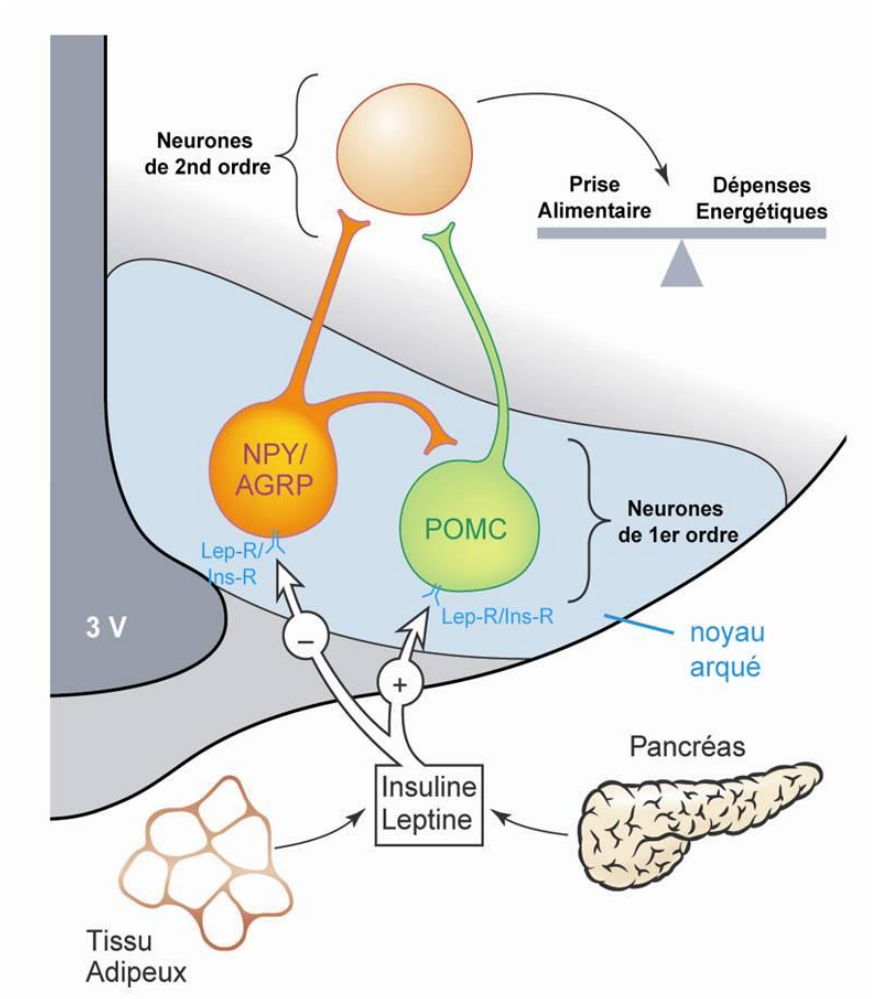


Figure 10 : Schéma représentant l'action de l'insuline et de la leptine sur le NA. Ces deux hormones inhibent les neurones NPY/AgRP et activent les neurones POMC. Cette synergie d'action aurait pour conséquence une modulation de l'équilibre énergétique via l'inhibition de la prise alimentaire et la stimulation de la dépense énergétique. D'après Niswender, 2004

2. Les nutriments

En périphérie, comme au niveau central, mis à part leur rôle structural et/ou énergétique, les nutriments en tant que signaux sont capables de moduler le contrôle du métabolisme énergétique en induisant des réponses adaptatives. Au niveau du SNC, ils sont capables de déclencher l'activation/inactivation de certains neurones à l'origine d'une réponse métabolique via le SNA ou de modifier la prise alimentaire. Je présenterai ici brièvement ces signaux, le glucose sera détaillé dans le chapitre suivant.

a. Les acides gras

Il a été montré qu'une augmentation du taux d'AGL dans le SNC induisait une inhibition de la PA (Benani et al., 2007; Loftus et al., 2000; Obici et al., 2002). De plus, ces études montrent que l'hypophagie induite par les lipides et notamment l'acide oléique, est corrélée à une diminution de l'expression du NPY. En revanche, aucune modification du niveau d'expression de POMC n'est observée (Obici et al., 2002). Par ailleurs, une augmentation du taux d'AGL dans le SNC entraîne une diminution de la production hépatique de glucose (Obici et al., 2002), et a également un effet potentialisateur sur la sécrétion pancréatique d'insuline, en augmentant cette dernière en réponse à une charge périphérique de glucose (Clement et al., 2002).

Suite à ces travaux, la présence de neurones sensibles aux AGL a été démontrée dans l'hypothalamus grâce au proto-oncogène c-Fos comme marqueur d'activation et par électrophysiologie (Chang et al., 2004; Cruciani-Guglielmacci et al., 2005; Wang et al., 2006). Ces travaux révèlent l'existence de neurones excités et inhibés par les AGL dans le NA.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la détection cérébrale des acides gras sont encore peu connus. Cependant, de nombreuses études montrent un rôle des acides gras dans la régulation de la conductance de certains canaux ioniques (Cl^- , GABA_A , ClC-2 , K^+ , $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$, K_{ATP} et Ca^{2+}) (Honen et al., 2003; Tewari et al., 2000; Witt and Nielsen, 1994; Zheng et al., 2005b). De plus, ils inhibent également la Na^+/K^+ ATPase (Oishi et al., 1990). D'autres travaux ont permis de montrer une inhibition des canaux K_{ATP} dans le NA par l'acide

oléique (Migrenne et al., 2007), et une excitation neuronale dépendante de la fermeture des canaux Cl^- (Wang et al., 2006).

La détection centrale des lipides a pu être mise en évidence par l'injection icv d'acide oléique qui déclenche une inhibition de la PA et de la production hépatique de glucose (Morgan et al., 2004; Obici et al., 2002). Cet effet passe par l'action de cet acide gras sur les neuropeptides orexigènes du NA, ainsi il entraîne une diminution de la quantité d'ARNm du NPY et de l'AgRP, alors que l'expression de POMC n'est pas modifiée. L'inhibition de la carnitine Palmitoyltransférase 1 (CPT1, transporteur des acides gras dans la mitochondrie) provoque une diminution de la PA ainsi qu'une production hépatique de glucose (Obici et al., 2003). Ces résultats suggérant que ces effets seraient dus à une accumulation intracellulaire d'acides gras.

Actuellement, les résultats obtenus donnent lieu à deux hypothèses.

Selon la première, la dégradation des AGL par la β -oxydation mitochondriale serait l'étape clé (Benani et al., 2007; Cruciani-Guglielmacci et al., 2004). Une augmentation des AGL se traduirait par un fonctionnement mitochondrial accru conduisant à la production d'Espèces Actives de l'Oxygène mitochondriales (mEAOs). Dans ce cas, l'inhibition de la CPT bloque le transport des acyl-coenzyme A L-Carnitine (acyl-CoA LC) et entraîne une disparition des effets comportementaux et viscéraux des AGL (**Figure 11**).

Selon la deuxième hypothèse, c'est l'accumulation des acyl-CoA en particulier le malonyl CoA, dans le cytoplasme qui constituerait le signal anorexigène et catabolique (Loftus et al., 2000; Obici et al., 2002). Dans ce cas, l'inhibition du transport des AGL dans la mitochondrie mime les effets des AGL.

Dans les conditions physiologiques, l'entrée des AGL dans la mitochondrie est contrôlée par la disponibilité en malonyl-CoA. Il inhibe l'activité du transporteur CPT-1. Le malonyl-CoA est abondamment dérivé du pyruvate, produit final de la glycolyse. En diminuant le transport des Acyl-CoA vers la mitochondrie, le malonyl-CoA contribue à faire augmenter la concentration cytoplasmique de ces derniers. Cette accumulation engendrerait une activation des canaux K_{ATP} , induisant une dépolarisation du neurone (**Figure 11**).

La protéine Adenosine Mono Phosphate (AMP) kinase (AMPK) jouerait également un rôle important dans la régulation du « lipid sensing ». Elle contrôle la formation de malonyl-CoA à travers son action sur l'Acétyl-CoA Carboxylase (ACC). L'enzyme ACC catalyse la

conversion de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA. Cette enzyme est inhibée de façon allostérique par phosphorylation essentiellement assurée par l'AMPK (Kim et al., 2004a; Kim et al., 2004b; Landree et al., 2004).

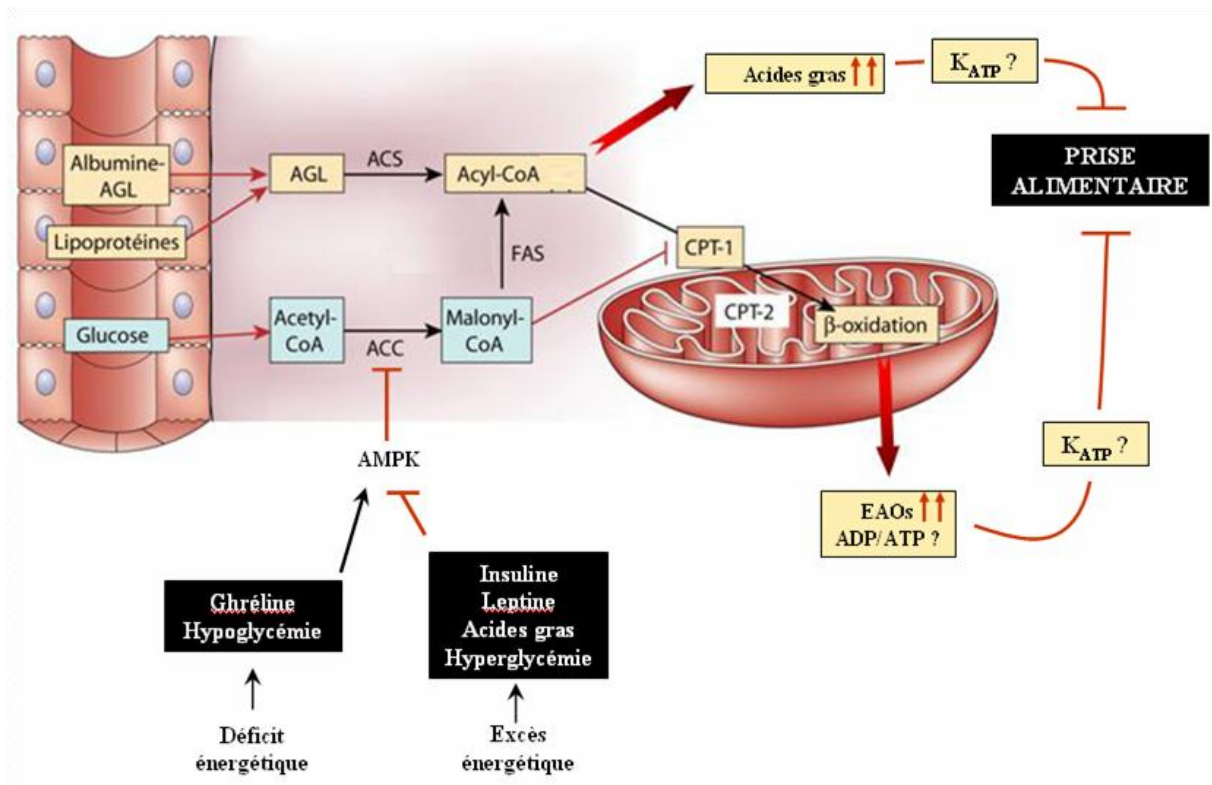


Figure 11 : Représentation schématique potentielle du contrôle de la prise alimentaire *via* la modulation du métabolisme mitochondrial par les facteurs métaboliques et hormonaux : 2 hypothèses

Hypothèse 1 : L'accumulation d'Acyl-CoA dans le cytosol inhibe la prise alimentaire.

Hypothèse 2 : L'entrée des Acyl-CoA dans la mitochondrie et la β -oxydation mitochondriale est nécessaire pour inhiber la prise alimentaire.

AGL (Acide gras libre), ACS (Acyl-CoA synthase), ACC (Acetyl-CoA carboxylase), CPT1/2 (Carnitine-palmitoyltransferase 1 et 2).

D'après Lam, 2005.

b. Les protéines

Les protéines ou plutôt les acides aminés sont également capables de contrôler le métabolisme énergétique et la PA. Une injection de leucine dans le 3^{ème} ventricule inhibe la PA (Cota et al., 2006), et un régime alimentaire riche en protéines est satiétogène. Les

mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ces effets et notamment dans l'inhibition de la PA sont encore mal connus (Maurin et al., 2005). Un certain nombre de travaux montre que l'inhibition de la PA par les acides aminés résulte de l'activation de la signalisation mammalian Target of Rapamycin (mTOR) (Cota et al., 2006; Dennis et al., 2001; Hardie and Carling, 1997; Hay and Sonenberg, 2004; Wullschleger et al., 2006). Par ailleurs, l'injection de leucine dans l'hypothalamus médiobasal induit une activation des neurones POMC du NA, les neurones à ocytocine du PVN, et les neurones du NTS afin de diminuer la PA (Blouet et al., 2009; Blouet and Schwartz, 2010).

c. Le glucose

Les mécanismes impliqués dans la détection et l'intégration de signaux métaboliques et hormonaux au niveau du SNC sont très finement contrôlés. Parmi les différentes voies de signalisation impliquées dans la détection de ces divers signaux, celles concernant le glucose font l'objet de nombreuses études. Nos travaux ont visé à mieux appréhender les mécanismes mis en jeu lors de la détection du glucose par l'hypothalamus.

IV. La détection du glucose : implication dans le contrôle de l'homéostasie énergétique

Le glucose représente une source énergétique majeure pour toutes les cellules de l'organisme. Cette énergie est fournie sous forme d'ATP indispensable à de nombreux processus métaboliques et biochimiques, permettant le maintien de l'intégrité cellulaire. Le cerveau dépend essentiellement du glucose comme source d'énergie en condition physiologique. Il est donc vital de maintenir les taux circulants de glucose dans une gamme «acceptable». La glycémie est ainsi maintenue autour d'une valeur physiologique qui est de 5,5mM chez l'homme. Toutefois, lors d'un jeûne prolongé, le cerveau est aussi capable d'utiliser les corps cétoniques comme substrat énergétique (Morris, 2005).

La détection, par les organes et/ou tissus spécialisés, de variations de la glycémie est communément appelée «glucose sensing». Avant de détailler plus précisément le «glucose sensing» cérébral, ses mécanismes et son implication physiologique, les différents «glucose-sensors» périphériques de l'organisme seront envisagés.

Mis à part le SNC, la détection du glucose est principalement connue au niveau pancréatique, ce qui a permis la création d'analogie de mécanismes avec les autres sites de détection identifiés (Schuit et al., 2001). Au niveau hépato-portal, des cellules gluco-sensibles détectent l'hypoglycémie permettant la sécrétion des hormones contre-régulatrices.

A. La détection du glucose dans le pancréas endocrine

La détection d'une hypoglycémie déclenche une sécrétion de glucagon par les cellules α des îlots de Langerhans alors que l'hyperglycémie entraîne une libération d'insuline par les cellules β de ces mêmes îlots.

1. La cellule β

Les cellules β sont capables de détecter directement les variations de la concentration en glucose sanguine. Lors d'une augmentation de la glycémie, le glucose pénètre dans les cellules β par l'intermédiaire du transporteur de glucose GLUT2, pour y être phosphorylé par une hexokinase particulière, la glucokinase. Le Glucose-6-P ainsi produit est métabolisé ce qui conduit à l'augmentation du ratio ATP/ADP cytosolique. L'ATP produit interagit alors avec des canaux K_{ATP} principalement présents au niveau de la membrane plasmique des cellules, induisant ainsi leur fermeture. La fermeture des canaux K_{ATP} empêche la fuite des ions K^+ hors des cellules, ce qui a pour conséquence d'augmenter le potentiel de membrane des cellules. Cette dépolarisation induit, à son tour, l'ouverture de canaux Ca^{2+} voltage-dépendants, ce qui permet une entrée massive de Ca^{2+} à l'intérieur des cellules β . L'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} qui en résulte déclenche alors l'exocytose des vésicules contenant l'insuline (Henquin, 2000). Les éléments clés de la

sécrétion d'insuline induite par le glucose sont le transporteur GLUT2, la glucokinase et les canaux K_{ATP} (**Figure 12**) (MacDonald et al., 2005; Schuit et al., 2001).

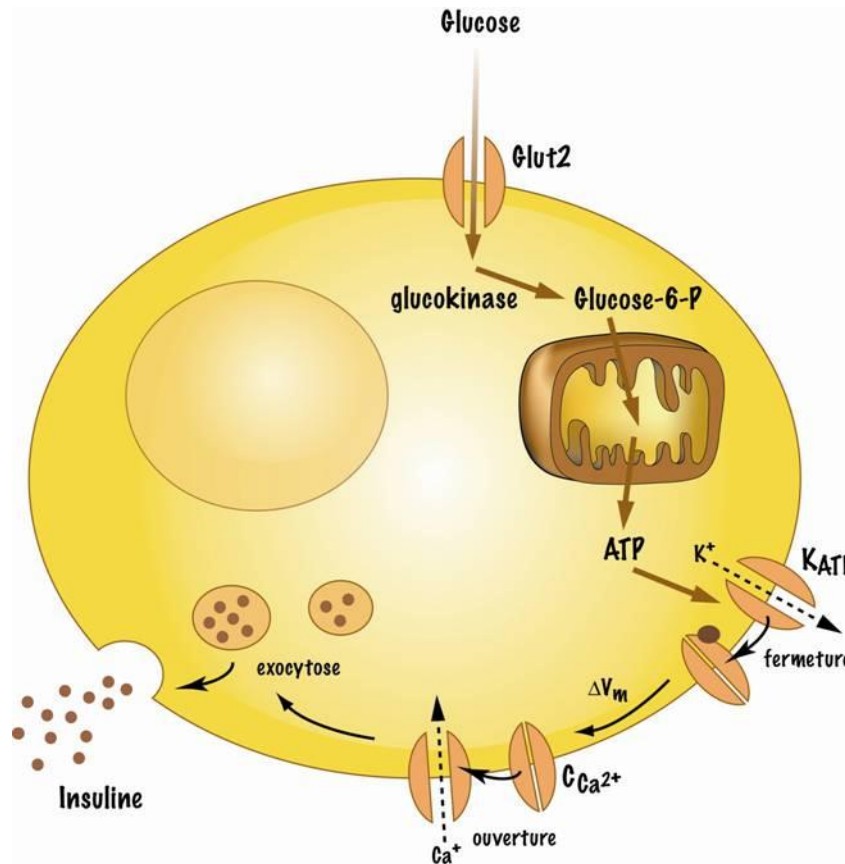


Figure 12 : Schéma représentant le mécanisme impliqué dans la sécrétion d'insuline par la cellule β du pancréas en réponse à une augmentation de la concentration extracellulaire en glucose. Abréviations : GLUT2 (Glucose transporter 2), K_{ATP} (canal potassique ATP dépendant), ΔV_m (dépoliarisation de la membrane plasmique).

B. La détection du glucose par le système nerveux entérique

En traversant l'épithélium intestinal, le glucose module la physiologie du tube digestif. Via une action sur les cellules L de l'iléon et du colon proximal, le glucose induit la synthèse et la libération du Glucagon like peptide 1 (GLP1) dans la veine hépatoportale. Ce nutriment a également la capacité de moduler la motilité intestinale (Maslee et al., 1996).

Comme pour le SNC, des neurones excités et inhibés par le glucose sont présents dans le système nerveux entérique (Liu et al., 1999). Il a ainsi été montré que 77% des neurones de tranches de plexus myentérique de l'iléon sont inhibés par une déplétion du glucose dans le milieu d'incubation (Liu et al., 1999). Dans cette même étude, les auteurs montrent que les neurones excités détectent la variation de la concentration en glucose via les canaux K_{ATP} . La présence d'une des sous-unités des K_{ATP} (Kir 6.2) a été mise en évidence dans ces neurones. Il a alors été suggéré que ces neurones sensibles au glucose participent directement à la modulation de la motilité intestinale. En effet, l'activité de ces neurones est modifiée par le diazoxide (qui ouvre les canaux K_{ATP}), tout comme la motilité du colon. Enfin, Liu et coll., montrent que les neurones gluco-excités expriment le récepteur à la leptine (Liu et al., 1999), ce qui suggère que la régulation de la motricité digestive fait partie intégrante du contrôle de l'homéostasie énergétique.

C. La détection du glucose de la veine hépatoportale

La singularité de la détection du glucose à ce niveau réside dans la détection d'un gradient positif de glucose entre la veine porte et l'artère hépatique (Gardemann et al., 1986; Matsuhisa et al., 1997). On note également l'importance émergente du rôle de la néoglucogénèse intestinale dans le cas de régimes enrichis en protéines, qui transmet via la détection hépato-portale un signal satiétogène au système nerveux central (Mithieux et al., 2009).

Après un repas, les nutriments sont absorbés par l'intestin, collectés et transportés par les capillaires mésentériques puis par la veine hépato-portale avant d'atteindre le foie et la circulation sanguine. La détection du glucose qui existe au niveau de la veine hépato-portale concerne l'hyperglycémie (qui fait suite à la PA). Cette détection met en jeu les fibres afférentes de la branche hépatique du nerf vague, qui se projette sur le tronc cérébral. Des études ont ainsi montré que l'activité électrique de ces fibres nerveuses est inversement proportionnelle à la concentration en glucose dans la lumière de la veine porte (Burcelin, 2003). Cependant, l'organisation au niveau cellulaire de ce « glucose-sensor » reste encore mal connue.

La détection d'une hyperglycémie hépato-portale entraîne la modulation de différents paramètres du métabolisme énergétique, comme par exemple une inhibition de la PA (Russek, 1970). Elle intervient également dans la modulation du métabolisme glucidique en stimulant l'utilisation du glucose par les muscles et le tissu adipeux brun, et en favorisant son stockage au niveau hépatique (Burcelin et al., 2000b; Gardemann et al., 1986). Enfin, cette détection inhibe la production des hormones de la contre-régulation (catécholamines et glucagon) (Donovan et al., 1994). Les différentes réponses ainsi déclenchées participent donc aux mécanismes qui permettent de ramener la glycémie à son niveau basal.

L'utilisation de souris transgéniques dépourvue du transporteur au glucose GLUT2 montre que celui-ci joue un rôle essentiel dans cette détection hépato-portale (Burcelin et al., 2000a). Par ailleurs, d'autres travaux montrent que le GLP1, comme pour la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, est capable de potentialiser cette réponse (Burcelin, 2003).

D. La détection du glucose par les corps carotidiens

Les corps carotidiens sont également capables de détecter des variations de glucose plasmatique. La littérature rapporte essentiellement la détection des cas d'hypoglycémie (Koyama et al., 2001; Koyama et al., 2000; Pardal and Lopez-Barneo, 2002). Ainsi, lors d'une hypoglycémie, on observe une inhibition de canaux K^+ responsable d'une dépolarisation de la membrane et de l'ouverture de canaux Ca^{2+} provoquant une entrée massive de calcium dans le cytosol. Ceci engendre une libération de neurotransmetteurs, conduisant à une stimulation des fibres sensorielles afférentes et une activation sympatho-adrénergique (Lopez-Barneo, 2003).

En aval de la séparation des carotides interne et externe, il existe une structure capable de détecter différents paramètres plasmatiques, appelée corps carotidiens. Les cellules «Glomus» qui le constituent, sont en relation avec les fibres nerveuses afférentes du nerf vague qui remontent vers le tronc cérébral. Ces «glomus» sont dotés d'une activité sécrétrice puisque leur activation induit la libération de dopamine et/ou de catécholamines, capable de stimuler les fibres nerveuses afférentes avoisinantes (Lopez-Barneo et al., 1988; Pardal and Lopez-Barneo, 2002).

Ces cellules sont activées par une diminution de la concentration en glucose (Pardal and Lopez-Barneo, 2002). Elles pourraient participer, via une modulation du SNA, aux

mécanismes de contre-régulation mis en jeu pour lutter contre l'hypoglycémie (Lopez-Barneo, 2003). La détection de cette hypoglycémie met en jeu, au niveau moléculaire, la fermeture d'un canal K^+ , entraînant une dépolarisation et l'ouverture de canaux Ca^{2+} voltage-dépendants. L'augmentation de la concentration en Ca^{2+} qui en résulte permettrait l'exocytose des vésicules de dopamine ou de catécholamines (Lopez-Barneo, 2003).

Il existe donc, en périphérie, de nombreux tissus/organes capables de détecter des variations de la glycémie et de participer à la régulation du métabolisme énergétique. Dans la suite de ce manuscrit, nous allons nous intéresser à la détection du glucose par le cerveau et en particulier par l'hypothalamus.

V. La détection hypothalamique du glucose

La présence d'une barrière hémato encéphalique (BHE) dans le SNC est responsable d'une concentration en glucose dans le parenchyme cérébral inférieure à 5mM (McNay and Gold, 1999; Netchiporouk et al., 1996). Il a été montré que chez des rats anesthésiés, une glycémie de 5 à 8mM correspond à une concentration cérébrale entre 1 et 2,5mM (Silver and Erecinska, 1998). En cas d'hypoglycémie (2 à 3mM) et d'hyperglycémie (15 à 17mM), la concentration de glucose dans le parenchyme cérébral est respectivement de 0.5mM et 4.5mM. Cependant, ces mesures ont été réalisées dans des structures cérébrales protégées par une BHE. Il est classiquement décrit que dans les régions hypothalamiques à proximité du 3^{ème} ventricule, et tout particulièrement au niveau du noyau arqué, la BHE est absente (l'endothélium est dit «fenestré») (Ciofi et al., 2009). De ce fait, la concentration de glucose dans ces régions serait beaucoup plus proche de la glycémie. Depuis longtemps, l'hypothalamus a été identifié comme le site de détection à la fois des hypoglycémies et des hyperglycémies, déclenchant des réponses adaptatrices majeures.

A. Etudes in vivo

Classiquement, une glucopénie cérébrale, induite par exemple par l'injection de 2-désoxyglucose (2-DG) (un analogue du glucose non métabolisable), entraîne une stimulation de la PA suite à l'activation des neurones orexigènes NPY/AgRP. Cet effet disparaît chez des souris invalidées pour le NPY (Sindelar et al., 2004). Parallèlement à la régulation de la PA, la détection de l'hypoglycémie par le SNC induit des réponses périphériques regroupées sous le terme de «réponses de la contre régulation». Ces réponses comprennent la sécrétion de glucagon, des catécholamines ou hormones de croissance, la stimulation de la production hépatique de glucose et l'inhibition de la sécrétion d'insuline (Biggers et al., 1989; Nonogaki, 2000; Woods and Porte, 1974). Ces réponses périphériques sont principalement sous la dépendance de l'hypothalamus ventro-médian (le VMN principalement), structure importante dans le contrôle de l'activité du SNS par ses projections sur le foie en particulier (Borg et al., 1997; Borg et al., 1994). Ainsi, la détection de l'hypoglycémie cérébrale stimule la libération des nutriments en réserve et limite le stockage et les dépenses dans le but de restaurer une glycémie physiologique, permettant ainsi un apport suffisant en glucose au cerveau. Néanmoins, d'autres études attribuent un rôle non négligeable au tronc cérébral dans la détection cérébrale de l'hypoglycémie et les phénomènes de contre régulation (Fioramonti et al., 2011; Ritter et al., 2000).

Lors d'une hyperglycémie cérébrale, on observe une inhibition de la PA, une stimulation de la sécrétion d'insuline (**Figure 13**) et une diminution de la production hépatique de glucose, ces deux dernières réponses périphériques mettant en jeu une augmentation de l'activité du SNPS et une diminution du SNS (Alquier et al., 2003; Atef et al., 1995; Fujimoto et al., 1985; Grossman, 1986; Lam et al., 2005b; Leloup et al., 2006; Tsujii and Bray, 1990).

Lors d'une injection de glucose par la carotide vers le cerveau (sans modification de la glycémie), on note une forte activation du proto-oncogène cFos (marqueur d'activation cellulaire) dans certains noyaux de l'hypothalamus : le NA et le PVN (Guillod-Maximin et al., 2004) ainsi qu'une augmentation de l'activité électrique multicellulaire au niveau du NA

(Leloup et al., 2006) (**Figure 14**). Cette activation électrique conduit à une activation vagale qui déclenche une sécrétion d'insuline (**Figure 13**) (Atef et al., 1995; Leloup et al., 2006).

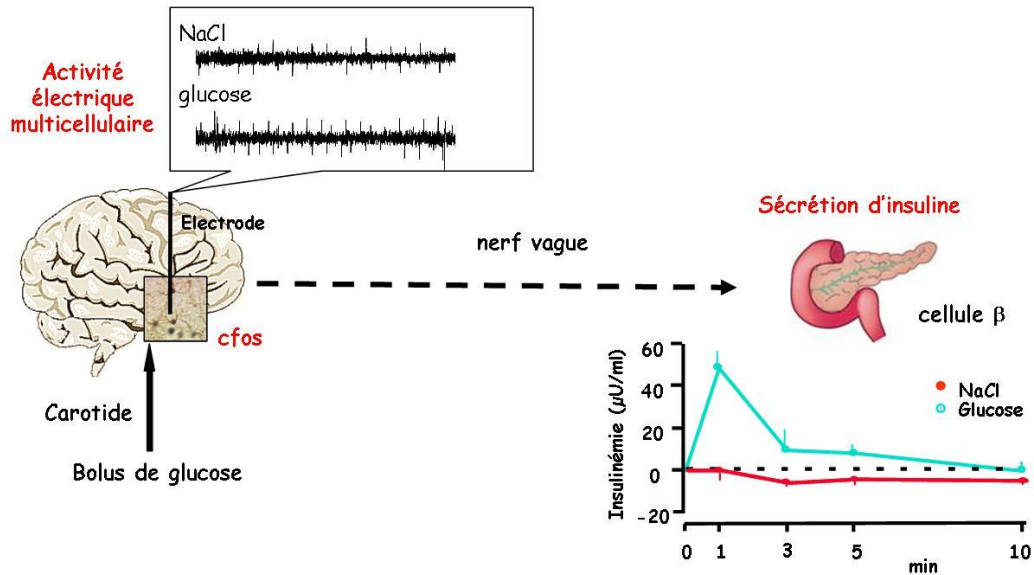


Figure 13 : Schéma présentant la régulation nerveuse de la sécrétion d'insuline par le système nerveux autonome lors d'une hyperglycémie cérébrale.

La capacité de l'hypothalamus à détecter des hypoglycémies et des hyperglycémies est à relier avec l'existence de populations neuronales spécifiques dont l'activité électrique varie en fonction de la concentration de glucose. Ces populations ont été mises en évidence par des études d'électrophysiologie.

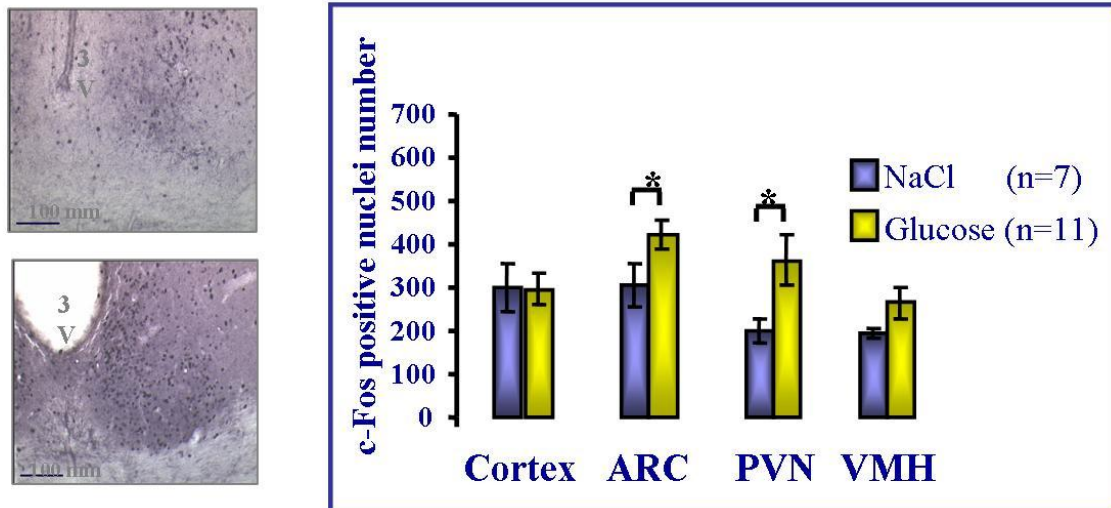


Figure 14 : Activation hypothalamique de c-fos lors d'une hyperglycémie cérébrale. D'après Guillod-Maximin, 2004.

B. Etudes in vitro

1. Existence de 4 populations neuronales

C'est en 1964 qu'a été établie l'existence de neurones sensibles au glucose dans l'hypothalamus (Anand et al., 1964). Depuis, leur caractérisation s'est développée simultanément aux techniques, notamment grâce au patch clamp qui consiste en l'enregistrement direct de l'activité électrique d'une seule cellule. Selon leur réponse à une variation de la concentration extracellulaire de glucose, les neurones sont désormais classés en 4 grands groupes : 1) les neurones gluco-excités (GE) et 2) gluco-inhibés (GI), dans la gamme de concentration de glucose de 0 à 5 mM et 3) les neurones gluco-excités HGE et 4) gluco-inhibés HGI, dans une gamme haute de concentration de glucose, de 5 à 20 mM. Ces neurones sont excités ou inhibés par une augmentation de la concentration de glucose et sont toujours inversement activés lors d'une diminution de la concentration de glucose. Un neurone GI sera donc inhibé par un saut 0 à 5 mM et sera excité par un saut 5 à 0 mM (**Figure 15**).

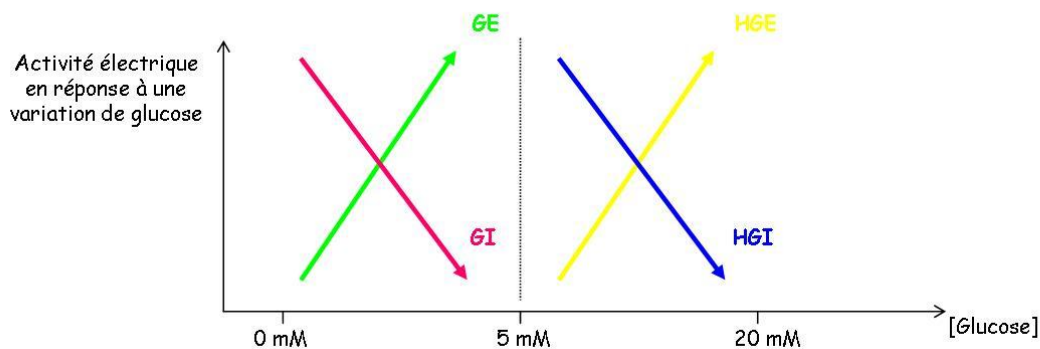


Figure 15 : Représentation schématique de l'activation électrique des 4 sous types neuronaux du NA en réponse à une variation de glucose.

Les neurones sensibles au glucose ont été localisés dans les noyaux VMN, NA, PVN, le noyau supra-chiasmatique et le LH. Dans le VMN, 14% des neurones étudiés sont GE et 3% sont GI (Song et al., 2001). Dans le LH, il a été montré une activation des neurones Orexines/hypocrétines lors d'une hypoglycémie, suggérant que ces neurones soient des neurones GI (Cai et al., 2001; Karnani and Burdakov, 2011; Moriguchi et al., 1999; Sakurai et al., 1998; Silver and Erecinska, 1998). Dans le NA, 20 à 25% des neurones étudiés sont GE, 19% HGE et 7% HGI. Par ailleurs, il existe une régionalisation de ces types neuronaux, avec une majorité de GE dans le NA latéral et une majorité de GI dans le NA médian (Fioramonti et al., 2004; Wang et al., 2004).

2. Phénotypes des neurones sensibles au glucose

L'étude de ces populations sensibles au glucose a permis d'identifier en partie leur nature en termes de neurotransmetteurs/neuropeptides. L'utilisation de souris NPY-GFP et de souris POMC-GFP a permis de répondre partiellement à la question. Les réponses de type GI dans le NA (neurone excité par une diminution de glucose de 5 à 0mM, cas d'hypoglycémie) sont systématiquement enregistrées sur des neurones NPY (Fioramonti et al., 2007). Cela est cohérent avec le fait que l'hypoglycémie stimule la PA et l'expression de NPY. En revanche, seulement un tiers des neurones NPY étudiés sont sensibles au glucose. Les études sont controversées quant à la sensibilité au glucose des neurones POMC. Certaines rapportent

l'absence d'activation électrique en réponse au glucose dans les neurones POMC (Fioramonti et al., 2007), alors que d'autres présentent une activation électrique des neurones POMC lors d'une élévation de la concentration de glucose qui met en jeu le canal K_{ATP} (associée à un relargage de l' α -MSH dose-dépendante de la concentration de glucose) (Parton et al., 2007). Dans le VMN, les neurones sensibles au glucose n'ont pas de phénotype neuropeptidique identifié. Au niveau du LH, des études ont permis de montrer que les neurones orexines/hypocrétines étaient GI, alors que les neurones MCH seraient majoritairement GE (Karnani and Burdakov, 2011).

3. Rôle des astrocytes dans la détection du glucose

Ces dernières années, certaines études fonctionnelles *in vivo* ont permis de mettre en évidence un couplage métabolique astrocyte/neurone dans le mécanisme de «glucose sensing» cérébral. Ainsi, les astrocytes auraient un rôle clé dans la détection du glucose.

Les astrocytes entourent quasiment tous les capillaires cérébraux avec leurs «pieds astrocytaires». Cette position stratégique au niveau des capillaires a longtemps suggéré un rôle métabolique important de ces cellules. Ce n'est que récemment que les études expérimentales ont permis de démontrer que ces cellules permettent un transfert de substrats énergétiques (en particulier le lactate) aux neurones, l'activité de ces derniers étant hautement dépendante de ce transfert (Bouzier-Sore et al., 2002; Pellerin, 2005; Pellerin et al., 2002; Pellerin and Magistretti, 2004; Pierre and Pellerin, 2005).

Lors des expériences d'injection d'un bolus de glucose par la carotide («hyperglycémie cérébrale»), la co-localisation de l'immunoréactivité pour c-Fos avec celle de marqueurs cellulaires a permis de mettre en évidence que les neurones n'étaient pas seuls activés : un immunomarquage c-Fos est aussi présent dans les astrocytes du NA, montrant que ceux-ci sont activés en réponse au glucose (Guillod-Maximin et al., 2004). L'étape astrocytaire serait donc particulièrement importante dans ce mécanisme de détection du glucose. Des études récentes ont montré qu'une injection de lactate au niveau hypothalamique a les mêmes effets sur la régulation du métabolisme périphérique qu'une injection de glucose (en termes d'inhibition de la production hépatique de glucose notamment) (Lam et al., 2005a). De plus, l'inhibition hypothalamique de la lactate déshydrogénase 5 (LDH-5) (qui permet la

production de lactate dans l'astrocyte) bloque les effets du glucose injecté dans l'hypothalamus montrant ainsi que la conversion du glucose en lactate dans l'astrocyte est une étape importante du mécanisme (Kokorovic et al., 2008; Lam et al., 2005a). Enfin, en électrophysiologie, les neurones GE du VMH sont systématiquement des neurones qui sont aussi sensibles au lactate (Yang et al., 1999).

Le phénomène de «glucose sensing» ne serait donc pas exclusivement neuronal et une détection indirecte serait aussi présente. Celle-ci pourrait alors être présentée comme un mécanisme séquentiel. Dans un premier temps, une métabolisation du glucose en lactate aurait lieu dans l'astrocyte proportionnellement à la concentration présente dans le compartiment sanguin (conversion pyruvate-lactate par la LDH-5 spécifique de l'astrocyte). Le lactate ainsi formé serait exporté de l'astrocyte vers le milieu extracellulaire à proximité des neurones, qui répondrait alors aux variations de lactate (**Figure 16**).

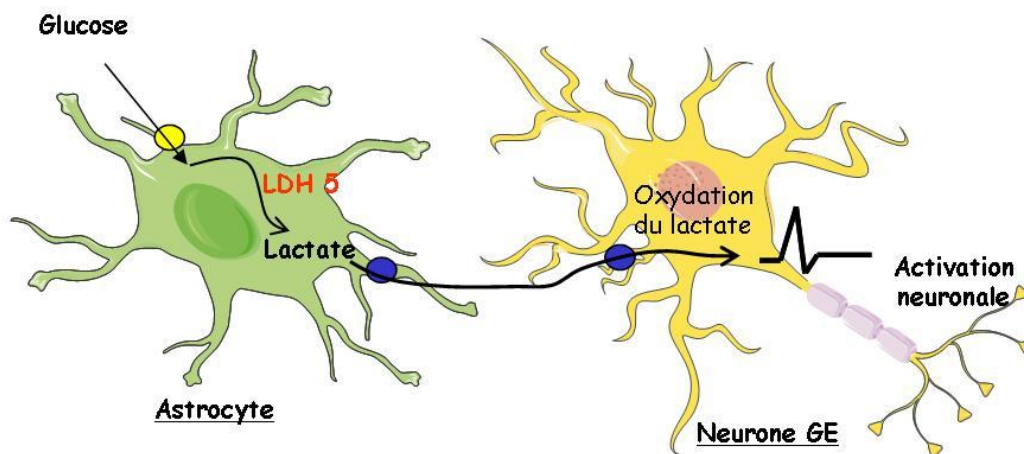


Figure 16 : Représentation schématique du couplage Astrocyte / Neurones de la détection du glucose.

4. Voies de signalisation de la détection du glucose

Parallèlement à la détermination du phénotype des neurones sensibles au glucose, de nombreuses équipes s'attachent à déterminer quels sont les voies de signalisation qui sont impliquées dans cette sensibilité. Ainsi, un certain nombre d'analogies avec la cellule β du pancréas a pu être mise en évidence, en particulier pour les neurones GE (Yang et al., 1999).

Le mécanisme de la détection du glucose au niveau hypothalamique ferait ainsi intervenir le couple GLUT2/Glucokinase et le canal K_{ATP} . Des données récentes montrent également le rôle de l'AMPK et des espèces actives de l'oxygène d'origine mitochondriales (mEAOs) (Claret et al., 2007; Leloup et al., 2011; Leloup et al., 2006).

5. L'étape du transport du glucose

Dans la détection pancréatique du glucose, c'est le transporteur GLUT2 qui est mis en jeu. Il est très fortement exprimé à la membrane des cellules β (Orci et al., 1989).

GLUT2 est un transporteur de faible affinité pour le glucose et non saturable en condition physiologique ($K_m=10$ à $15mM$). Il transporte ainsi le glucose de façon proportionnelle à la concentration plasmatique dans la cellule. La présence de GLUT2 au niveau hypothalamique, en particulier du NA, mais aussi extra-hypothalamique (NTS, noyau où sont aussi présents des neurones sensibles au glucose) a suggéré son implication dans la détection cérébrale du glucose (Leloup et al., 1994). Des expériences de double marquage avec les astrocytes ou les neurones révèlent la présence de GLUT2 dans différents types cellulaires : préférentiellement dans les astrocytes, mais aussi dans les neurones, les épendymocytes et les tanocytes (Arluison et al., 2004a; Arluison et al., 2004b; Garcia et al., 2003; Maekawa et al., 2000; Ngarmukos et al., 2001).

L'implication de GLUT2 dans la sensibilité cérébrale au glucose a été montrée par deux stratégies différentes. La première a consisté en l'injection d'oligonucléotides anti-sens GLUT2 dans le NA. Ainsi, l'inhibition de GLUT2 conduit à la suppression du pic de sécrétion d'insuline observé suite à l'injection d'un bolus intra-carotidien de glucose (Leloup et al., 1998; Wan et al., 1998). La seconde stratégie a consisté à utiliser des souris invalidées pour le transporteur GLUT2. La réexpression au niveau cérébral de GLUT2 uniquement dans l'astrocyte permet de restaurer l'activation du tronc cérébral et la sécrétion de glucagon en réponse à une hypoglycémie (Bady et al., 2006; Marty et al., 2005). L'ensemble de ces résultats montre d'une part que GLUT2 est, comme dans la cellule β , impliqué dans la détection du glucose et d'autre part, que le mécanisme de couplage entre l'astrocyte et les neurones représentent certainement un mécanisme important de la détection cérébrale du glucose. Toutefois, *in vitro*, sur des préparations de neurones hypothalamiques isolés, il a été

montré que GLUT2 était exprimé à hauteur de 30% dans les neurones GE et GI du VMN (Kang et al., 2004).

6. La phosphorylation du glucose

Suite à l'entrée du glucose dans la cellule, le mécanisme de détection se poursuit par la phosphorylation du glucose et son entrée dans la glycolyse et le cycle de Krebs. Dans la détection pancréatique, la phosphorylation en glucose 6 phosphate, étape clé de la glycolyse, est assurée par l'hexokinase IV appelé également glucokinase (GK). Cette hexokinase possède un faible K_m pour le glucose ($\sim 10\text{mM}$) et elle n'est pas inhibée par son produit, ce qui autorise une augmentation de la phosphorylation proportionnelle à la disponibilité en glucose (Iynedjian, 1993; Kengen et al., 1995; Lynch et al., 2000; Matschinsky, 1996).

Son expression a été mise en évidence au niveau du SNC et dans les aires du contrôle du métabolisme énergétique (Dunn-Meynell et al., 2002; Jetton et al., 1994; Lynch et al., 2000). Elle est faiblement exprimée dans l'ensemble du cerveau à l'exception de l'hypothalamus où l'on note des niveaux d'expression variables selon les noyaux (Kang et al., 2004). Ainsi, le PVN, le LH et le DMH possèdent une assez faible densité en GK alors qu'elle est bien exprimée dans le VMN et le NA (Lynch et al., 2000).

Comme pour GLUT2, la GK est retrouvé dans différents types cellulaires. Elle est exprimée dans les neurones, les astrocytes, les épendymocytes et les tanocytes. Elle est exprimée dans 64% des neurones GE *in vitro* et dans 43% des GI du VMN. Elle est présente dans 75% des neurones NPY du NA (Lynch et al., 2000).

7. L'AMPK

L'AMPK est décrite comme une jauge intracellulaire du statut énergétique de l'organisme et est activée lors d'un déficit énergétique, lorsque le rapport AMP/ATP est augmenté (Hardie and Carling, 1997). De nombreuses études montrent son implication dans

la détection du glucose (Carling et al., 2003; Kahn et al., 2005; McCrimmon et al., 2004; Minokoshi et al., 2004).

Lors du jeûne ou d'une hypoglycémie induite par le 2-DG, l'activité de l'AMPK dans l'hypothalamus est augmentée (Kahn et al., 2005; McCrimmon et al., 2004; Minokoshi et al., 2004). Au niveau neuronal, les neurones NPY/AgRP et POMC du NA expriment l'AMPK et son activation est dépendante du glucose (Kola et al., 2005; Minokoshi et al., 2002). Des données récentes ont montré que les souris invalidées pour le gène de la sous-unité AMPK α 2 dans les neurones POMC spécifiquement deviennent obèses alors que celles invalidées pour la kinase dans les neurones NPY/AgRP développent un phénotype maigre (Claret et al., 2007). Les neurones NPY/AgRP et POMC invalidés pour la sous-unité AMPK α 2 ne répondent plus au glucose alors qu'ils répondent toujours à l'insuline et à la leptine, suggérant des mécanismes différents de ceux impliqués pour le glucose (Claret et al., 2007). Dans les neurones NPY/AgRP qui sont des neurones GI, l'AMPK permet indirectement l'inhibition de ces neurones en réponse au glucose : une fois inactivée par la baisse du ratio AMP/ATP, l'inhibition qu'elle exerce sur les canaux chlore est levée, les ions Cl⁻ peuvent alors entrer et hyper-polariser ces neurones (Karnani and Burdakov, 2011).

8. Transmission du signal : implication du canal K_{ATP}

Les analogies avec le mécanisme opérant dans la cellule β ont permis d'identifier également l'implication du canal K_{ATP} dans le mécanisme de détection du glucose au niveau hypothalamique.

L'activité de ce canal est modulée par la fixation de ligands tels que l'ATP (ou l'ADP), le PI_{4,5}P₂ (Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate), les sulfonylurées et des lipides tels que l'oléoyl-CoA par exemple (Miki and Seino, 2005; Nichols, 2006). Ce canal est présent dans la quasi-totalité des neurones à NPY et à POMC du NA (Dunn-Meynell et al., 1998; Ibrahim et al., 2003), et son implication dans la réponse au glucose a été montrée (Ashcroft and Ashcroft, 1990; Ibrahim et al., 2003; Miki et al., 2001; Tschritter et al., 2002).

La leptine et l'insuline sont également capables d'inhiber des neurones du NA via l'ouverture de ce canal (Spanswick et al., 1997; Spanswick et al., 2000; van den Top et al., 2004). Cette ouverture résulte de l'activation de la PI3K, enzyme commune aux voies de transduction de ces deux hormones. Finalement, les neurones HGE du NA augmentent leur activité lorsqu'on augmente la concentration en glucose de 5 à 20mM via un mécanisme indépendant du canal K_{ATP} . En effet, il apparaît que les canaux K_{ATP} sont déjà clos à des concentrations de 5mM et qu'un autre mécanisme opérerait dans ces intervalles de concentration, mettant en jeu l'ouverture d'une conductance cationique non sélective (Fioramonti et al., 2004).

L'ensemble de ces données montrent l'existence de multiples acteurs moléculaires dans les voies de signalisation de la détection hypothalamique du glucose. Nous nous sommes attachés à mieux comprendre ces mécanismes de transduction.

La mitochondrie est un acteur clé des flux énergétiques de la cellule et émet des signaux en relation directe avec le statut énergétique, comme l'ATP. Ce rôle majeur est déjà bien identifié dans le glucose « sensing » de la cellule β . La mitochondrie apparaît comme un véritable « détecteur » métabolique dans ce mécanisme.

VI. La mitochondrie et la « détection » énergétique

A. Le fonctionnement mitochondrial

Les voies métaboliques associées aux différents nutriments convergent vers un produit carrefour : l'Acétyl-CoA qui est ensuite pris en charge par le cycle de Krebs. Le cycle de Krebs permet l'oxydation complète de l'Acétyl-CoA. L'énergie est transférée sous forme d'équivalents réduits, NADH et $FADH_2$. Plus les rapports $NADH/NAD^+$ et $FADH, H^+/FAD^+$ sont élevés, plus l'énergie réduite est importante. Cette énergie réduite (NADH et $FADH, H^+$) est le substrat de la Chaîne Respiratoire Mitochondriale (CRM) (**Figure 17**).

1. Phosphorylation oxydative

Les électrons sont transférés tout le long de la CRM au cours des réactions d'oxydo-réduction jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène. Ceci est possible du fait des potentiels redox croissants des accepteurs d'électrons des différents complexes le long de cette chaîne. Ce transfert d'électrons est couplé à la création d'un gradient transmembranaire de protons. La dissipation de ce gradient de protons par l'ATP synthase permet la synthèse d'ATP (**Figure 17**). La phosphorylation oxydative traduit ainsi le processus par lequel de l'ATP est formé lorsque des électrons sont transférés à partir du NADH_2 et du FADH_2 jusqu'à l' O_2 .

Le rendement des phosphorylations oxydatives est défini comme le rapport entre l'énergie récupérée sous forme de potentiel phosphate et le potentiel redox consommé ou encore entre la quantité d'ATP produite et la quantité d'oxygène consommée : rapport ATP/O_2 . Ce rendement des phosphorylations oxydatives dépend de plusieurs paramètres :

- La nature des substrats métabolisés (acides gras ou carbohydrates): celle-ci affecte la stœchiométrie des phosphorylations oxydatives en modifiant le ratio entre le NADH^+ , H^+ et le FADH_2 , l'oxydation du NADH^+ implique trois sites de couplage successifs (complexes I, III et IV), alors qu'il n'en existe que 2 en ce qui concerne le FADH_2 (complexes III et IV). Ainsi, la synthèse d'ATP est inférieure de l'ordre de 40% lors de l'oxydation du FADH_2 comparé au NADH^+ . Le NADH_2 fournit donc plus d'énergie que le FADH_2 . Ainsi, selon que les substrats produisent une proportion plus ou moins grande de NADH_2 par rapport au FADH_2 , la production d'ATP varie (Leverve and Fontaine, 2001).
- Le découplage (fuite de protons) : dans certaines conditions, la perméabilité membranaire aux protons peut être augmentée par des canaux : les UCPs (**Figure 18**). Ces UCPs sont insérées dans la membrane interne de la mitochondrie (Nicholls and Rial, 1999). Les protons sont alors capables d'entrer dans la matrice sans passer par l'ATP synthase, découplant ainsi la respiration de la synthèse d'ATP. Dans les adipocytes bruns, c'est la protéine découplante UCP1 (Trayhurn and Mercer, 1986) qui permet de dissiper le gradient H^+ pour produire de la chaleur, grâce à l'accélération du transfert des électrons le long de la CRM (Nicholls and Locke, 1984). Ce découplage est le mécanisme clé de la thermogénèse. Pour l'étude des

capacités maximales de respiration, le découplage peut être induit par des molécules chimiques comme le Carbonyl cyanide m-chlorophénylhydrazone (CCCP).

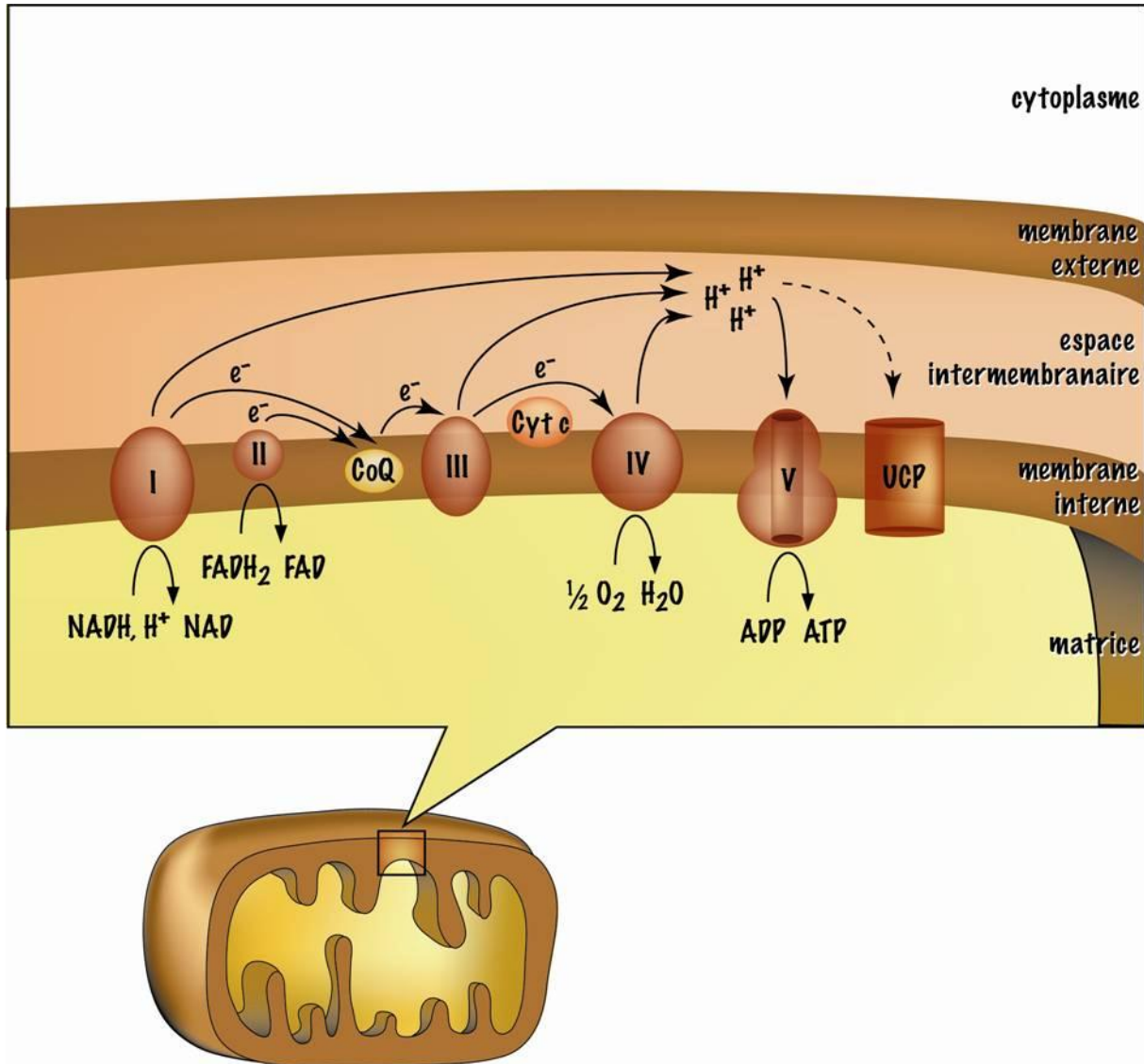


Figure 17 : Le transit des électrons au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Les substrats NADH₂ et FADH₂ fournissent leur électron au complexe I (NADH coenzyme Q réductase ou NADH déshydrogénase) et au complexe II (succinate coenzyme Q réductase ou succinate déshydrogénase) respectivement. Les électrons transitent via le coenzyme Q (ou ubiquinone) au complexe III (coenzyme Q cytochrome C réductase) puis jusqu'au cytochrome C et au complexe IV (cytochrome oxydase). La cytochrome oxydase réduit complètement l'oxygène en eau. Le gradient de protons créé est dissipé au niveau du complexe V (ATP synthase) pour la formation d'ATP et par les canaux UCP.

La mitochondrie est ainsi un organe intra-cellulaire au cœur du système de détection des flux métaboliques. Elle apparaît comme un véritable détecteur moléculaire puisqu'elle perçoit la quantité et la qualité des nutriments (via les substrats de la chaîne respiratoire formé au cours de la métabolisation des nutriments). Il existe une corrélation directe entre le rendement des phosphorylations oxydatives, et donc la production d'ATP et le flux de substrats entrant dans la mitochondrie.

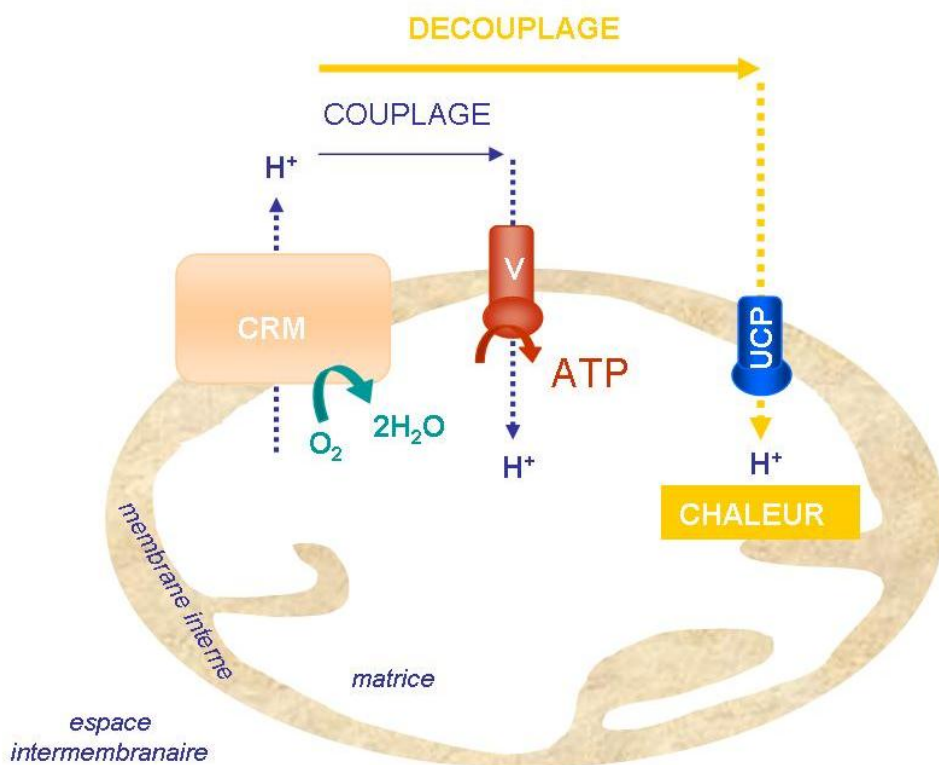


Figure 18 : Principe du découplage

Au cours du transit des électrons le long de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) s'effectue un flux de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Ce gradient électrochimique est utilisé par l'ATP synthase pour transformer cette énergie en ATP. La consommation d'oxygène (autrement dit la respiration) est dite couplée à la production d'ATP. Cependant, les protons peuvent retourner dans la matrice sans passer par le canal à protons de l'ATP synthase. Ce mécanisme de « leak » entraîne la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur. Il y a respiration sans synthèse d'ATP. On dit qu'il y a découplage entre la respiration et la synthèse d'ATP. D'après Carrière-Pazat 2005.

L'ATP n'est cependant pas le seul produit du fonctionnement de la CRM. En effet, le transit des électrons dans la CRM est également la source d'une production d'Espèces Actives de l'Oxygène d'origine mitochondriale (mEAOs), production qui est corrélée aux entrées de substrats dans la mitochondrie. Dans plusieurs types cellulaires, il a pu être mis en évidence que ces mEAOs sont à l'origine d'une signalisation dite «redox» (Droge, 2002; Finkel, 2003; Turrens, 1997), indépendamment de tout effet délétère. Depuis peu, certains travaux montrent que cette production est nécessaire à la détection du glucose dans la cellule β et au niveau hypothalamique (Leloup et al., 2011; Leloup et al., 2006; Leloup et al., 2009; Pi et al., 2007; Pi and Collins, 2010; Pi et al., 2010).

B. Composition de la CRM

La CRM est formée de quatre complexes insérés dans la membrane interne de la mitochondrie.

Le complexe I, NADH-coenzyme Q oxydoréductase ou NADH déshydrogénase est une enzyme contenant plusieurs sous-unités dont l'une est une flavoprotéine. Cette flavoprotéine contient une molécule FMN (Flavine mononucléotide) qui reçoit les électrons et les protons venant du NADH, H^+ . La forme réduite $FMNH_2$ ainsi produite transfère les électrons par oxydo-réduction aux agrégats Fe-S. Les agrégats Fe-S sont ré-oxydés en cédant leurs électrons au coenzyme Q (**Figure 19**).

Le complexe II, succinate-coenzyme Q oxydoréductase ou succinate déshydrogénase, est une déshydrogénase fonctionnant avec le $FADH_2$. Comme dans le complexe I, les électrons provenant du $FADH_2$ sont transférés au coenzyme Q via un agrégat Fe-S (**Figure 19**).

Le complexe III, coenzyme Q-cytochrome c oxydoréductase est composé de cytochromes (cytochrome b_{562} et $_{566}$ et cytochrome c_1) et d'agrégats Fe-S (appelés ici Iron Sulfur Protein (ISP)). Le complexe III transfère ses électrons du coenzyme Q au cytochrome c. Le cytochrome c alors réduit est ré-oxydé par le transfert des électrons sur le complexe IV (**Figure 19**).

Le complexe IV ou cytochrome c oxydase comporte 2 cytochromes a et a3 et 2 atomes de cuivre (**Figure 19**). La réduction complète d'une molécule d'oxygène en deux molécules d'eau utilise quatre électrons provenant de la CRM et quatre protons.

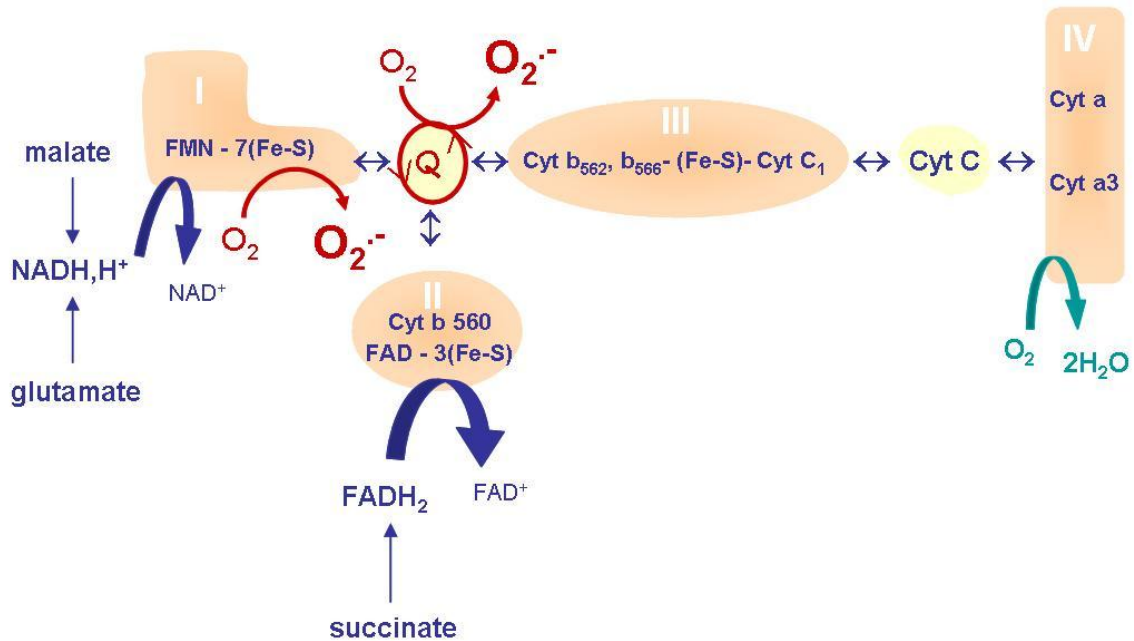


Figure 19 : Le transit des électrons au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale

Les substrats donneurs de NADH₂ et FADH₂ fournissent leurs électrons au complexe I (NADH coenzyme Q réductase ou NADH déshydrogénase) et au complexe II (succinate coenzyme Q réductase ou succinate déshydrogénase) respectivement. Les électrons transitent via le coenzyme Q (Q) au complexe III (coenzyme Q cytochrome c réductase) jusqu'au cytochrome c et au complexe IV (cytochrome oxydase). La cytochrome oxydase réduit complètement l'oxygène en eau. Au cours du transfert des électrons, il peut y avoir réduction monoélectronique de l'oxygène pour donner l'anion superoxyde (O₂^{·-}) (on parle de fuite d'électrons). Cette production existe principalement au niveau du complexe I et III, dans des conditions physiologiques. D'après Liu et al 2002.

Le flux de protons (à l'origine du potentiel de membrane mitochondrial) généré par ces réactions d'oxydo-réaction crée une force proton motrice. Cette force pousse les protons à emprunter le canal à protons de l'ATP synthase et l'énergie qu'ils libèrent est alors utilisée pour synthétiser de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (**Figure 20**).

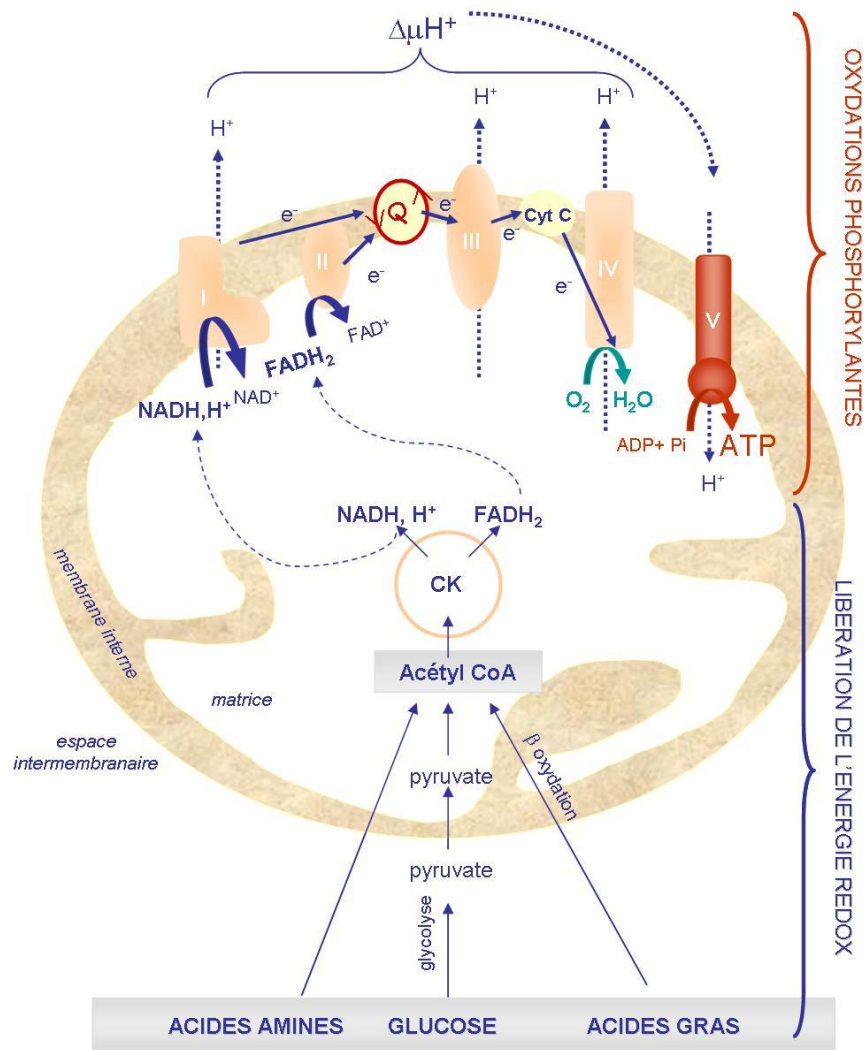


Figure 20 : Schéma simplifié du fonctionnement mitochondrial.

L'énergie redox contenue dans les nutriments glucose, acides aminés et acides gras est libérée sous la forme d'équivalents réduits NADH,H⁺ et FADH₂ utilisés comme donneurs d'électrons pour la chaîne respiratoire. La consommation d'oxygène par la chaîne respiratoire est couplée au fonctionnement de l'ATP synthase: ce sont les oxydations phosphorylantes.

D'après Carrière-Pazat 2005.

C. Production des mEAOs

Les mEAOs sont produites principalement au niveau des complexes I et III de la CRM. Une part de l'oxygène consommée (autour de 1%) échappe à la réduction complète en molécule d'eau et subit une réduction mono-électronique au niveau des complexes I et III de

la chaîne respiratoire pour donner naissance à l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). La mitochondrie est identifiée comme le site majeure de production d' $O_2^{\cdot-}$ dans la cellule (Brand, 2010).

En ce qui concerne la fuite d'électrons de la chaîne respiratoire au niveau du complexe I, deux théories se confrontent. La première (Genova et al., 2003) énonce qu'un centre Fe-S serait la source de l'addition directe d'un électron à l'oxygène ou indirecte via la réduction de quinones exogènes hydrophiles. Ces quinones alors sous la forme semiquinone sont très instables et peuvent réduire l'oxygène en $O_2^{\cdot-}$. L'autre théorie propose que ce soit le groupement FMN qui soit responsable de la production d' $O_2^{\cdot-}$ (Liu et al., 2002).

Au niveau du complexe III, le coenzyme Q sous sa forme ubisemiquinone QH \cdot , est responsable de la production d' $O_2^{\cdot-}$ (Turrens et al., 1985).

Dans le début des années 80, Turrens et ses collaborateurs (Turrens and Boveris, 1980) avaient proposé que la production d' $O_2^{\cdot-}$ par le complexe I soit équivalente à 50% de celle produite par l'ubisemiquinone et donnaient ainsi une place prépondérante au complexe III dans la production totale d' $O_2^{\cdot-}$ mitochondrial. Cependant la localisation de cette production semble dépendre fortement du tissu examiné (Kwong and Sohal, 1998). Ces dernières années, le rôle majeur joué par le complexe I dans les cellules du cerveau a été clairement mis en évidence (Barja, 1999; Liu et al., 2002).

1. La modulation de la production des mEAOs

La production d' $O_2^{\cdot-}$ par les complexes I et III, est un processus non enzymatique dépendant de la concentration en oxygène [O_2] et de l'état de réduction des transporteurs de la chaîne respiratoire [RH]. Tout évènement qui modifie l'un et/ou l'autre de ces deux paramètres modifie la production $O_2^{\cdot-}$.

L'état de réduction des transporteurs d'électrons peut être modulé par l'apport d'électrons à la CRM en relation avec le potentiel redox NADH, H^+/NAD^+ et $FADH_2$, ainsi que par le potentiel de membrane. Lorsque les transporteurs sont dans un état réduit, ils sont potentiellement donneurs d'électrons et la production d' $O_2^{\cdot-}$ est alors élevée. En présence d'oxygène et d'ADP, la chaîne respiratoire et l'ATP synthase fonctionnent intensément et de manière coordonnée. Le potentiel de membrane est faible, les transporteurs d'électrons sont

dans un état oxydé et la production d' $O_2^{\cdot -}$ est alors très faible. En revanche, en absence d'ADP, l'ATP synthase ne peut pas fonctionner. Le gradient de protons ne peut donc pas être dissipé, le potentiel de membrane est élevé. Ceci ralentit le flux d'électrons au sein de la CRM et la concentration en transporteurs d'électrons réduits augmente. La production d' $O_2^{\cdot -}$ est alors élevée (Boveris and Chance, 1973).

D. Chimie des EAOs et source subcellulaire

1. Réduction mono-électrique de l'oxygène et EAOs

Les EAOs sont des espèces dérivées de l'oxygène moléculaire se présentant sous forme de radicaux libres ou de molécules (Calderon and Roberfroid, 1988; Gutteridge, 1994).

Les radicaux libres sont généralement instables et peuvent réagir rapidement avec d'autres molécules chimiques environnantes du fait de leur électron célibataire. Ils peuvent soit arracher un électron (être des oxydants) soit en céder un (être des réducteurs). Ces réactions radicalaires conduisent souvent à la formation d'un nouveau radical propageant ainsi le phénomène par réaction en chaîne.

2. Les différentes EAOs

a. L'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$

Il provient de la réduction mono-électrique de l'oxygène moléculaire : $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot -}$. $O_2^{\cdot -}$ est relativement peu réactif, il n'est ni un bon oxydant, ni un bon réducteur. Sa demi-vie est très courte et il est peu diffusible. En revanche, il est le précurseur d'autres EAOs comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

b. Le peroxyde d'hydrogène H₂O₂

O₂⁻ disparaît rapidement par dismutation spontanée : $O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$.

H₂O₂ est plus stable qu'O₂⁻ et diffuserait dans les milieux aqueux et lipidiques de la cellule. H₂O₂ n'est pas un radical libre mais donne naissance, par réduction mono-électronique, à un des radicaux les plus réactifs : le radical hydroxyle ·OH. Actuellement, H₂O₂ est considérée comme la molécule de signalisation dérivée de l'anion superoxyde dans les régulations dites « redox ».

c. Autres espèces radicalaires

De nombreuses autres espèces radicalaires peuvent être générées. Ainsi, le radical hydroxyle est un puissant oxydant et ses constantes de vitesse de réaction avec les substrats biologiques sont également très importantes. Sa durée de vie est très faible (de l'ordre de 10⁻⁶s). Le radical hydroxyle est hautement toxique car il réagit avec les macromolécules voisines telles que les acides nucléiques, les protéines, les acides gras polyinsaturés et les glucides.

Les radicaux alkyles R· et les peroxydes ROO· sont générés à la suite de l'action oxydante de ·OH sur les chaînes d'acides gras polyinsaturés (RH). R· et ROO· sont à l'origine des processus radicalaires en chaîne et en particulier de la peroxydation lipidique (Slater, 1982).

3. Sources non mitochondriales des EAOs

Au niveau membranaire, la NADPH oxydase catalyse la réduction mono-électronique de l'oxygène en utilisant le NADPH ou le NADH comme donneur d'électrons (**Figure 26**).

Au niveau du réticulum endoplasmique, les cytochromes P-450 mono-oxygénases sont impliqués dans la détoxification par oxydation d'un grand nombre de xénobiotiques tels que les anesthésiques, les pesticides et les polluants divers. La fixation de substrats peu ou pas

oxydables (pour des raisons stériques ou chimiques) favorise la production d'anions superoxydes $O_2^{\cdot-}$ (Cross and Jones, 1991).

Au niveau des peroxyosomes, les oxydases utilisent l'oxygène moléculaire pour effectuer des réactions cataboliques et produisent $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 . Les monoamines oxydases produisent également de l' H_2O_2 en catabolisant les monoamines (dopamine, noradrénaline...). La gestion des concentrations cellulaires, voire subcellulaires des différentes EAOs est liée à la présence de systèmes dits « antioxydants » enzymatiques et non enzymatiques. Leur fonctionnement est optimisé dans la mesure où leur action combinée est synergique.

E. Système de gestion des EAOs

Halliwell décrit les antioxydants comme des «substances qui, présentes à faibles concentrations par rapport à un substrat oxydable, retardent significativement ou inhibent l'oxydation de ce substrat» (Halliwell et al., 1995). Ces systèmes antioxydants peuvent agir de différentes manières (Gutteridge, 1994) : par l'inhibition de la formation des EAOs (détoxification directe) ou par la régulation des mécanismes oxydatifs engendrés.

1. Inhibition de la formation des EAOs

Dans cette partie, seuls les systèmes antioxydants présents au niveau cellulaire seront envisagés. L'activité des UCPs, bien que ces protéines ne soient pas des antioxydants, sera abordée : en effet, en favorisant le découplage de la CRM, les UCPs limitent la formation de l'anion superoxyde par la mitochondrie.

2. Détoxification directe des EAOs

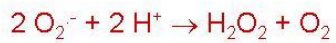
a. Système enzymatique

Les principales enzymes anti-oxydantes ainsi que les réactions qu'elles catalysent et les localisations subcellulaires des isoformes jusqu'à présent décrites (Malorni et al., 2007; Mates and Sanchez-Jimenez, 1999) sont illustrées par la **figure 21**.

L'activité superoxyde dismutase (SOD) (McCord and Fridovich, 1969), assure la dismutation de $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 et O_2 . Trois isoformes de SOD sont présentes chez l'homme : la SOD1 et SOD3 (cuivre / zinc dépendantes) et la SOD2 (manganèse dépendante). La SOD3 extracellulaire est présente dans les espaces interstitiels et les fluides extracellulaires tels que le plasma sanguin et la lymphe (Mates and Sanchez-Jimenez, 1999). La SOD2 est localisée uniquement dans la matrice mitochondriale. L'action des SOD est couplée à celle d'enzymes décomposant H_2O_2 : la catalase et les glutathion peroxydases.

La catalase est une enzyme héminique, qui décompose H_2O_2 en eau et oxygène. Son activité est inhibée par le 3-amino-1,2,4-triazole ou à des concentrations en H_2O_2 supérieure à 100 μM . Enfin, les souris dont le gène codant pour la catalase a été inactivé ont un développement normal. Elles présentent cependant des signes de sensibilité au stress oxydant (Ho et al., 2004).

Superoxyde Dismutase (SOD)



Catalase (Cat)



Glutathion peroxydase Se dépendante (GPx)

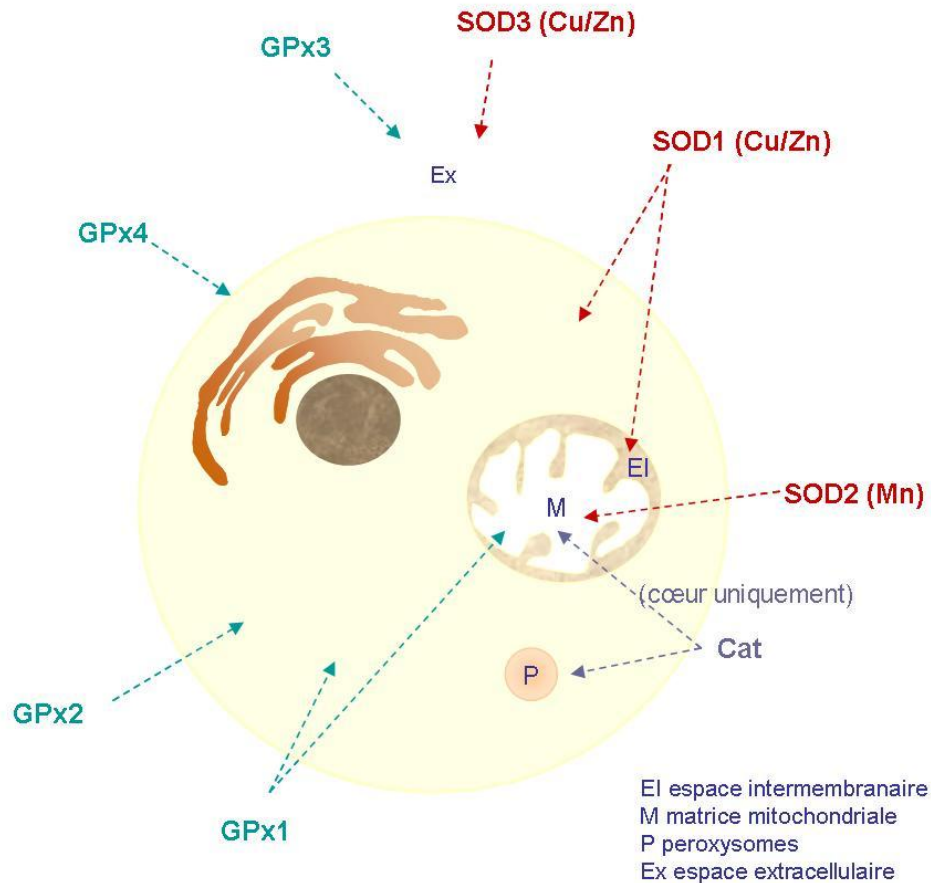
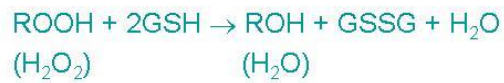


Figure 21 : Mécanisme d'action des enzymes antioxydantes et localisation subcellulaire

Le schéma ci-dessus présente les principales enzymes antioxydantes: les SOD, les GPx et la catalase. Différentes isoformes de ces enzymes existent et ont des localisations subcellulaires particulières.

D'après Carrière-Pazat 2005.

Les glutathion peroxydases (GPx), enzymes à sélénium, décomposent H_2O_2 et les hydroperoxydes, en présence de glutathion réduit (GSH), facteur limitant. La GPx 1 présente dans le cytosol et la matrice mitochondriale joue un rôle majeur dans la plupart des tissus. L'importance de ces enzymes anti-oxydantes dans la gestion des EAOs est clairement mise en évidence par le phénotype des animaux transgéniques invalidés pour les gènes correspondants. Ainsi, les souris invalidées pour le gène SOD 2 (Sod2^{-/-}) présentent une létalité néonatale associée à une cardiomyopathie, une accumulation massive de lipides dans le foie et des diminutions dramatiques de l'activité d'enzymes mitochondriales contenant des agrégats Fe-S (aconitase, succinate et NADH déshydrogénases) (Li et al., 1995). Une étude sur des souris hétérozygotes Sod2^{+/-} âgées de 3 mois, montre des signes de dommages oxydatifs de l'ADN mitochondrial, une altération dans le rendement bioénergétique et la respiration mitochondriale. L'augmentation de l'apoptose conduirait à la senescence tissulaire et au vieillissement prématuré de ces souris (Kokoszka et al., 2001). Les souris déficientes pour le gène codant pour la GPx 1 (GPx 1^{-/-}) sont viables. Une augmentation des hydroperoxydes lipidiques dans le foie est observée chez ces souris et les mitochondries du foie produisent 4 fois plus d' H_2O_2 que les mitochondries des animaux contrôles (Esposito et al., 2000). De plus, ces souris présentent une diminution de 20% du poids corporel s'expliquant probablement par un retard de croissance dû au stress oxydant.

A l'inverse, les souris sur-exprimant la GPx 1 (McClung et al., 2004) développent une hyperglycémie, une hyper-insulinémie et une augmentation de la leptine circulante. Elles présentent également une augmentation de leur masse grasse. Leur insulino-résistance s'accompagne d'une diminution significative de la phosphorylation du récepteur à l'insuline dans le foie. Ainsi, de façon paradoxale, l'insulino-résistance ne se développe pas à cause d'un stress oxydant (donc en présence d'un excès d'EAOs) mais à la suite d'une forte diminution *in situ* des EAOs (due à l'activité exacerbée de la GPx entraînant un statut anormalement réduit). Ce travail démontre que la signalisation cellulaire redox-dépendante est nécessaire et contrôlée de façon très précise.

b. Les «piègesurs» d'EAOs

Les principaux systèmes antioxydants non enzymatiques de la cellule sont le plus souvent soit lipophiles (vitamine E, coenzyme Q ou ubiquinone et caroténoïdes), soit

hydrophiles (vitamine C, glutathion). L'acide α -lipoïque, molécule amphiphile et coenzyme nécessaire à l'activité de différentes enzymes (complexe pyruvate décarboxylase), est aussi un excellent piègeur de la plupart des EAOs (Packer et al., 1995).

Le glutathion occupe une place très importante dans la gestion de l'équilibre redox. C'est un tripeptide (glutamate, cystéine, glycine) présent dans toutes les cellules eucaryotes. Le rôle antioxydant du glutathion est lié à la présence d'un groupement thiol $-SH$ sur le glutathion réduit (GSH). Le couple GSH/GSSG est le principal couple redox des cellules eucaryotes. Il protège les cellules des dommages oxydatifs induits par les EAOs. Il est le maillon essentiel de la régulation de la présence de ponts disulfure ($-S-S-$) sur les chaînes peptidiques. Le GSH agit comme un puissant antioxydant. Il est le cofacteur spécifique des GPx, qui ont pour rôle de réduire H_2O_2 ou les ROOH en H_2O et ROH respectivement. Le GSH est lui-même piègeur de radicaux libres tels que les radicaux O_2^- , $\cdot OH$ et ROO \cdot . La régénération du GSH à partir du GSSG est réalisée par la glutathion réductase (GR) en présence de NADPH, H^+ . Le stockage cellulaire du glutathion se fait pour 90 % dans le cytosol et 10% dans la mitochondrie qui est incapable de le synthétiser.

3. Régulation des mécanismes oxydatifs

Les protéines peuvent être oxydées au niveau de groupement thiol $-SH$ de leurs résidus cystéines par l'action des EAOs. La thioredoxine, la protéine Ref-1 (Redox factor 1) ou encore le glutathion sont considérés comme des «donneurs de $-SH$ », capables de réduire les résidus cystéine oxydés. La régénération de la thioredoxine réduite est assurée par la thioredoxine réductase en présence de NADPH, H^+ (**Figure 22**). La glutathion réductase, elle, joue un rôle essentiel dans la réduction des résidus cystéines en régénérant le GSH (**Figure 23**).

D'autres oxydoréductases participent aux mécanismes de régulation de la production d'EAOs, comme les peroxyredoxines, qui réduisent le peroxyde d'hydrogène en présence de thioredoxine. Les peroxyredoxines sont des enzymes capables de dégrader non seulement le peroxyde d'hydrogène, mais aussi les peroxydes organiques, grâce à leur résidu cystéine.

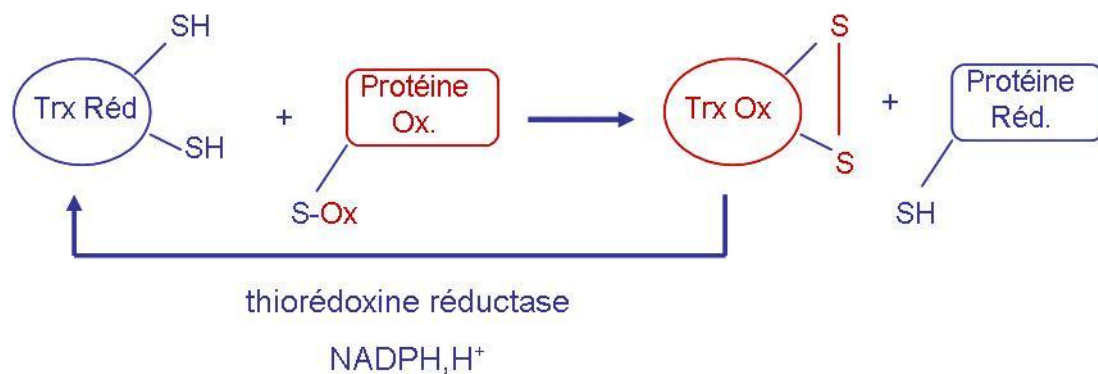


Figure 22 : La thiorédoxine réduite, réducteur de résidus cystéine oxydés.

La thiorédoxine réduite (Trx Réd) est un donneur de –SH. Elle est en effet capable de réduire les résidus cystéines oxydés (S-Ox) d'une protéine et de régénérer la forme réduite. La thiorédoxine alors dans un état oxydé (Trx Ox) est réduite par la thiorédoxine réductase, en présence de NADPH, H⁺ et se retrouve disponible.

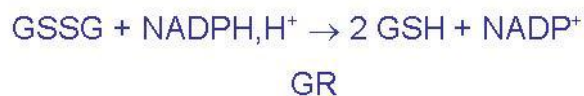


Figure 23 : Régénération du glutathion réduit par la glutathion réductase

Le glutathion sous sa forme réduite (GSH) agit comme la thiorédoxine (donneur de –SH) et intervient également comme cofacteur nécessaire à la glutathion peroxydase, il peut donc se retrouver sous forme oxydée (GSSG). La glutathion réductase (GR), en présence de NADPH, H⁺, permet la régénération de la forme réduite.

4. Synergie des systèmes

Les différentes molécules anti-oxydantes ainsi que les systèmes enzymatiques agissent de concert en formant des chaînes de détoxification des EAOs : c'est la «chaîne radicalaire». L'inhibition de la peroxydation lipidique est un modèle de cette activité synergique des différents partenaires antioxydants. L' α -tocophérol (α -TOC, forme la plus active des tocophérols ou vitamine E) se transforme en radical α -tocophéryl (α -TOC[•]) à la suite de sa réactivité avec un radical ROO[•]. L' α -TOC[•] peut être régénéré par la vitamine C réduite ou

acide ascorbique (AH₂) (Shi et al., 1999), elle-même régénérée par le GSH lui-même régénéré par la glutathion réductase en présence de NADPH. Le NADPH peut être lui-même régénéré par la voie des pentoses phosphates.

5. Gestion spécifique des mEAOs : activité des UCPs

a. Le «mild uncoupling»

Toute situation qui diminue de façon modérée le potentiel de membrane a tendance à diminuer la production d'O₂⁻. C'est la théorie du «mild uncoupling» (Skulachev, 1998). En effet, lors d'un découplage modéré entre le fonctionnement de la CRM et celui de l'ATP synthase, les transporteurs sont dans un état plutôt oxydé, les contraintes au sein de la chaîne respiratoire sont faibles et la production d'O₂⁻ est faible.

Les acides gras participent de façon importante à la gestion des mEAOs en activant les UCPs. Ils permettent alors l'abaissement du gradient électrochimique et du potentiel de membrane. Cet effet antioxydant des acides gras est renforcé par leur capacité à activer les GPx (Duval et al., 2002).

On peut ainsi considérer que les protéines UCPs font partie du système de gestion des mEAOs. Elles sont d'autant plus efficaces qu'elles agissent directement au niveau de la source de production des mEAOs. A ce jour, plusieurs isoformes ont été identifiées (UCP1-5), les isoformes UCP2, 4 et 5 sont les principales isoformes dans le SNC (Andrews et al., 2005). Au niveau hypothalamique en particulier, l'isoforme UCP2 est bien représentée et son implication dans les signalisations en réponse au statut énergétique est établi (Arsenijevic et al., 2000; Barnstable et al., 2003; Diano et al., 2003; Horvath et al., 2002; Horvath et al., 2003a; Horvath et al., 2003b; Pecqueur et al., 2009; Pecqueur et al., 2001; Richard et al., 2001).

b. L'activation d' UCP2 par les EAOs : un rétrocontrôle négatif

Le lien entre UCP2 et EAOs a été démontré par de nombreux travaux (Echtay et al., 2002a; Echtay et al., 2002b; Negre-Salvayre et al., 1997). Ces études mettent en évidence, sur des mitochondries isolées, que l' O_2^- augmente la conductance membranaire aux protons via l'activation de la protéine découplante UCP2. Le découplage modéré induirait alors une baisse du potentiel de membrane et en conséquence une baisse de production d' O_2^- . Ce mécanisme d'activation d'UCP2 par les EAOs constituerait un système de rétrocontrôle négatif. En cas de concentration trop élevée en O_2^- , l'activation d'UCP2, en stimulant le transport des protons et des électrons, et par l'induction de sa synthèse, serait un moyen de limiter la production de mEAOs (**Figure 24**).

F. Importance physiologique des EAOs

1. L'homéostasie redox

Comme nous l'avons décrit précédemment, la concentration des EAOs résulte de l'équilibre entre les systèmes producteurs de radicaux libres et les systèmes anti-oxydants. Le maintien à un état d'équilibre constitue l'homéostasie redox. Une production relativement modérée d'EAOs, par les systèmes générateurs d'une part et grâce aux systèmes anti-oxydants d'autre part, induit une augmentation physiologique aigue et transitoire de la concentration d'EAOs. Cette production modérée et transitoire d'EAOs peut alors modifier certaines cibles environnantes de manière réversible. Les EAOs peuvent alors agir en tant que molécules «signal» : on regroupe aujourd'hui cet effet sous le terme de signalisation redox.

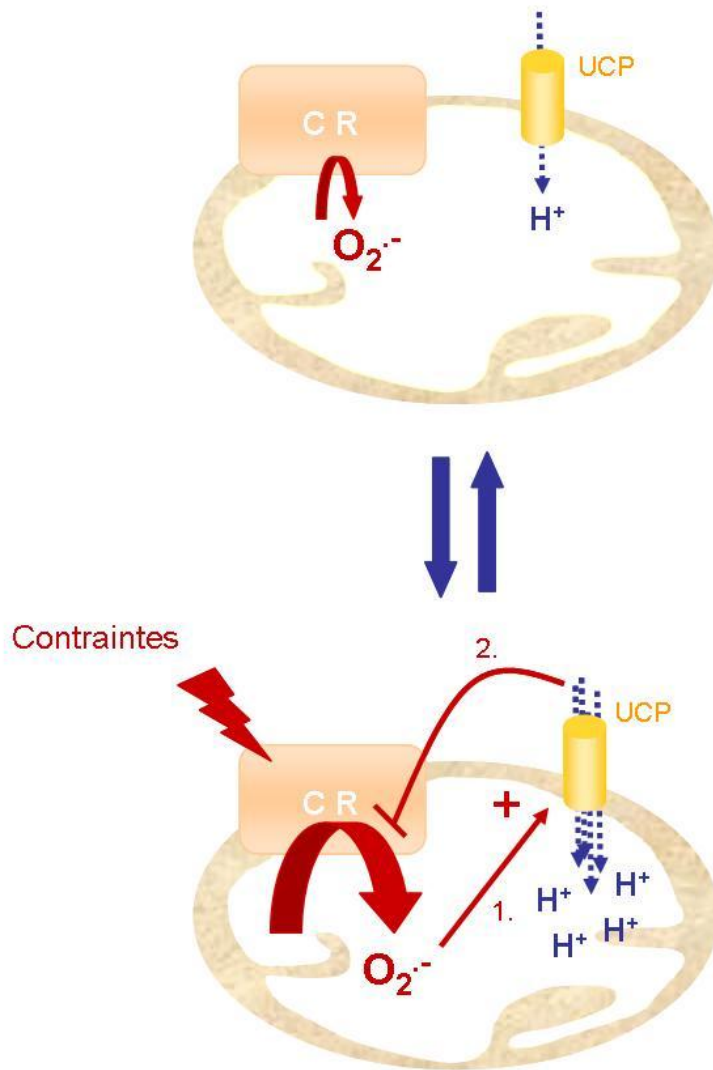


Figure 24 : L'activation des UCPs par les Espèces Actives de l'Oxygène

Des contraintes exercées sur le flux d'électrons au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) peuvent entraîner une surproduction d'anion superoxyde dans la matrice mitochondriale notamment. Ce dernier est capable de stimuler l'activité protonophore des protéines découplantes UCPs (1.). En conséquence, le potentiel de membrane est abaissé et donc la production d'anion superoxyde fortement diminuée (2.). Ce système d'activation des UCPs par l'anion superoxyde pourrait constituer un rétrocontrôle négatif visant à contrôler les concentrations d'anion superoxyde.

Ainsi, lorsque le système est bien géré, la signalisation redox mettant en jeu notamment la réponse antioxydante permet un retour rapide à l'état redox initial (**Figure 25**). Ces productions transitoires d'EOs sont associées à l'activation de voies de signalisation intracellulaires (Droge, 2002).

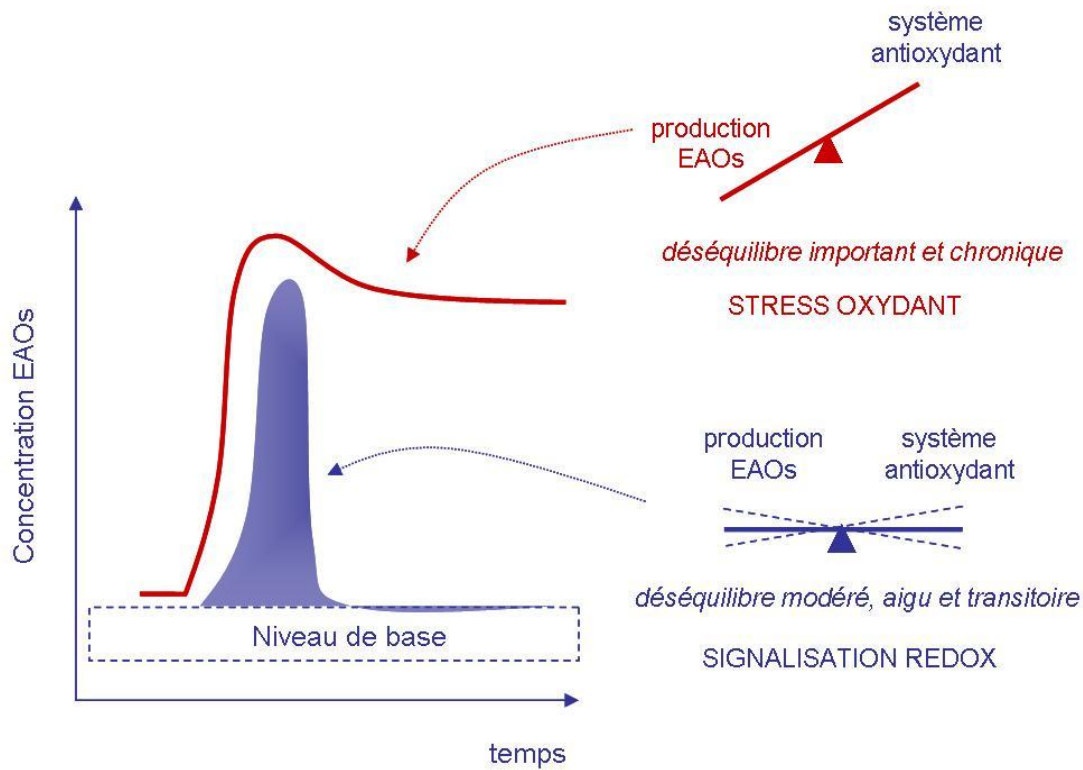


Figure 25 : L'homéostasie redox.

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

D'après Dröge 2002.

Lorsque les systèmes de gestion des EOs sont dépassés (excès de production d'EOs et/ou diminution des systèmes anti-oxydants), il y a ce qu'on appelle un stress oxydant. Ce stress oxydant résulte d'une concentration élevée et persistante dans le temps d'EOs, qui ne peut plus être gérée par les systèmes anti-oxydants. Les modifications des molécules environnantes sont non spécifiques et irréversibles et endommagent leur fonction.

C'est dans cette situation que les EAOs à l'origine d'un stress oxydant massif interviennent dans la toxicité et la physiopathologie. Cet aspect pathologique ne sera pas envisagé ici.

2. Régulation des voies de signalisation et de l'expression génique

a. Mécanisme biochimique : oxydation des résidus cystéine

La signalisation par les mEAOs est le plus souvent médiée par des protéines qui possèdent des cystéines dont les groupements thiol sont situés dans les sites actifs. Ces groupements thiol peuvent être directement oxydés par les EAOs ou par des modifications du potentiel redox d'un couple prépondérant comme celui du glutathion. Un environnement oxydant favorise la formation de ponts disulfures (-S-S-) au niveau des cystéines. De plus, le groupement thiol (-SH) peut être oxydé en groupe sulfénique (-SOH), sulfonique (-SO₂H) voire sulfonique (-SO₃H). Ces oxydations sont réversibles (sous l'action de la thioredoxine réduite ou de glutathion réduit, réducteurs recyclables). Ces cystéines peuvent se trouver dans des domaines particulièrement importants pour l'activité de la protéine (Morel and Barouki, 1999). La régulation des protéines de signalisation par les EAOs et les modifications de l'état redox sont très rapides, réversibles et ne nécessitent pas la synthèse de protéines *de novo*. Ces caractéristiques permettent une transduction rapide des signaux.

b. Régulation redox des protéines kinases et phosphatases

Les EAOs et l'état redox peuvent modifier l'activité de protéines kinases ou phosphatases (Chiarugi and Cirri, 2003). Un traitement avec H₂O₂ extracellulaire entraîne par exemple une augmentation massive de la phosphorylation des résidus tyrosine, et ce sur de nombreuses protéines (Allen and Tresini, 2000). La plupart du temps, cet effet passe par une inactivation des phosphatases. Il a en effet été montré que H₂O₂ et O₂⁻ sont à l'origine de l'oxydation spécifique et réversible d'un résidu cystéine localisé dans le site catalytique des tyrosines phosphatases les rendant inactives (Barrett et al., 1999; Denu and Tanner, 1998). Les phosphatases PTEN (phosphatase and tensin homolog, qui interviennent dans la

régulation de la voie PI3K/Akt), Cdc25 (qui module l'activité des cyclin-dependent kinases, impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire) et PTP-1B (proteine tyrosine phosphatase 1B, impliquée dans la signalisation de l'insuline) sont soumises à cette régulation redox (Cho et al., 2004).

Les Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK) sont également des relais dans la signalisation intracellulaire sensibles aux EAOs. Ce sont des sérine-thréonine kinases qui transmettent les signaux de la membrane plasmique jusqu'au noyau via la phosphorylation de certains facteurs de transcription. Les trois membres de cette famille, ERK1/2 (Extracellular signal Regulated Kinase), JNK (c-Jun N-terminal Kinase) et p38MAPK sont phosphorylés et donc activés suite à une administration extracellulaire de H₂O₂, ce phénomène étant bloqué par un prétraitement avec des antioxydants (Lo et al., 1996).

c. Régulation redox des facteurs de transcription

De nombreux facteurs de transcription sont régulés par l'état redox de la cellule. C'est ainsi que les EAOs peuvent déclencher des systèmes d'adaptations de la cellule afin de maintenir l'équilibre redox. Chez E.Coli, la régulation redox de la transcription passe par deux facteurs de transcription, SoxR (sensible à O₂^{·-}) et OxyR (sensible à H₂O₂) qui ne sont opérationnels que sous leur forme oxydée (Zheng et al., 1998). Chez les eucaryotes supérieurs, bien qu'aucun équivalent simple de ces facteurs de transcription n'ait été mis en évidence, il a été démontré qu'une augmentation de la concentration en EAOs induit l'expression de nombreux gènes, dont ceux codant pour les défenses anti-oxydantes, comme la catalase, la SOD 2 (Shull et al., 1991) ou encore la thiorédoxine réductase (Sachi et al., 1995). Cette augmentation des systèmes de gestion par les EAOs elles-mêmes constitue un rétrocontrôle négatif.

Cette régulation peut se faire soit directement via l'oxydation de cystéines critiques au sein même du facteur de transcription soit indirectement via la modification oxydative de l'activité de protéines kinases/phosphatases en amont des facteurs de transcription. Un exemple intéressant est la dualité dans la régulation redox de NFκB et AP1: un environnement oxydant est nécessaire pour leur activation dans le cytoplasme tandis que dans le noyau doit régner un environnement plutôt réduit pour leur permettre de se fixer à ses séquences cibles

(Kim et al., 2010). Ces deux exemples de régulation redox de NFκB et d'AP1 montrent que le site subcellulaire de production d'EAOs a une importance fondamentale : des taux relativement élevés d'EAOs dans le cytoplasme ou dans le noyau ont des répercussions totalement opposées sur l'activité de ces facteurs de transcription.

G.Métabolisme redox – pathologies métaboliques

Il existe une très large littérature montrant l'implication des EAOs et du métabolisme redox dans les pathologies métaboliques, comme l'obésité et d'insulino-résistance. Par exemple, chez le rat adulte Wistar nourrit avec un régime hypercalorique (lipidique et glucidique), on observe une augmentation du poids au bout de 8 semaines avec hypertriglycéridémie associée à une corrélation négative entre l'augmentation des TBARS (Thiobarbituric acid substances) plasmatiques (marqueurs de peroxydation lipidique) et une diminution de l'activité de la SOD érythrocytaire (Beltowski et al., 2000).

Le stress oxydant a été identifié comme un symptôme majeur des complications liées à l'hyperglycémie dans le cas du diabète. En effet, une augmentation de la production d'EAOs est observée lors d'une hyperglycémie, entraînant un déséquilibre de l'état Red/Ox. Les mitochondries sont une des principales sources cellulaires productrices d'EAOs, et dans le cas d'une hyperglycémie, leur participation à cette surproduction est majeure. Cette augmentation de la production d' O_2^- lors du transfert d'électron dans la CRM au cours d'une hyperglycémie accentue de multiples voies pathogènes, conduisant à de multiples complications (Brownlee, 2001).

De même, les souris transgéniques obèses et diabétiques KKay présentent un stress oxydant avec une augmentation du Malondialdéhyde (MDA) plasmatique et du 8-isoprastane urinaire. Mais les tissus étudiés, cœur et reins, présentent une augmentation des ARNm d'enzymes antioxydantes telles que la GPx et la SOD (Fujita et al., 2005).

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

L'hypothèse d'un lien entre la surproduction d'EAOs et insulino-résistance provient également d'autres observations. D'une part, des antioxydants (l'acide lipoïque en particulier) améliorent la sensibilité à l'insuline (Maddux et al., 2001). D'autre part, le peroxyde d'hydrogène inhibe le transport de glucose dépendant de l'insuline dans des cellules musculaires (Maddux et al., 2001). Ainsi, la surproduction d'EAOs jouerait un rôle fondamental dans la mise en place de l'insulino-résistance.

H. Les EAOs mitochondriales : de véritables « senseurs » métaboliques

Très souvent étudiées pour leurs effets délétères dans le vieillissement, les maladies neuro-dégénératives ou encore le diabète (« stress oxydant »), les mEAOs apparaissent depuis une dizaine d'année comme de véritables seconds messagers.

Une première étude fondatrice a montré en culture sur plusieurs types cellulaires que l'augmentation de la concentration en pyruvate favorisait la production de mEAOs (Nemoto et al., 2000). Elles déclenchent alors une voie de signalisation «redox sensible» (c'est-à-dire sensible aux EAOs) permettant la réorientation du métabolisme vers une voie de stockage du glucose sous forme de glycogène plutôt que vers son catabolisme oxydatif. Ceci limite secondairement l'apport d'équivalents réduits à la CRM et donc la production d'EAOs qui en résulte.

Dans le laboratoire, il a été montré le rôle des mEAOs dans le devenir cellulaire du tissu adipeux, par le contrôle qu'elles exercent sur la prolifération et la différenciation de ce tissu (Carriere et al., 2004). D'autres études ont montré qu'un équilibre très fin existe entre leur production, l'état redox des tissus et une signalisation adéquate. Par exemple, la surexpression de la glutathion peroxydase (l'isoforme GPx1) conduit à une insulino-résistance, leptino-résistance puis une obésité (McClung et al., 2004). Ces effets semblent être au moins dus aux modifications de phosphorylation des tyrosines kinases du récepteur à l'insuline et de la voie PI3K/Akt dans le foie et le muscle, phosphorylations qui sont normalement en partie stoppées par l'activation de phosphatases redox-sensibles. Au niveau pancréatique, nous avons également montré que la production des mEAOs lors de la détection de l'hyperglycémie était nécessaire à la sécrétion d'insuline sur des îlots fraîchement isolés.

L'utilisation d'antioxydants prévient la sécrétion d'insuline par les cellules β lorsqu'on les expose à une augmentation de la concentration de glucose, indépendamment de la concentration en ATP et de NADH (Leloup et al., 2009). Ce rôle a été confirmé par d'autres études (Pi and Collins, 2010).

Au laboratoire, l'équipe a également fait l'hypothèse que lors de la détection cérébrale du glucose, les mEAOs pouvaient être une voie de signalisation importante dans le déclenchement de la réponse à l'hyperglycémie. Le métabolisme du glucose fournit des équivalents réduits qui cèdent leurs électrons au complexe I et II de la CRM lors de leur oxydation. Lors d'un apport rapide de substrats, leur oxydation provoque l'arrivée massive d'électrons sans régulation immédiate de la dissipation du gradient de protons par l'ATP synthase et/ou l'activité d'UCP. Ce temps d'adaptation de la CRM serait à l'origine d'une élévation transitoire de la production de mEAOs.

Ainsi, une augmentation de la concentration de glucose de 5 à 20mM engendre une production d'EAOs sur des coupes d'hypothalamus (**Figure 26 A**). De plus, l'injection de glucose par la carotide en direction du cerveau engendre, chez le rat, également une augmentation de la production des mEAOs mais aussi de l'activité électrique globale de l'hypothalamus ainsi qu'un pic de sécrétion d'insuline en périphérie (**Figure 26 B, C, D**). Ces deux effets sont mimés par des inhibiteurs de la CRM (entraînant une production de mEAOs) et sont inhibés en présence d'antioxydants ou d'un découplant (CCCP), montrant l'implication des mEAOs dans ce mécanisme (**Figure 26 B, C, D**) (Leloup et al., 2006).

Par ailleurs, un autre travail réalisé au sein de l'équipe vient renforcer ce rôle des mEAOs en tant que seconds messagers dans l'hypothalamus. Une hypertriglycéridémie aiguë engendre dans le VMH spécifiquement une production de mEAOs. L'inhibition de cette production de mEAOs par des antioxydants engendre une absence d'inhibition de la prise alimentaire par les lipides. Cette production de mEAOs est donc indispensable à la médiation du signal satiétogène lors d'une hypertriglycéridémie (Benani et al., 2007).

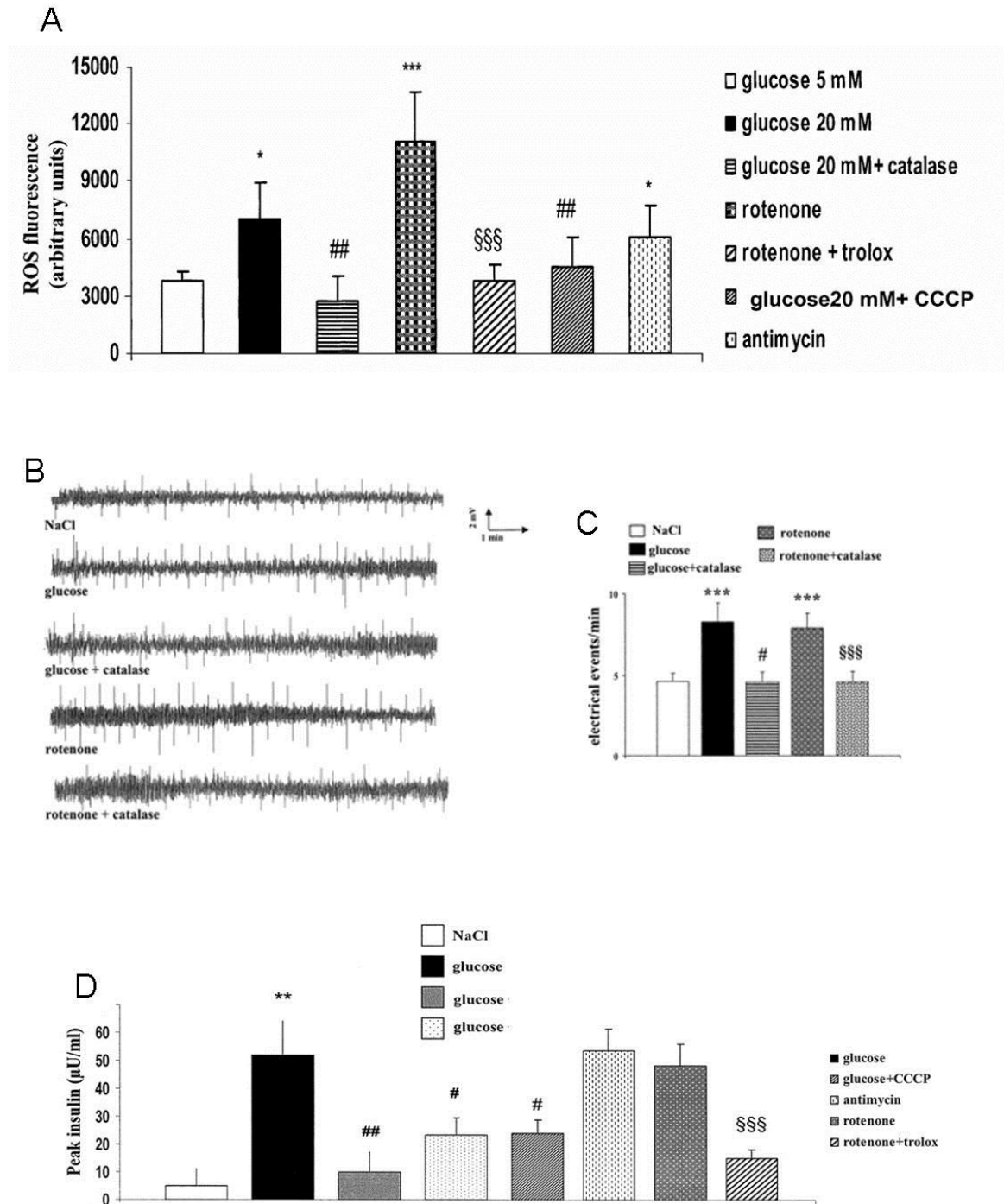


Figure 26 : Étude *in vivo* de l'implication des mEAOs dans le « glucose sensing » hypothalamique. Effets d'une stimulation de glucose seul et de ceux de deux inhibiteurs des complexes I et III de la chaîne respiratoire (roténone et antimycine). Réversion de ces effets par l'ajout d'antioxydants (catalase, trolox) et d'un découplant mitochondrial (CCCP). A – Quantification du taux d'EAOs sur tranche d'hypothalamus. B – C – Quantification *in vivo* de l'activité électrique multicellulaire selon le taux d'EAOs. D – Sécrétion d'insuline en périphérie. D'après Leloup et al 2006.

Plus récemment nous avons également montré que dans le modèle de rat Zucker obèse et insulino-résistant, il existait une hypersensibilité hypothalamique au glucose (activation électrique des neurones du NA et sécrétion d'insuline pour des doses de glucose sans effet chez le rat non obèse) (Alquier et al., 2003; Colombani et al., 2009). Cette réponse anormale est associée à une augmentation de la production de mEAOs en réponse au glucose, un état oxydé à l'échelle de la cellule et de la mitochondrie, ainsi qu'une surexpression de certains complexes de la CRM corrélée à une dysfonction de la respiration mitochondriale (Colombani et al., 2009). Enfin, par la perfusion icv de glutathion (un antioxydant) nous avons pu corriger le déséquilibre Red/Ox et restaurer une réponse normale à une hyperglycémie cérébrale (Colombani et al., 2009). Ce travail renforce le rôle important d'une production de mEAOs qui soit bien équilibrée lors de la détection du glucose au niveau hypothalamique.

L'ensemble de ces travaux ainsi que d'autres (Andrews et al., 2008; Horvath et al., 2009) mettent en lumière le rôle des mEAOs en tant que signaux lors de la détection d'une élévation du flux de nutriments. Il est donc important de développer précisément le rôle de la CRM dans la production de ces mEAOs. Récemment, le lien entre la concentration de glucose, la morphologie des mitochondries et la production de mEAOs a été mis en évidence. Ces travaux suggèrent que des mécanismes de régulation de la production de mEAOs pourraient exister au sein de la mitochondrie. De plus, certaines données montrent que des changements de forme de la mitochondrie s'accompagnent de modification de l'activité de la chaîne respiratoire où sont produites les mEAOs (Bach et al., 2005; Bach et al., 2003; Benard et al., 2007; Benard and Rossignol, 2008; Yoon et al., 2011; Yu et al., 2006; Yu et al., 2008).

VII. La dynamique mitochondriale

Les mitochondries ont été identifiées il y a plus de cent ans par microscopie photonique, mais leur véritable morphologie et leur nature dynamique ont longtemps été ignorées. Le nom qui leur a alors été attribué, dérivé du grec *mitos* (fil) et *chondros* (grain), reflétait l'hétérogénéité de leur morphologie. La microscopie électronique révéla ensuite qu'elles sont entourées de deux membranes (externe et interne) et possèdent des crêtes formées par la membrane interne (Frey and Mannella, 2000). Leur structure punctiforme ressemblait, en taille et en morphologie, à leurs ancêtres les bactéries, ce qui a conduit une

partie de la communauté scientifique à considérer les mitochondries comme de petites entités indépendantes. Le développement de nouvelles techniques de microscopie (microscopie électronique à tomographie, microscopie confocale) a révélé que les mitochondries peuvent adopter une structure punctiforme ou tubulaire. Dans les années 1990, des cribles génétiques menés chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont conduit à l'isolement de mutants dont la morphologie des mitochondries était altérée et à l'identification des premières protéines impliquées dans des mécanismes de modification morphologiques des mitochondries que l'on qualifia de dynamique mitochondriale (Okamoto and Shaw, 2005). *S. cerevisiae* présente un réseau mitochondrial filamenteux qui résulte d'un équilibre dynamique entre deux forces antagonistes de fission et de fusion. Dans des conditions normales, l'équilibre fusion/fission s'établit au profit de la fusion et les mitochondries apparaissent filamenteuses. L'inhibition de la composante fusion provoque la fragmentation des mitochondries. A l'inverse, lorsque la fission est inhibée, le réseau mitochondrial apparaît excessivement filamenteux et interconnecté.

La plasticité de la morphologie des mitochondries est conservée dans les cellules eucaryotes supérieures dont les mitochondries apparaissent comme un réseau de filaments interconnectés quand la force de fusion prédomine, ou comme des structures punctiformes isolées quand la force de fission prévaut. En outre, l'observation des mitochondries par microscopie en temps réel montre clairement que cet équilibre n'est pas figé. Quelle que soit leur morphologie, les mitochondries se déplacent, se divisent et fusionnent continuellement (Sauvanet et al., 2010a).

A. La dynamique des mitochondries

Les premiers tests de fusion mitochondriale, *in vivo* et *in vitro*, ont été réalisés chez *S. cerevisiae* (Hoppins et al., 2007; Okamoto and Shaw, 2005). Cette levure existe sous deux formes haploïdes capables de se conjuguer. Le marquage des mitochondries par des fluorophores différents a mis en évidence que les membranes mitochondriales des deux formes de levure fusionnent et permettent ainsi le mélange des composants mitochondriaux (**Figure 27**). La reconstitution de la fusion *in vitro* a démontré que la fusion des membranes

internes et celle des membranes externes sont des évènements distincts qui nécessitent tous deux un apport de GTP.

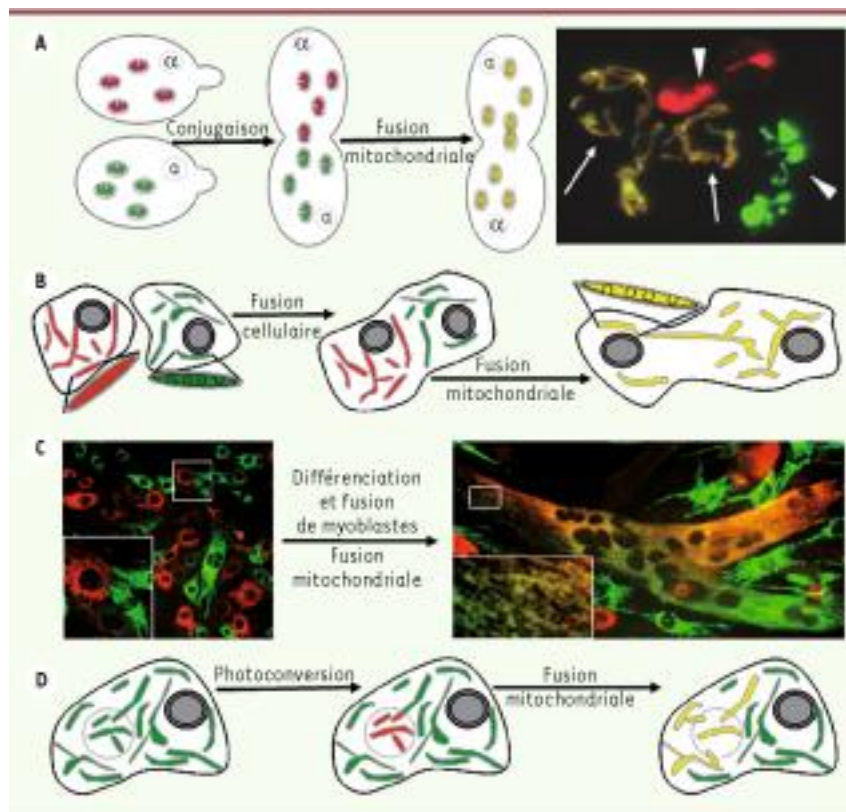


Figure 27 : Tests utilisés pour l'étude de la fusion mitochondriale basés sur l'échange de protéines fluorescentes entre mitochondries. A. Dans la levure *S. cerevisiae*, la fusion est observée lors de la conjugaison de cellules haploïdes. Pointes de flèche : cellules haploïdes contenant des mitochondries simplement marquées. Flèches : zygote contenant des mitochondries doublement marquées. B, C. Dans des cellules mammifères, la fusion cellulaire est induite par le polyéthylène glycol (B) ou a lieu lors de la différenciation de myoblastes en culture (C). D. L'utilisation de protéines photoconvertibles permet d'observer la fusion à l'intérieur d'une cellule.

Les connaissances sur la fusion mitochondriale chez les Mammifères sont issues de travaux *ex vivo*. Des molécules fluorescentes sont adressées aux mitochondries de deux populations de cellules dont la fusion est induite. Après fusion cellulaire, l'analyse du mélange des molécules fluorescentes entre mitochondries met en évidence la fusion mitochondriale (**Figure 27**). Ces études ont permis de démontrer que la fusion mitochondriale permet l'échange de protéines, de complexes respiratoires et de nucléoïdes, qu'elle ne dépend pas du cytosquelette et qu'elle est abolie par une dissipation du potentiel de membrane

mitochondrial ($\Delta\psi_m$) (Legros et al., 2002; Legros et al., 2004). Récemment, l'obtention de nouvelles protéines fluorescentes a permis d'étudier la fusion mitochondriale à l'intérieur d'une cellule. Des cellules exprimant une protéine fluorescente photo-convertible sont partiellement irradiées par un laser, ce qui conduit au marquage de quelques mitochondries dont le devenir est suivi (**Figure 27**). Ces expériences ont révélé l'existence de deux types de fusion (Liu et al., 2009). Dans la majorité des cas, la fusion est instable : les mitochondries fusionnent leurs deux membranes, échangent des composants et se séparent presque immédiatement. Dans une minorité des cas, la fusion est stable et conduit à la formation d'une mitochondrie allongée. Le processus de fission, pourtant clairement visible en microscopie en temps réel, n'a pas été caractérisé à ce jour à l'aide de tests dédiés. Dans la plupart des cas, la fission est observée indirectement par l'altération de l'équilibre fusion-fission et ses répercussions sur la morphologie mitochondriale (Legros et al., 2002; Malka et al., 2005).

1. Les acteurs de la dynamique mitochondriale

Les protéines impliquées dans la fusion et la fission mitochondriales sont, dans la plupart des cas, spécifiques aux mitochondries et différentes dans leur structure et leur mécanisme d'action de celles qui sont impliquées dans le trafic vésiculaire entre organites. Bon nombre d'entre elles s'avère être conservé chez tous les eucaryotes (Okamoto and Shaw, 2005).

La machinerie de fission, chez la levure, est composée de quatre protéines principales : DRP1 (Dnm1), GTPase de la famille des dynamines, Fis1, Mdv1 et Caf4 (**Figure 28**). La délétion ou la mutation de DRP1, augmente la longueur et la connectivité des mitochondries et empêche leur fragmentation (Hoppins et al., 2007; Ishihara et al., 2009; Liesa et al., 2009). DRP1, majoritairement cytosolique, est recrutée à la membrane mitochondriale externe au niveau des futurs sites de fission. Chez la levure, ce recrutement implique la protéine intégrale de la membrane externe Fis1 et les protéines adaptatrices Mdv1 et Caf4 (Hoppins et al., 2007) (**Figure 28**). Une fois recrutée à la membrane externe, Dnm1/DRP1 s'oligomérisent et forment une spirale dont le changement de structure conduit à la formation d'un anneau qui en se rétractant, via l'hydrolyse du GTP, provoque la fission des mitochondries (**Figure 28**).

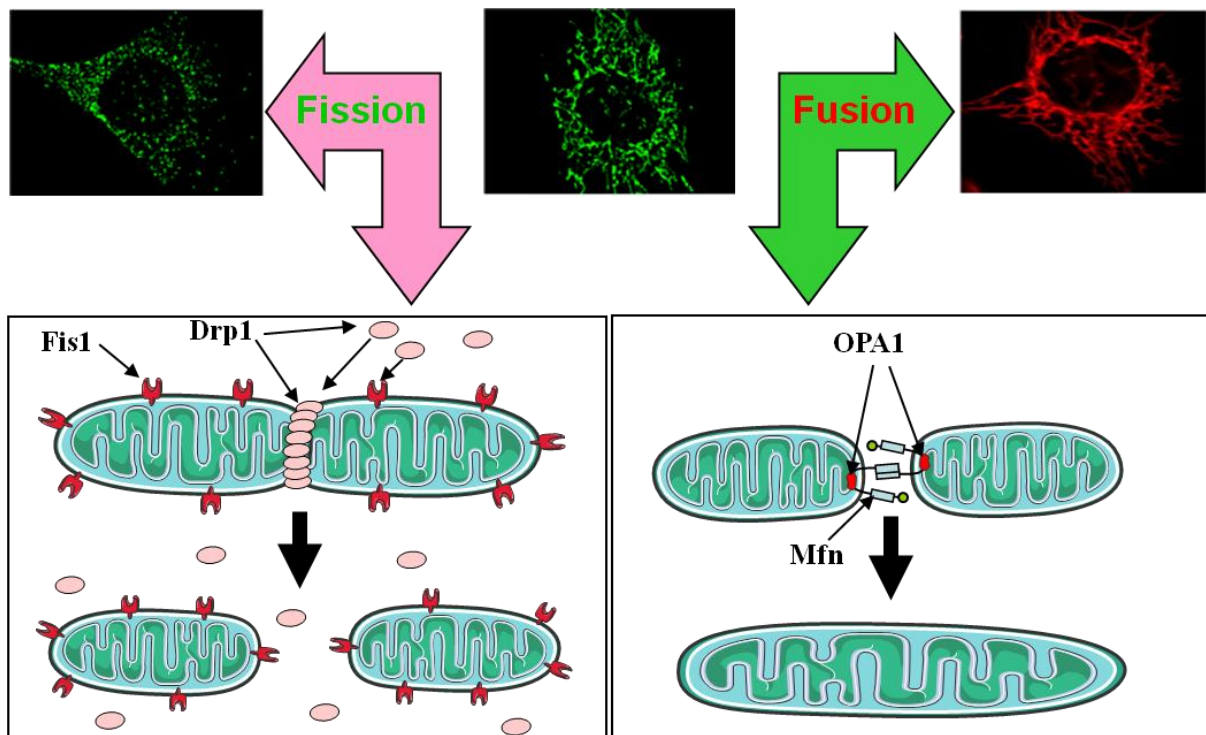


Figure 28 : La dynamique mitochondriale.

La morphologie mitochondriale est sous la dépendance de forces de fusion et de fission opposées, modulables et en équilibre permanent, c'est ce qu'on appelle la dynamique mitochondriale. Un déséquilibre en faveur des processus de fission entraîne une fragmentation des mitochondries : le réseau apparaît alors plus ponctué (on observe alors un plus grand nombre de mitochondries petites et sphériques), alors qu'un déséquilibre en faveur des processus de fusion crée un réseau de mitochondries filamenteuses très allongées. Ces processus sont dus à des protéines spécifiques de la mitochondrie. Dans le cas de la fission, Drp1 et Fis1 sont 2 acteurs essentiels : Drp1, qui est normalement cytoplasmique est adressé à la mitochondrie où il se lie à Fis1. Drp1 forme alors un anneau qui se referme autour de la mitochondrie, jusqu'à séparation en 2 mitochondries. La fusion, elle, implique principalement OPA1 et les mitofusines, qui permettent le rapprochement de 2 mitochondries et leur fusion.

Les mécanismes de fusion font intervenir d'autres protéines, chez les Mammifères ce sont les mitofusines (MFN1 et MFN2 (Rojo et al., 2002)), ainsi que OPA1 (Delettre et al., 2000). La délétion des gènes codant les protéines fusogènes entraîne, chez la levure et les Mammifères, la fragmentation des mitochondries par inhibition de leur fusion (Hoppins et al., 2007). On pense actuellement que les mitofusines s'associent en *trans* pour induire l'accolement puis la fusion, GTP-dépendante, des membranes externes, et que la fusion des membranes internes est ensuite prise en charge par OPA1 (**Figure 28**) (Hoppins et al., 2007).

Chez les Mammifères, la présence d'OPA1 n'est requise que sur une seule des deux mitochondries (Landes et al., 2010).

A côté des composants principaux des machineries de fusion et fission que nous venons de décrire, et qui sont globalement conservés de la levure à l'Homme, d'autres acteurs de la dynamique mitochondriale, qui sont souvent spécifiques aux levures ou aux Mammifères, ont également été identifiés (Hoppins et al., 2007). Par exemple, chez les Mammifères, la protéine de fission GDAP1 (ganglioside induced differentiation-associated protein 1), responsable d'une neuropathie chez l'homme et ATAD3A (ATPase family, AAA domain containing 3A), joue un rôle dans l'établissement et/ou la régulation des interactions entre les membranes externe et interne (Gilquin et al., 2010).

2. Régulation de la fission/fusion de mitochondries

L'équilibre fusion/fission et la morphologie des mitochondries sont également contrôlés par la bioénergétique mitochondriale et cellulaire (Sauvanet et al., 2010b), change durant divers processus de différenciation (Liesa et al., 2009) et est altéré dans de nombreuses maladies. De plus, les mitochondries se fragmentent pendant l'apoptose et s'allongent pendant la senescence (Liesa et al., 2009). Malgré l'accumulation de données sur les acteurs et la mécanistique de la dynamique mitochondriale, très peu de choses sont connues sur les signaux extra ou intracellulaires auxquels ce processus est soumis et sur les mécanismes par lesquels il est modulé. Récemment, différentes voies qui altèrent le niveau d'expression (stabilité/dégradation), l'activité et/ou l'association membranaire des acteurs de fusion et de fission ont été mises en évidence.

Chez les Mammifères, une ubiquitine ligase mitochondriale (MITOL/MARCHV) interagit avec FIS1 et DRP1, qu'elle « ubiquitinye » et dont elle contrôle les niveaux d'expression en stabilisant cette protéine. DRP1 semble être le substrat d'autres ubiquitine ligases et ses propriétés (activité, recrutement, stabilité) sont également modifiées par phosphorylation et SUMOylation (Santel and Frank, 2008). La protéine de fusion MFN2 est phosphorylée par la protéine kinase A (PKA), interagit avec une ubiquitine ligase (MITOL/MARCH5) et son niveau d'expression est augmenté par des inhibiteurs du protéasome (Liesa et al., 2009). L'activité, l'association membranaire et les fonctions de

OPA1 sont modulées par l'existence de nombreuses isoformes de la dynamine (Landes et al., 2010). Chez l'homme, un épissage alternatif du gène *OPA1* génère huit ARN messagers codant pour des isoformes protéiques impliquées soit dans la dynamique mitochondriale, soit dans l'apoptose (Landes et al., 2010). Une protéolyse sélective et contrôlée de la région amino-terminale de OPA1 génère des isoformes longues et courtes, toutes deux nécessaires à la fonction de la dynamine (Landes et al., 2010; Zick et al., 2009). Chez les mammifères, cette protéolyse dépend des niveaux d'ATP et est induite lors d'une dissipation du $\Delta\psi_m$ ou en situation d'apoptose (Baricault et al., 2007; Guillery et al., 2008). L'importance fonctionnelle de la dynamique mitochondriale est illustrée par les nombreuses répercussions de son inactivation aussi bien au niveau de l'organe, de la cellule que de l'organisme. Ainsi, le fonctionnement de la chaîne respiratoire, l'homéostasie et la signalisation calcique, la production de mEAOs ainsi que la différenciation musculaire, la plasticité et le fonctionnement des neurones, le processus de sénescence et la cascade apoptotique, sont altérés par des modifications de l'expression des différents acteurs de la dynamique mitochondriale (Liesa et al., 2009).

Récemment, des altérations de la dynamique mitochondriale chez les Mammifères ont été associées à des défauts dans l'organisation, le maintien et la transmission de l'ADNmt (Chen and Chan, 2009). D'autre part, les avantages conférés spécifiquement par la fusion incluent les échanges moléculaires et la complémentarité fonctionnelle entre mitochondries, la formation de filaments capables de transmettre de l'énergie sous forme de $\Delta\psi_m$ à l'intérieur de la cellule (Chan, 2006). A l'inverse, la fission des mitochondries favorise leur transport, notamment dans les neurones, leur répartition équitable au cours de la mitose et leur élimination par autophagie (Chen and Chan, 2009). Enfin, la nature essentielle de la dynamique mitochondriale a définitivement été confirmée par l'implication de plusieurs acteurs de la dynamique mitochondriale dans des maladies neuro-dégénératives et par son absolue nécessité au cours du développement embryonnaire (Chan, 2006; Chen and Chan, 2009).

Depuis l'identification dans les années 1990 des protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale, leur liste n'a cessé de croître. Très récemment sont venues s'ajouter Pink-1 (PTEN-induced kinase 1) et Parkine (E3 ubiquitin ligase), deux protéines mutées dans des formes familiales de maladie de Parkinson. Ces protéines seraient à la fois impliquées dans la dynamique mitochondriale et dans la biogenèse/dégradation des mitochondries (Chen and Chan, 2009).

B. Rôle physiologique de la dynamique mitochondriale

L'intérêt porté sur la dynamique mitochondriale depuis plusieurs années repose principalement sur deux faits biologiques majeurs : d'une part, la découverte que des dysfonctionnements des machineries moléculaires de fission et de fusion mitochondriales sont à l'origine de pathologies neuronales graves (Cho et al., 2010) et, d'autre part, l'observation d'une fission massive des mitochondries au cours de l'apoptose (Castanier and Arnoult, 2010).

1. Dynamique mitochondriale et transport d'énergie dans les neurones

Les mitochondries produisent et véhiculent de l'ATP aux endroits de la cellule où la demande en énergie est forte. Leur transport est donc crucial pour le bon fonctionnement des cellules, en particulier des cellules polarisées comme les neurones. Dans les neurones, les besoins en ATP sont grands, souvent à distance du soma, comme au niveau des synapses. Par exemple, chez l'Homme, la synapse neuromusculaire de certains motoneurones est parfois distante de plus d'un mètre du soma. L'ATP produit au niveau du corps cellulaire ne peut y parvenir en quantité suffisante par simple diffusion. Ce problème peut être contourné grâce aux mitochondries qui, en se déplaçant, peuvent délivrer *in situ* l'énergie nécessaire au fonctionnement synaptique. Pour véhiculer l'énergie, les mitochondries doivent être capables de se fragmenter, se déplacer, s'arrêter au bon endroit et repartir.

Le transport des mitochondries est en fait bidirectionnel : les mitochondries se déplacent le long des microtubules en utilisant comme moteurs soit des kinésines pour aller dans le sens antérograde - du soma vers la périphérie -, soit des dynéines pour se diriger dans le sens rétrograde. Les dynéines et les kinésines possèdent des points d'attaches aux mitochondries (Cai and Sheng, 2009). Chez la drosophile, la délétion du gène codant pour ces attaches empêche le transport des mitochondries hors du soma. Malgré cette anomalie, la croissance axonale et l'établissement des synapses neuromusculaires se produisent normalement (Stowers et al., 2002). Ces processus ont donc un coût énergétique faible. En revanche, faute d'ATP, ces synapses demeurent silencieuses (Stowers et al., 2002), car la mobilisation des neurotransmetteurs à la synapse requiert beaucoup d'énergie. L'immobilisation des mitochondries au niveau des synapses ou dans tout autre domaine

cellulaire où elles sont requises, par exemple les épines dendritiques, fait intervenir un processus complexe encore mal élucidé qui pourrait impliquer la synthaphiline, protéine retenant les mitochondries au niveau des microtubules (Cai and Sheng, 2009). Par ailleurs, un pic de calcium focalisé au niveau d'une petite région de l'axone peut, en modifiant la conformation des protéines d'attaches des mitochondries aux microtubules, entraîner l'arrêt des mitochondries (Wang and Schwarz, 2009). Une fois leur fonction accomplie, les mitochondries retournent dans le soma. Ces mitochondries sont en général de petite taille, ont un potentiel de membrane bas et sont considérées comme non fonctionnelles, voire dangereuses, car capables de produire des radicaux libres en excès. Elles sont probablement destinées à la dégradation par autophagie, un processus appelé mitophagie. La mitophagie joue un rôle déterminant dans l'homéostasie cellulaire en permettant d'éradiquer les mitochondries potentiellement nocives (Chen and Chan, 2009). Elle fait intervenir des protéines comme Parkine et Pink1, dont les gènes sont mutés dans certaines formes familiales de la maladie de Parkinson (Chen and Chan, 2009). D'où l'idée qu'une altération du processus de mitophagie pourrait endommager certains types cellulaires, comme les neurones de la substance noire dans la maladie de Parkinson.

Le transport des mitochondries est intimement lié à leur capacité à fusionner et à se fissionner. Pour pouvoir se mouvoir correctement dans les axones ou les dendrites, les mitochondries doivent pouvoir se fragmenter. Des mitochondries trop filamenteuses sont statiques et s'accumulent dans le soma. À l'inverse, la fission mitochondriale s'accompagne d'une augmentation du nombre de mitochondries circulantes dans les neurites et facilite la formation des épines dendritiques ainsi que leur plasticité, par un mécanisme encore mal élucidé (Li et al., 2004b).

2. Dynamique mitochondriale et intégrité de l'ADN mitochondrial

Les événements de fusion et de fission jouent un rôle essentiel dans l'échange de molécules d'ADN entre mitochondries, ainsi que dans certaines fonctions mitochondriales. Chez l'homme, l'ADN mitochondrial a une taille de 16,5 kb et code pour 13 protéines de la chaîne respiratoire, 22 ARNt et 2 ARNr. Il est présent dans la matrice mitochondriale en 2 à 10 exemplaires regroupés au sein de structures appelées nucléoïdes. Cet ADN, en raison de sa localisation, a un risque élevé de mutations (le nombre de mutations de l'ADN mitochondrial est environ 10 fois supérieur à celui de l'ADN nucléaire) à cause des dérivés réactifs de

l'oxygène générés par les complexes de la chaîne respiratoire. En fusionnant, les mitochondries échangent leurs molécules d'ADN, ce qui permet la complémentation d'un gène défectueux porté par une molécule d'ADN par un gène sain présent sur une autre molécule d'ADN. Ainsi, les mitochondries peuvent fonctionner normalement même si elles contiennent un nombre important de molécules endommagées. Pour une raison encore mal comprise, lorsque le processus de fusion est incorrect, non seulement une complémentation entre gènes mutés et sains n'est plus possible, mais les mitochondries finissent par perdre leur ADN mitochondrial. Elles deviennent alors incapables de fournir de l'ATP, ce qui compromet la survie cellulaire. Récemment, il a été montré que la perte d'expression, dans le muscle, de la protéine de fusion mitofusine 2, s'accompagnait d'une augmentation significative du nombre de mutations et de délétions de l'ADN mitochondrial, ainsi que d'une perte de la quantité d'ADN par mitochondrie, avec des conséquences graves pour la fonction musculaire (Chen et al., 2010). La fusion mitochondriale est donc requise pour la stabilité de l'ADN mitochondrial.

3. Morphologie mitochondriale, stress et apoptose

Des travaux récents ont montré que certaines formes de stress liées à des anomalies de la synthèse protéique pouvaient induire une « hyperfusion » mitochondriale (Tondera et al., 2009). La formation d'un réseau mitochondrial permettrait à la cellule de mieux tolérer ces formes de stress en conférant aux mitochondries un meilleur couplage énergétique. Les voies de signalisation qui régulent les machineries de fusion et de fission au cours de stress métaboliques sont encore mal connues. Le rôle de la fission mitochondriale au cours de l'apoptose doit également être élucidé (Castanier and Arnoult, 2010).

On sait que les mitochondries se fragmentent au cours de l'apoptose. Cette fragmentation intervient au moment où Bax, un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, s'intègre dans la membrane mitochondriale. Cette intégration se produit aux sites de fission mitochondriale, là où intervient la protéine DRP1. Il s'ensuit une fission des mitochondries et une altération concomitante de la membrane mitochondriale externe qui devient perméable et permet une fuite de cytochrome c dans le cytosol. Cet événement est nécessaire à l'activation des caspases dans la voie de signalisation dite « intrinsèque » de l'apoptose. Le blocage de la fission mitochondriale ralentit la cinétique de libération du cytochrome c, mais ne la bloque pas complètement, suggérant que d'autres mécanismes contribuent à perméabiliser la

membrane mitochondriale externe (Castanier and Arnoult, 2010). Il reste à démontrer comment la fission mitochondriale peut coopérer avec Bax pour perméabiliser la membrane mitochondriale externe.

C. Dynamique mitochondriale et maladies neurodégénératives

Une mutation du gène, codant OPA1 (optic atrophy 1), est liée à l'atrophie optique autosomique dominante, ou maladie de Kjer (AOAD). Le séquençage de ce gène chez six familles atteintes de cette pathologie a révélé la présence systématique d'une mutation pathogène (Delettre et al., 2000). En accord avec l'implication d'OPA1 dans la fusion du réseau mitochondrial (Sauvanet et al., 2010a), les fibroblastes de patients présentent une altération de la dynamique membranaire avec un réseau fragmenté apparaissant sous forme de mitochondries ponctiformes (Chevrollier et al., 2008). L'ensemble des lignées de fibroblastes étudiées présentent une susceptibilité accrue à l'apoptose (Lenaers et al., 2009) et une altération du fonctionnement de la chaîne respiratoire liée à un déficit d'activité soit du complexe I (Zanna et al., 2008), soit du complexe IV (Chevrollier et al., 2008). De la même façon que pour l'atteinte de l'activité fusionnelle, il existe une bonne corrélation entre le niveau du déficit énergétique et la gravité de l'atteinte clinique. Les cellules ganglionnaires de la rétine sont tout particulièrement vulnérables du fait de l'absence de myélinisation de leur axone jusqu'à leur sortie du globe oculaire. Ces axones sont par conséquent directement exposés au stress induit par les rayons ultra-violet et requièrent un apport énergétique extrême pour transduire les potentiels d'action en l'absence de nœuds de Ranvier. L'abondance mitochondriale, qui est frappante à la partie proximale de ces axones, permet probablement de répondre à ce besoin énergétique et explique en partie pourquoi l'atteinte des cellules ganglionnaires de la rétine est si fréquente dans les maladies mitochondriales.

Deux autres gènes codant des dynamines mitochondriales (*MFN2*, mitofusine 2 et *DRP1*, dynamin-related protein 1) ont ensuite été impliqués dans une forme axonale de la maladie de Charcot- Marie-Tooth (CMT) (Vallat and Funalot, 2010; Zuchner et al., 2004) et un syndrome neurologique néonatal sévère (Waterham et al., 2007). L'étude de biopsies nerveuses de patients ou de souris ayant une mutation de *MFN2* montre une altération de la morphologie mitochondriale dans les axones. Les mitochondries apparaissent arrondies, de

petite taille et souvent agrégées aux extrémités axonales et autour du noyau, suggérant une altération de leur fusion et de leur transport axonal (Cartoni and Martinou, 2009; Vallat et al., 2008). L'altération du trafic axonal est une hypothèse pour expliquer la vulnérabilité particulière des axones les plus longs de l'organisme, qui sont sélectivement affectés dans cette maladie. Cette hypothèse est confirmée par une étude récente montrant que les mitofusines jouent un rôle direct dans la régulation du transport axonal des mitochondries (Misko et al., 2010). Une altération du métabolisme énergétique participe aussi très probablement à la maladie. En effet, les fibroblastes de patients *MFN2* atteints de CMT2A présentent une baisse d'efficacité des phosphorylations oxydatives et une diminution du potentiel de membrane mitochondrial, mais sans altération majeure de la morphologie mitochondriale, ce qui suggère que les rôles de *MFN2* dans la fusion mitochondriale et dans la régulation du métabolisme énergétique sont indépendants (Loiseau et al., 2007).

Enfin, un quatrième gène codant la protéine *GDAP1* impliquée dans le contrôle de la fission mitochondriale, fut associé à deux autres formes de CMT (Baxter et al., 2002; Claramunt et al., 2005). Ces pathologies neurologiques, qui semblent liées à une altération de la plasticité mitochondriale, définissent une nouvelle classe de maladies mitochondriales, en marge de celles dues à un déficit primitif de la chaîne respiratoire. Les mécanismes physiopathologiques mis en jeu sont complexes puisque la plasticité mitochondriale semble se situer au carrefour d'un ensemble de processus interdépendants : contrôle de qualité de l'organite (biogenèse, mitophagie, maintien de l'ADN mitochondrial), fonctions bioénergétiques, distribution cellulaire et interaction avec les autres composants cellulaires, flux calciques, intégrations des voies de signalisation cellulaire et apoptose.

D. Mitose et dynamique mitochondriale

Les mitochondries sont des organites importants qui doivent être redistribués lors de la division cellulaire. Ainsi, on observe une fragmentation mitochondriale qui précède la division cellulaire (Ishihara et al., 2009; Taguchi et al., 2007). Cela permet une répartition des mitochondries aux deux cellules filles. Ainsi, des embryons de souris dont le gène codant pour la mitofusine 2 (*MFN2*) ou *DRP1* meurent avant la naissance (Ishihara et al., 2009; Wakabayashi et al., 2009) indiquant un rôle primordial de la dynamique mitochondriale au cours du développement.

E. Dynamique mitochondriale et métabolisme

Depuis moins de 10 ans, un certain nombre de travaux ont mis en évidence des altérations de la dynamique mitochondriale dans le cas de pathologies métaboliques. Ainsi, dans les muscles squelettiques de patients obèses et diabétiques de type 2, les mitochondries apparaissent plus petites et avec des structures internes désorganisées et des vacuolisations (Kelley et al., 2002). Une diminution d'expression de la protéine MFN2 est également observée dans les muscles squelettiques de rats Zucker obèses ainsi que d'humains obèses, cette réduction d'expression étant corrélée à une diminution de la taille des mitochondries ainsi qu'une augmentation de leur nombre, représentatif d'une fragmentation du réseau mitochondrial (Bach et al., 2005; Bach et al., 2003). Ces travaux ont permis de montrer une corrélation entre le gain de poids et l'expression de MFN2 qui est diminuée conduisant à une fragmentation des mitochondries, à l'inverse, la perte de poids induit une augmentation d'expression. Les obèses présentent alors une diminution d'expression de MFN2, et il en est de même chez les patients diabétiques. Enfin dans les muscles de ces patients, une corrélation positive forte existe entre l'expression de MFN2 et la sensibilité à l'insuline. A l'échelle moléculaire, ces travaux mettent en évidence outre l'altération morphologique des mitochondries, une diminution de l'oxydation du glucose, du potentiel de membrane mitochondrial, de la respiration cellulaire. Enfin la réduction d'expression de MFN2 dans le muscle est associée à une diminution d'expression des complexes I, II, III et V de la CRM, ainsi que de leur activité. Ainsi, des modèles de rats diabétiques Zucker présentent des modifications d'expression de DRP1 dans le muscle, et l'obésité chez l'homme est associée à une diminution d'expression de MFN2 (Bach et al., 2005; Bach et al., 2003; Leininger et al., 2006). Ces travaux semblent indiquer un rôle majeur de la morphologie mitochondriale dans la régulation de l'homéostasie énergétique. La morphologie mitochondriale serait donc importante pour l'organite et son rôle de senseur énergétique. Par ailleurs, la protéine MFN2 est capable de stimuler la respiration mitochondriale, l'oxydation des substrats et l'expression de certains complexes de la CRM. Ainsi, chez les obèses, l'amélioration de la sensibilité à l'insuline observée suite à une chirurgie bariatrique est associée à une augmentation d'expression de MFN2 dans le muscle (Zorzano et al., 2009).

En culture cellulaire, de fortes concentrations en glucose induisent une fragmentation des mitochondries dans des lignées cellulaires d'hépatocytes, de cellules cardiaques, endothéliales, d'îlots pancréatiques ainsi que des cultures primaires neuronales (Leininger et al., 2006; Men et al., 2009; Paltauf-Doburzynska et al., 2004; Yu et al., 2006; Yu et al., 2008). Cette fragmentation mitochondriale en condition de forte concentration en glucose nécessite la machinerie de fission mitochondriale (Men et al., 2009; Molina et al., 2009; Yu et al., 2006; Yu et al., 2008). Un traitement des neurones des ganglions dorsaux de la moelle par une forte concentration en glucose provoque une fragmentation mitochondriale et une augmentation de l'expression et de la localisation à la mitochondrie de la protéine de fission DRP1, indiquant une activation de la fission mitochondriale (Leininger et al., 2006). Dans cette étude, il est également observé une augmentation d'expression, d'activation et de localisation mitochondriale des protéines pro-apoptotiques Bim et Bax, indiquant que la forte concentration en glucose induit une fission mitochondriale associée à l'apoptose. Une augmentation d'expression de DRP1 est observée dans les neurones des ganglions dorsaux issus de rats rendu diabétiques par un traitement à la streptozotocine, des cellules β incubés dans de fortes concentrations en glucose, et des adipocytes 3T3 en fortes concentrations d'acides gras libres (Gao et al., 2010; Leininger et al., 2006; Men et al., 2009).

1. Dynamique mitochondriale et cellule β

Une activité mitochondriale normale est nécessaire à une régulation adaptée de la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques. Du fait de la relation étroite qui existe entre la morphologie et l'activité des mitochondries, la dynamique mitochondriale est suspectée de jouer un rôle dans l'insulino-sécrétion des cellules β . Les patients atteints de diabète de type 2 présentent une altération de la fonction et de la morphologie des mitochondries des îlots, incluant une diminution du potentiel de membrane, de la production d'ATP, et une forte densité de mitochondries arrondies, associées à une insulino-sécrétion altérée (Arnoult et al., 2005; Deng et al., 2004). Des mitochondries de petites tailles et arrondies en forte densité ont également pu être observées dans les cellules β de rats Zucker obèses et diabétiques (Bindokas et al., 2003). Ces observations suggèrent une altération de la dynamique mitochondriale, due à une fission accrue dans le cas du diabète. La dynamique mitochondriale dans les cellules β et son rôle dans l'insulino-sécrétion n'est étudié que depuis

peu. Molina et al. ont étudié la morphologie et la dynamique mitochondriale dans des îlots pancréatiques et des cultures de cellules β par l'utilisation d'une protéine photoactivable adressée à la matrice mitochondriale (Molina et al., 2009). Cette étude a permis de mettre en évidence un réseau dense de mitochondries dans les cultures primaires de cellules β . Ces mitochondries apparaissant sous forme de tubules individuels dont la longueur maximale est de 2,5 μ m, suggérant que les mitochondries dans ce type cellulaire sont plus courtes que dans d'autres types comme les fibroblastes. Ce résultat est toutefois en opposition avec d'autres observations faites sur des îlots d'humains ou de rats montrant des mitochondries qui forment un réseau tubulaire dans tout le cytoplasme (Bindokas et al., 2003; Park et al., 2008). Une autre étude a permis de déterminer que dans les cellules β , les mitochondries étaient tubulaires et interconnectées, avec des longueurs allant de 0,5 à 5 μ m (Noske et al., 2008). Récemment, grâce à des techniques d'imagerie, la morphologie mitochondriale dans les cellules β a été mieux explorée. L'analyse des images obtenues a ainsi permis de montrer que chez le rat, les mitochondries forment un réseau très interconnecté, comme dans les lignées de cellules β (Dlaskova et al., 2010; Plecita-Hlavata et al., 2008). A l'inverse, les cellules β issus de rats Goto Kakizaki diabétiques présentent une désorganisation du réseau tubulaire de mitochondries (Dlaskova et al., 2010). Dans le cas de cellules β de sujets non diabétiques, les mitochondries sont dynamiques, et peuvent communiquer entre elles et l'ensemble du réseau mitochondrial via des mécanismes de fusion et de fission fréquents, comme cela a pu être montré par la dispersion rapide dans toute la cellule d'une fluorescence locale induite par photoactivation (Molina et al., 2009). Une diminution de la taille des îlots et de la quantité totale de cellules β (due à l'apoptose) sont observés dans le diabète de type 2 (Butler et al., 2003; Donath and Halban, 2004; Rhodes, 2005; Sakuraba et al., 2002; Yoon et al., 2003).. Cette apoptose peut être provoquée par de forte concentration en glucose sur des cultures de cellules β . Cette apoptose ne se produit plus lorsque la fission mitochondriale est inhibée (Men et al., 2009), suggérant que la fission mitochondriale pourrait participer à l'apoptose des cellules β dans le cas du diabète. Dans des conditions de forte concentrations en glucose et en acides gras, qui miment un milieu diabétique de type 2, les cellules β présentent un réseau mitochondrial fragmenté, de plus, la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose est réduite (Molina et al., 2009). Dans ces conditions, la diminution d'expression de la protéine de fission FIS1 restaure la morphologie mitochondriale et protège les cellules de l'apoptose, mais ne suffit pas à rétablir une insulino-sécrétion normale (Molina et al., 2009), ce qui suggère que l'activité bioénergétique des mitochondries n'a pas été rétablie.

Ces observations permettent de suggérer que la nature dynamique de la morphologie mitochondriale par des mécanismes de fission et de fusion continus, mais pas une morphologie fixe, est nécessaire au maintien de la fonction des mitochondries. Ainsi, la diminution d'expression de FIS1 dans les cellules β réduit significativement la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, probablement via une diminution de la respiration au niveau de la CRM (Twig et al., 2008a). Pour étudier le rôle de la dynamique mitochondriale dans l'insulino-sécrétion, la morphologie mitochondriale a été manipulée dans des cellules β , et l'effet sur le métabolisme couplé à la sécrétion d'insuline a été étudié (Park et al., 2008). La surexpression de FIS1 dans les cellules β induit une fragmentation des mitochondries et altère la sécrétion d'insuline stimulé par le glucose via une diminution du contenu cellulaire en ATP. Un effet similaire est également observé lors de la surexpression de la protéine de fusion MFN1, malgré un effet opposé sur la morphologie mitochondriale. Cependant, la surexpression d'un dominant négatif de MFN1 qui entraîne une fragmentation n'a pas d'effet sur le contenu en ATP ou la sécrétion d'insuline. Comme FIS1 et le dominant négatif MFN1 ont le même effet sur la fragmentation mitochondriale lors de leur surexpression, mais avec des effets différents sur la sécrétion d'insuline, il est peu probable que la fragmentation des mitochondries seule soit responsable du métabolisme énergétique mitochondrial et de la sécrétion d'insuline dans les cellules β pancréatiques (Park et al., 2008). De plus la surexpression de MFN1 est défavorable à la sécrétion d'insuline couplé au métabolisme, comme dans le cas de la surexpression de FIS1, malgré un effet opposé sur la morphologie mitochondriale (Park et al., 2008) (Barsoum et al., 2006; Twig et al., 2008a; Twig et al., 2008b).

2. Dynamique mitochondriale lors de l'hyperglycémie et production d'EAOs

En dehors des défauts pancréatiques, des déformations mitochondriales sont fréquemment observées dans d'autres organes ou tissus issus de patients hyperglycémiques ou d'animaux diabétiques. Les mitochondries d'hépatocytes de patients diabétiques sont arrondies, présentent une désorganisation des crêtes mitochondriales et une diminution de la densité aux électrons de leur matrice (Vanhorebeek et al., 2005).

De plus, plusieurs études ont pu montrer l'implication de la dynamique mitochondriale dans la production d'EAOs dans des conditions de forte concentration en glucose (Yu et al., 2006). Ainsi, une exposition aiguë de cellules à une concentration élevée en glucose induit une fragmentation mitochondriale rapide et un retour à la morphologie basale qui ont lieu selon la même cinétique qu'une augmentation puis une diminution du taux d'EAOs (Yu et al., 2006). L'inhibition de la fission mitochondriale ou l'augmentation de la fusion restaure un taux d'EAOs basal même lors d'une concentration en glucose élevée (Yu et al., 2006). Cette étude montre que les modifications morphologiques des mitochondries sont nécessaires à la production d'EAOs lors d'une stimulation hyperglycémique, et permet de suggérer un rôle régulateur de la dynamique mitochondriale dans l'activité des mitochondries (Yu et al., 2006). Une autre étude a également montré que la diminution d'expression de FIS1 diminuait le taux d'EAOs lors d'une stimulation par du glucose (Twig et al., 2008a). Cependant, les mécanismes mis en jeu lors des changements morphologiques des mitochondries et qui modifient la bioénergétique mitochondriale responsable de la production d'EAOs restent à élucider. Hackenbrock dans les années 60 a observé qu'une mitochondrie active était plus condensée et avait une matrice plus dense en électron (Hackenbrock, 1966), cet état des mitochondries pourrait donc être atteint lors d'une hyperglycémie. Lors d'une hyperglycémie, cette fragmentation mitochondriale est réversible, ce qui suggère que ce soit un événement physiologique permettant un processus de signalisation redox, la morphologie fragmentée facilitant cette production, puis un retour à une morphologie basale par re-fusion de mitochondrie et/ou ralentissement de fission permettrait de maintenir un taux d'EAOs non délétère. Il semble possible que ces modifications morphologiques des mitochondries dans des conditions de haut glucose soit une réponse cellulaire à l'augmentation des substrats métaboliques permettant de faciliter leur utilisation dans les mitochondries en augmentant la surface du réseau mitochondrial. De plus, de récentes études indiquent que les modifications dynamiques de la structure interne des mitochondries est étroitement associée à l'état fonctionnel des mitochondries (Mannella, 2006). Les modifications ultra structurales de la membrane interne mitochondriale sont observées lors de l'induction de la fragmentation mitochondriale (Barsoum et al., 2006). La manipulation du niveau d'expression de MFN2 a ainsi été montrée comme altérant l'expression des complexes de la CRM, ce qui conduit à une oxydation du glucose modifiée associée à des modifications de la morphologie mitochondriale (Pich et al., 2005). Les complexes constituant la CRM sont organisés en une structure ordonnée dans la membrane interne mitochondriale de façon à permettre le transfert d'électron le plus efficace. Les modifications morphologiques des mitochondries lors d'une

hyperglycémie pourraient modifier cette organisation des complexes de la CRM, et conduire à une perturbation de son activité ou de son couplage à la synthèse d'ATP, conduisant à une surproduction d'EAOs. Des modifications des flux métaboliques, de l'organisation des complexes de la CRM, de l'efficacité de la phosphorylation oxydative, et de la fluidité membranaire seraient des événements possibles pouvant altérer l'activité de la mitochondrie lors d'une fragmentation mitochondriale induite par l'hyperglycémie et conduisant à une augmentation de la production d'EAOs. Les complications associées à l'hyperglycémie sont associées à une apoptose et un stress oxydant dues à une augmentation du taux d'EAOs, et qui s'accompagne d'une fragmentation mitochondriale (Men et al., 2009; Vanhorebeek et al., 2005; Yu et al., 2008). Dans le cas de complications pathologiques, il existe une controverse selon que la fragmentation mitochondriale soit induite par la production d'EAOs ou l'inverse. Dans les neurones, l'inhibition du complexe II induit une production d'EAOs et une fragmentation mitochondriale, et l'antioxydant N-Acetyl-L-Cystéine (NAC) diminue la fragmentation dans ces conditions, indiquant que les EAOs seraient responsables de la fragmentation des mitochondries (Liot et al., 2009). De la même façon, un traitement des cellules par l'H₂O₂ conduit à une augmentation d'EAOs dans la cellule qui provoque une modification transitoire de la morphologie mitochondriale (Jendrach et al., 2008). Dans un modèle neuronal, Barsoum et son équipe ont montré que le stress oxydant induisait une fragmentation mitochondriale dépendante de DRP1, qui précédait la mort cellulaire par apoptose (Barsoum et al., 2006). A l'inverse, une autre étude rapporte que le blocage de la fission mitochondriale inhibe la production d'EAOs lors d'une hyperglycémie, ainsi que le MPT, la libération de cytochrome c et l'apoptose, suggérant que la fragmentation mitochondriale lors d'une hyperglycémie est nécessaire à la production d'EAOs (Men et al., 2009; Yu et al., 2008). De fortes quantités d'EAOs peuvent induire le MPT, suivi d'une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP)) et d'apoptose (Brady et al., 2004; Leach et al., 2001; Lemasters et al., 1998; Zorov et al., 2000). Le MOMP conduit à la fuite du glutathion de la mitochondrie entraînant une accumulation des EAOs produites par défaut de réduction de ces molécules (Brookes et al., 2004).

OBJECIF DU TRAVAIL
ET DÉMARCHES
SCIENTIFIQUES

Nous nous intéressons aux mécanismes de détection hypothalamique des nutriments, et plus particulièrement à la sensibilité au glucose. Lors d'une hyperglycémie, celle-ci permet le déclenchement d'une réponse régulatrice à court terme en périphérie.

Au laboratoire, il a clairement été établi que la détection d'une augmentation de la concentration de glucose au niveau hypothalamique entraînait une activation électrique des neurones du NA suivi d'une sécrétion d'insuline en périphérie. Une des voies de signalisations importante récemment mise en évidence fait intervenir une signalisation redox impliquant la production d'EAOs d'origine mitochondriale. De manière intéressante, cette signalisation redox a également été montrée dans un autre site sensible aux variations de glucose, la cellule β du pancréas (Leloup et al., 2011; Leloup et al., 2006; Leloup et al., 2009; Pi et al., 2007). L'importance de cette production de mEAOs a également pu être mise en évidence dans le modèle de rat Zucker obèse et insulino-résistant, chez lequel on observe une hypersensibilité hypothalamique au glucose (Alquier et al., 2003). Celle-ci se traduit par le déclenchement d'une activation nerveuse du NA et d'une sécrétion d'insuline pour une dose cérébrale de glucose normalement sans effet chez des rats témoins. Cette hypersensibilité au glucose est associée à un déséquilibre redox dans ce modèle. Chez ces animaux, on observe une production hypothalamique de mEAOs anormalement élevée comparée à des témoins et un état oxydé plus élevé, notamment dans le compartiment mitochondrial, associé à une augmentation des capacités respiratoires. La restauration d'un état redox normal (égal aux témoins) par l'injection d'un antioxydant, le glutathion, rétablit une sensibilité au glucose hypothalamique identique aux témoins (Colombani et al., 2009). L'ensemble de ces travaux montrent l'importance de la production de mEAOs en réponse au glucose et la nécessité d'une production qui soit parfaitement gérée. En effet, l'absence de production de mEAOs en condition physiologique annule les réponses physiologiques étudiées, alors qu'une exacerbation de la production et un défaut des réponses sont observés dans les modèles de pathologies métaboliques. Comprendre les mécanismes qui permettent une production bien ajustée de mEAOs lors d'une hyperglycémie transitoire et physiologique est donc important pour une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans le « glucose sensing » hypothalamique.

Des études récentes ont mis en évidence une relation entre la morphologie mitochondriale et la production de mEAOs (Gao et al., 2010; Leininger et al., 2006; Men et al., 2009; Paltauf-Doburzynska et al., 2004; Twig et al., 2008a; Vanhorebeek et al., 2005; Yu et al., 2006; Yu et al., 2008). Ainsi, un réseau mitochondrial fragmenté serait associé à une

production de mEAOs. De plus, sur des modèles de myoblastes et d'hépatocytes en cultures, il a pu être démontré que l'hyperglycémie déclenchait la fragmentation des mitochondries, une augmentation de la respiration et de la production de mEAOs. Ces effets ne sont plus observés si la fission (via DRP1) est bloquée ou si la fusion est surexprimée (Yu et al., 2006). Par ailleurs, d'autres études ont permis de corrélérer le statut métabolique et les acteurs de la dynamique mitochondriale, ou encore la relation entre la morphologie mitochondriale et ses capacités respiratoires/oxydatives et la production de mEAOs (Benard et al., 2007; Benard and Rossignol, 2008).

Ainsi, l'objectif de mon travail de thèse a été de déterminer si la dynamique mitochondriale intervenait dans les processus de détection d'une hyperglycémie au niveau de l'hypothalamus. En particulier, nous souhaitons savoir si une hyperglycémie cérébrale transitoire et physiologique déclenchait la fission des mitochondries et si celle-ci était nécessaire, par la modification de l'activité de la CRM, à la production de mEAOs indispensable au déclenchement périphérique de réponses adaptées.

Pour répondre à ces questions nous avons adopté la démarche suivante :

- Dans un premier temps, nous avons recherché si une hyperglycémie cérébrale transitoire était capable de déclencher la fragmentation des mitochondries, chez le rat. Pour cela, nous avons mesuré l'adressage de DRP1 à la mitochondrie en réponse à un bolus carotidien de glucose (vers le cerveau). Nous avons également mesuré, en imagerie confocale, la taille des mitochondries suite à ce bolus dans l'hypothalamus. Ces premières expériences étaient indispensables pour valider si l'hyperglycémie cérébrale déclenchait une fragmentation des mitochondries, en mobilisant l'acteur principal de la fission, DRP1. Dans un deuxième temps, après validation par ces expériences préliminaires de l'implication de DRP1, nous avons mis au point un modèle d'inactivation transitoire de DRP1 par interférence ARN. Cette inhibition a été réalisée spécifiquement dans l'hypothalamus ventro-médian, par injection de siRNA dirigés contre DRP1 dans le noyau arqué (rat siDRP1). Ce modèle avait pour but de déterminer si oui ou non, la fission, via DRP1, était nécessaire à la

signalisation mEAOs lors de la détection d'une hyperglycémie cérébrale (« glucose sensing »).

- Ensuite, une exploration des fonctions de la chaîne respiratoire mitochondriale de ces animaux siDRP1 a été réalisée.
- Finalement, nous avons pu étudier le rôle de la fission mitochondriale dépendante de DRP1 lors du « glucose sensing » hypothalamique chez le rat siDRP1. La sensibilité hypothalamique au glucose a alors été évaluée par le biais de deux tests fonctionnels : la sécrétion d'insuline (commande vagale) et l'effet satiétogène du glucose. Pour chacun des tests, la production mEAOs hypothalamiques a systématiquement été évaluée.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Résultats

I. Fission mitochondriale lors d'une hyperglycémie cérébrale

A. Adressage de DRP1 à la mitochondrie en réponse à une hyperglycémie cérébrale

Le premier objectif de ce travail a été de déterminer si, lors de la détection cérébrale d'une hyperglycémie, les mécanismes de la dynamique mitochondriale étaient mis en jeu dans l'hypothalamus ventro-médian (VMH, qui comprend le noyau arqué). En effet, nous avons montré au laboratoire que cette détection nécessitait une production de mEAOs et la littérature fait état d'une relation de cause à effet entre l'hyperglycémie et la fission mitochondriale induite par DRP1 (Yoon et al., 2011; Yu et al., 2006). Ainsi, en condition non stimulée, la protéine DRP1 est majoritairement présente dans le cytosol de la cellule. La fission est induite lorsque DRP1 est adressée à la membrane mitochondriale (Smirnova et al., 2001). Nous avons donc étudié la localisation subcellulaire de DRP1 en réponse à une injection carotidienne vers le cerveau de glucose (9mg/kg). Celle-ci ne modifie pas la glycémie périphérique, mais est associée à une production de mEAOs et à une sécrétion d'insuline 1 min après l'injection de glucose, temps auquel l'expression de DRP1 dans la fraction mitochondriale a été quantifiée.

Nous montrons qu'une injection carotidienne de glucose augmente significativement le niveau d'expression de DRP1 à la mitochondrie (263% d'augmentation comparée au groupe témoin NaCl 0.9%) dans le VMH (**Figure 29**), une minute après l'injection. Aucune modification du taux d'expression de DRP1 n'a été observée dans la fraction mitochondriale du cortex et du thalamus, indiquant une régio-spécificité de cet adressage. Pour s'assurer que cet adressage n'était pas dû à un effet hyperosmotique, l'injection d'un analogue non métabolisable du glucose, le L-Glucose (à la même dose) a été réalisé. Cette injection ne provoque aucune augmentation d'expression de DRP1 à la mitochondrie (**Figure 29**). Ces

résultats montrent qu'au niveau hypothalamique, DRP1 est rapidement adressée à la mitochondrie en réponse à une hyperglycémie.

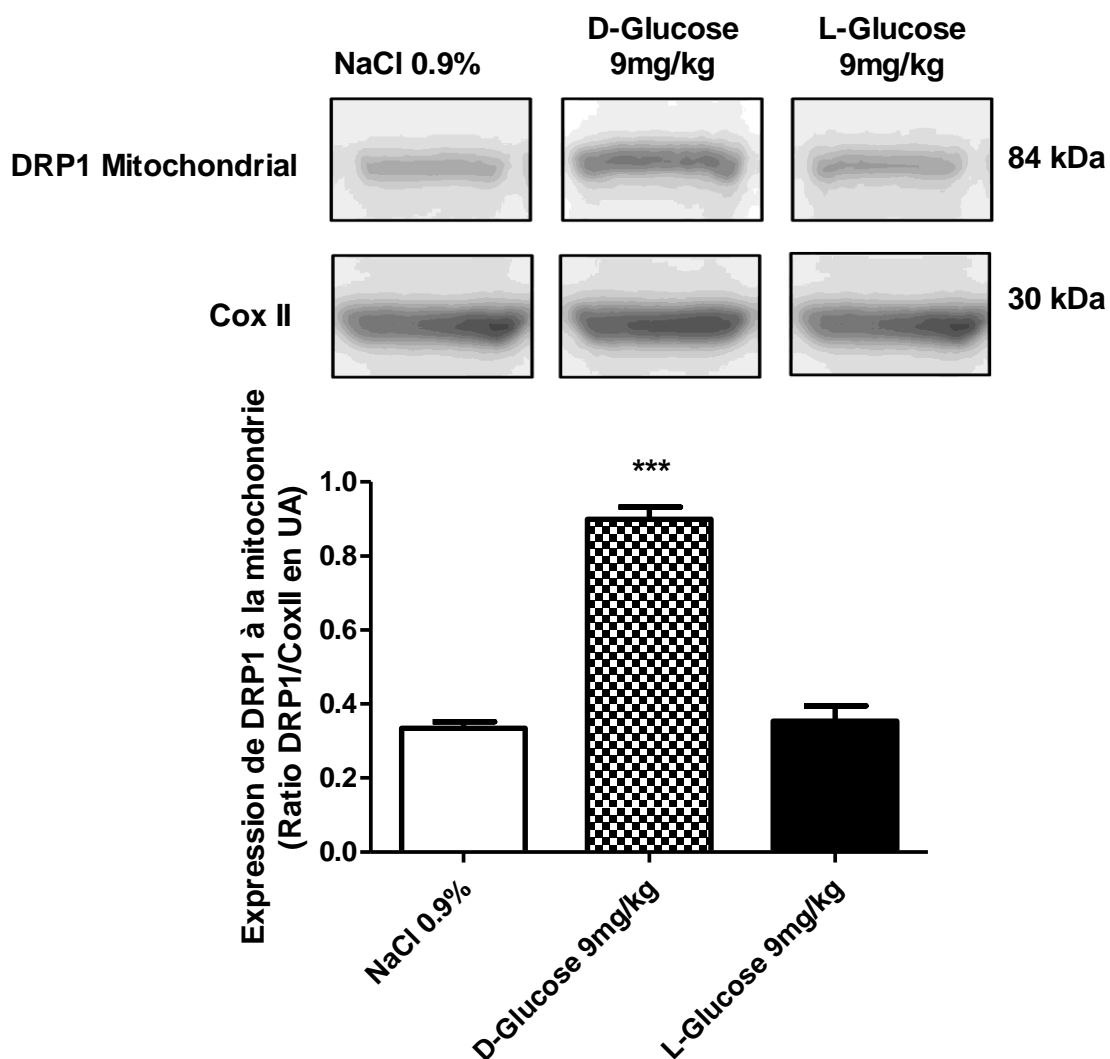


Figure 29 : Une hyperglycémie cérébrale transitoire provoque un adressage de DRP1 à la mitochondrie dans le VMH.

Les westerns blots sont réalisés sur des fractions de mitochondries isolées de VMH de rats ayant reçu un bolus carotidien de NaCl 0.9% (n=8), D-Glucose (9mg/kg) (n=8) ou L-Glucose (9mg/kg) (n=5). Les immunoblots sont quantifiés par analyse densitométrique. Les valeurs représentent les moyennes \pm sem. L'analyse statistique est réalisée par une OneWay ANOVA, suivi d'un post test de Bonferroni (***) ($p < 0.001$).

B. L'adressage de DRP1 est responsable d'une fragmentation mitochondriale lors d'une hyperglycémie dans le VMH.

L'adressage de DRP1 à la mitochondrie représente un signal de fission mitochondriale. Cependant, il fallait s'assurer que cela se traduisait effectivement par une modification du réseau. Nous avons donc déterminé l'impact de cet adressage de DRP1 à la mitochondrie sur la morphologie mitochondriale lors de cette hyperglycémie cérébrale dans le VMH. Celle-ci a pu être quantifiée sur coupes de cerveau au niveau du VMH par immunohistochimie, révélant les mitochondries. La quantification de la morphologie est faite par la mesure de la longueur des mitochondries ainsi que de leur nombre à l'aide d'un traitement d'image (ImageJ). Ainsi, cette analyse ne nous a pas permis de mettre en évidence de modification de ces paramètres (373.9 ± 35.8 mitochondries par cellule pour le groupe NaCl vs 421.2 ± 12.6 pour le groupe D-Glucose, **Figure 30**). Ce résultat est confirmé par un comptage des mitochondries par μm^2 au niveau du VMH par microscopie électronique (0.500 ± 0.0638 mitochondries par μm^2 pour le groupe NaCl vs 0.458 ± 0.027 pour le groupe D-Glucose).

L'adressage de DRP1 est donc induit par une hyperglycémie cérébrale transitoire au niveau du VMH, celle-ci n'est toutefois pas associée à une modification morphologique des mitochondries, ou de leur nombre dans le VMH. Ceci pourrait être due au fait que seuls les neurones sensibles à l'hyperglycémie sont affectés par des modifications de la dynamique mitochondriale.

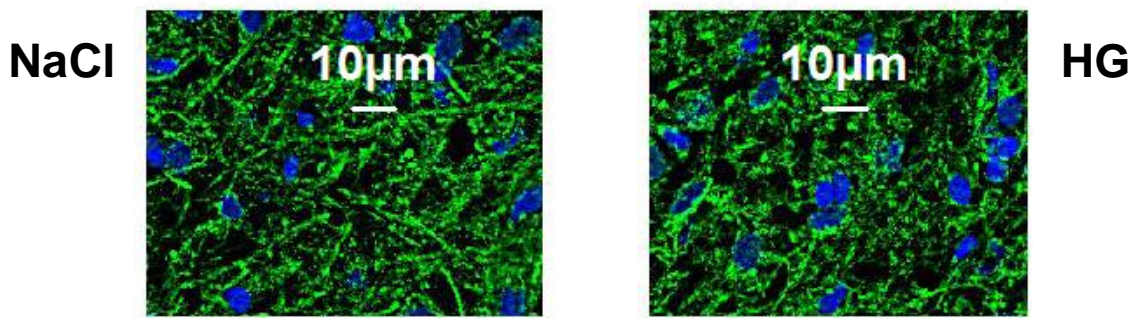


Figure 30 : Immunohistochimie sur coupe au niveau du noyau arqué, représentative du réseau mitochondrial après injection carotidienne de glucose.

L'image de gauche représente l'état du réseau mitochondrial après injection carotidienne de NaCl, les mitochondries, marquées par un cocktail d'anticorps ciblant les 5 complexes de la CRM (OXPHOS) apparaissent en vert. L'image de droite représente le réseau mitochondrial suite à l'injection d'un bolus carotidien de glucose (9mg/kg).

II. Implication de la fission des mitochondries dépendante de DRP1 dans la détection hypothalamique du glucose

A. L'inhibition transitoire de DRP1 dans le VMH inhibe la fission mitochondriale *in vivo*

Un adressage de DRP1 à la mitochondrie est donc induit dans le VMH lors d'une hyperglycémie cérébrale transitoire, ce qui représente un signal de fission mitochondriale. Ces événements se produisent 1 min après l'injection de glucose, temps auquel la production de mEAOs au niveau hypothalamique a été mesurée. Cette production est indispensable à l'activation nerveuse dans le noyau arqué qui déclenche finalement la réponse périphérique.

Afin de déterminer si la fission mitochondriale était nécessaire dans la détection hypothalamique du glucose via la production de mEAOs, nous avons inhibé l'expression de la protéine DRP1, indispensable à la fragmentation, via l'injection de siRNA dirigés contre

l'ARNm codant pour cette protéine. L'injection a été faite spécifiquement dans le NA hypothalamique, où la proportion de neurones gluco-excités est la plus importante.

L'expression de DRP1 suite à l'injection de siRNA a été mesurée par western blot sur des lysats protéiques du VMH 24, 48, 72 et 96h après l'injection des siRNA. 24h après l'injection, l'expression de DRP1 ne diffère pas significativement entre les groupes recevant les siRNA DRP1 (groupe nommé siDRP1, ayant reçu la séquence ciblant DRP1 (siRNA, brin sens : 5'-AACUCAGAGCAGUGGAAAGAG-UdTdT-3') et le groupe de rats témoins (28.9±5.8% d'inhibition) (ces témoins sont nommés siControl, ils reçoivent une séquence aléatoire, ne s'hybridant avec aucune séquence identifiée). Dès 48h, nous avons pu observer une diminution significative de l'expression protéique de DRP1 (-35.1±9.9%), puis cette inhibition atteint son maximum à 72h avec 76.6±2.5%. L'inhibition diminue ensuite, et on observe une restauration partielle de l'expression à 96h où l'inhibition n'est plus que de 40.7±23.3% (**Figure 31A**).

L'efficacité maximale de cette stratégie est donc obtenue 72h après l'injection des siRNA. L'ensemble des études sur la détection du glucose hypothalamique et ses conséquences a donc été réalisé à ce temps.

Finalement, nous nous sommes assurés que l'injection des siRNA DRP1 dans le NA ne diffusait pas au-delà du VMH, soit via le parenchyme, soit via le liquide céphalorachidien du 3^{ème} ventricule. Aucune modification de l'expression de DRP1 n'est présente dans d'autres régions cérébrales telles que le cortex, le thalamus, le tronc cérébral ou le LH (**Figure 31B**). Enfin, l'expression des autres protéines majeures de la dynamique mitochondriale a été évaluée dans le VMH à 72h, et aucune modification n'a été notée que ce soit pour OPA1 et Mfn2 (principales protéines de la fusion mitochondriale) ou Fis1 (protéine de fission), suggérant qu'aucun mécanisme de compensation n'était mis en place (**Figure 31C**).

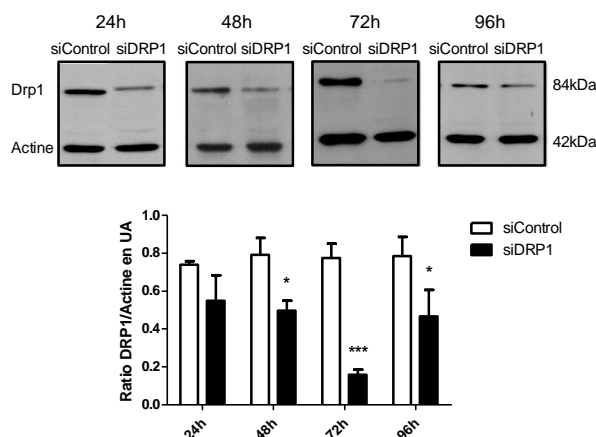
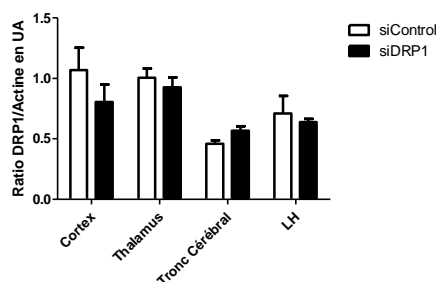
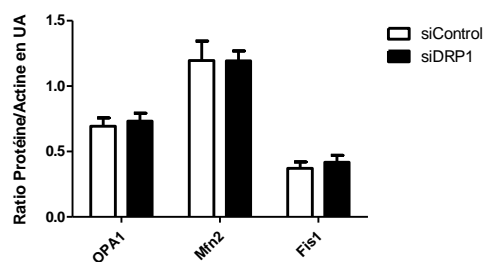
A**B****C**

Figure 31 : L'injection de siRNA dirigés contre l'ARNm codant pour DRP1 permet d'atteindre une inhibition maximale d'environ 80% 72h après l'injection, spécifiquement dans le VMH, sans altération de l'expression des autres principaux acteurs de fission/fusion mitochondriale.

A : les westerns blots à partir de lysats protéiques totaux du VMH sont réalisés à 24, 48, 72 et 96h après l'injection des siRNA DRP1 ou siRNA Control, 100 pmoles de siRNA sont injectés dans le NA de chaque côté du 3^{ème} ventricule. Les siRNA sont transduits via un complexe de lipides cationiques couplés au JetSi (Ozyme). Les immunoblots sont quantifiés par analyse densitométrique. A chaque temps, les groupes siDRP1 et siControl sont comparés à l'aide d'un t-test non apparié, n=6 à chaque temps et pour chaque groupe, * p<0.05, **p<0.01.

B : Au temps où l'inhibition maximale est mesurée (72h), l'expression de DRP1 à été quantifiée par western blot (mesure de densitométrie) dans d'autres régions

cérébrales : dire lesquelles. L'analyse statistique est réalisée à l'aide de t-test non appariés pour chaque région. n=6 dans chaque groupe.

C : 72h après l'injection, les principaux acteurs de la dynamique mitochondriale ont été quantifiés par western blot. n=6 pour chaque protéine étudiée. L'analyse statistique a été faite avec un t-test non apparié.

L'ensemble des données sont représentées par les moyennes \pm sem.

B. L'inhibition de DRP1 entraine une inhibition de la fission et un allongement des mitochondries

L'impact de l'injection des siRNA DRP1 sur la morphologie mitochondriale a été mesuré en imagerie confocale 72h après l'injection, le même protocole de quantification a été utilisé que celui décrit lors de l'hyperglycémie cérébrale. Ainsi, nous avons pu montrer que l'inhibition de la protéine de fusion entraînait une diminution du nombre de mitochondries par cellules (**Figure 32**).

Ces résultats sont en faveur d'une fusion augmentée des mitochondries chez les animaux siDRP1. Un nouvel équilibre en faveur de la fusion s'est donc créé suite au blocage des processus de fission.

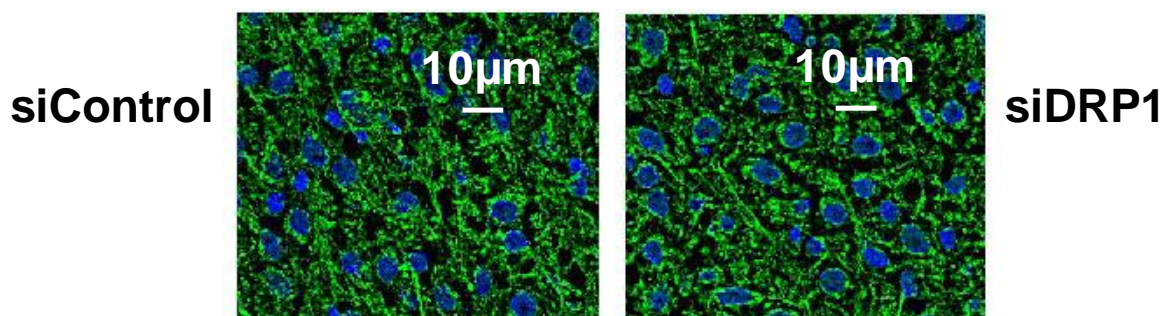


Figure 32 : Immunohistochimie sur coupe au niveau du NA, représentative du réseau mitochondrial après injection des siRNA DRP1 ou Control.

L'image de gauche représente l'état du réseau mitochondrial après injection de siControl. L'image de droite représente le réseau mitochondrial suite à l'injection du siDRP1.

C. Effet de l'inhibition de la fission mitochondriales sur la prise alimentaire et le poids corporel

Dans un premier temps, avant d'étudier la détection cérébrale du glucose, les conséquences de l'injection et de l'inhibition de DRP1 dans le VMH sur des paramètres de l'homéostasie énergétique ont été évaluées. La prise alimentaire ainsi que le poids corporel ont été suivis avant (-48h) et après l'injection des siRNA. Nous avons pu ainsi suivre la récupération des rats suite à l'injection intracérébrale. Les 2 groupes présentent une prise alimentaire identique avant l'injection de siRNA (-48h : 0.076 ± 0.004 g/g de poids corporel pour les siDRP1 vs 0.082 ± 0.003 g/g pour les siControl, -24h : 0.080 ± 0.003 g/g pour les siControl vs 0.079 ± 0.003 g/g pour les siDRP1, et à t0 (jour de l'injection) : 0.076 ± 0.004 g/g pour les siDRP1 vs 0.082 ± 0.003 g/g pour les siControl). 24h après l'injection des siRNA, une diminution de la prise alimentaire est observée dans les 2 groupes (0.038 ± 0.007 g/g pour les siControl et 0.051 ± 0.006 g/g pour les siDRP1), conséquence de l'injection dans le parenchyme cérébral. A 48h après injection, la prise alimentaire augmente progressivement mais reste significativement plus faible que celle mesurée avant injection (0.046 ± 0.004 g/g pour les siControl et 0.059 ± 0.005 g/g pour les siDRP1). Finalement, à 72h, les animaux ont retrouvé une prise alimentaire au moins équivalente à celle mesurée avant injection (0.068 ± 0.003 g/g pour les siControl et 0.081 ± 0.002 g/g pour les siDRP1) et le groupe témoin siControl ne présente plus de différence significative de PA comparée au temps avant injection (**Figure 33A**). 72h après l'injection intracérébrale de siRNA, le comportement alimentaire est donc restauré, montrant une récupération totale des rats, temps auquel l'ensemble des expériences ont été réalisées.

Toutefois, lorsque les rats siDRP1 sont comparés aux siControl après injection, nous avons observé une prise alimentaire significativement plus élevée chez les rats siDRP1 à 24h, 48h et 72h après l'injection de siRNA.

Ces résultats montrent donc une hyperphagie associée à l'inhibition de DRP1, qui est indépendante de l'effet de l'injection.

Cependant, aucune modification du poids corporel n'a été mesurée au cours du temps, les deux groupes présentant des courbes de poids similaires (**Figure 33B**).

L'hyperphagie observée chez les rats si DRP1 comparée aux rats siControl n'a donc pas été suivie d'une prise de poids supérieure chez les rats siDRP1, ce qui suggère une augmentation des dépenses énergétiques chez ces animaux

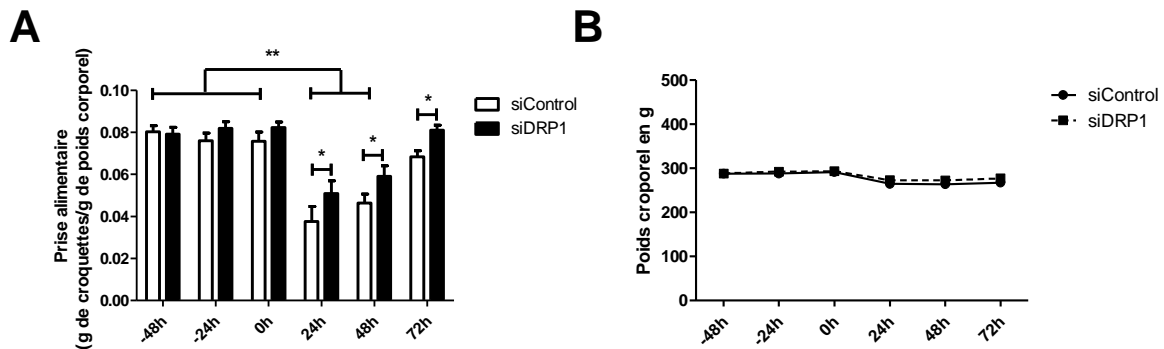


Figure 33 : L'inhibition de DRP1 dans le VMH est associée à une hyperphagie sans modification du poids corporel.

A : la prise alimentaire des rats a été mesurée de 48h avant l'injection des siRNA à 72h post injection. Les données sont représentées par les moyennes \pm sem. L'analyse statistique est réalisée par une Two Way ANOVA suivi d'un post test de Bonferroni, pour la prise alimentaire au cours du temps ainsi que la comparaison de cette PA entre chaque groupe. n=17 pour chaque temps et chaque groupe (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

B : le suivi du poids a été fait au cours du temps de 48h précédant l'injection de siRNA à 72h post-injection. Les données sont représentées par les moyennes \pm sem. L'analyse statistique est réalisée par une Two Way ANOVA suivi d'un post test de Bonferroni, pour l'évolution de la PA au cours du temps ainsi que la comparaison entre chaque groupe. n=19 pour chaque temps et chaque groupe.

Le NA, site d'injection des siRNA, est un noyau hypothalamique dans lequel sont retrouvés deux populations majeures de neurones impliqués dans le contrôle de la PA et des dépenses énergétiques : les neurones NPY, orexigènes et inhibiteurs des dépenses et les neurones POMC, anorexigènes et stimulateurs des dépenses. Nous avons donc quantifié par RT-qPCR le niveau d'expression de leurs ARNm afin de déterminer si une variation de l'une

ou l'autre de ces populations pouvait être à l'origine de l'hyperphagie observée chez les rats siDRP1, ceci en absence de prise de poids. Les **figures 34 A et B** montre qu'il n'existe aucune modification d'expression de ces neuropeptides chez les animaux siDRP1.

Les taux d'ARNm des neuropeptides NPY et POMC ne sont pas modifiés chez les rats siDRP1. Ces résultats n'excluent pas nécessairement le rôle de ces neuropeptides, car ici seuls les taux des ARNm ont été quantifiés. Alternativement, ce sont peut-être d'autres neuropeptides impliqués dans l'équilibre énergétique qui ont pu être modifiés.

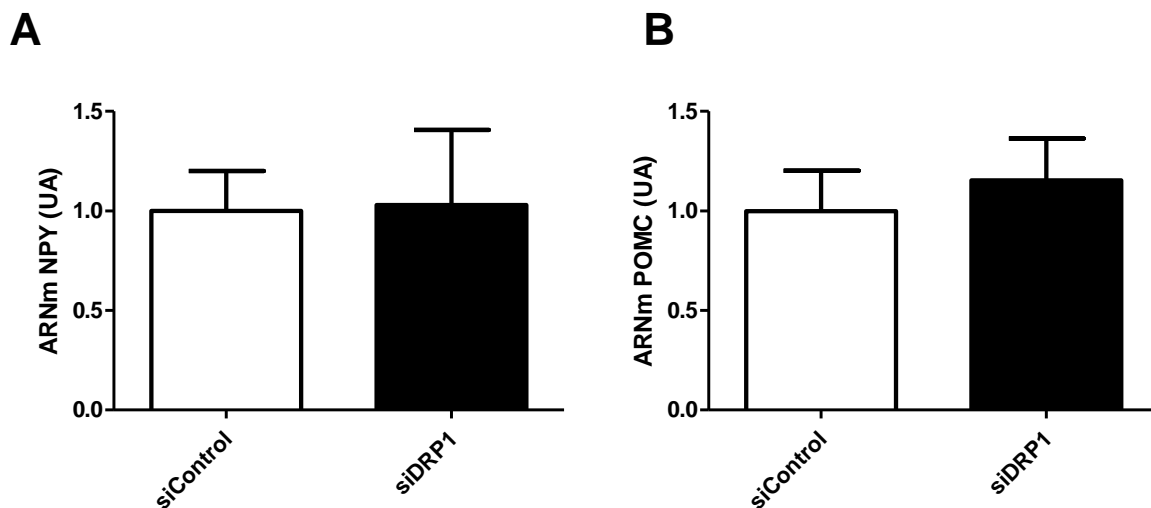


Figure 34 : Absence de modification de l'expression des ARNm des neuropeptides NPY et POMC du VMH chez les animaux siDRP1.

L'expression des ARNm des neuropeptides NPY (A) et POMC (B) a été quantifiée par RT-qPCR. Les données représentent des quantifications relatives rapportées à l'ARNm de référence codant pour l'ARNr 18S. Les données sont représentées par les moyennes \pm sem. $n=6$ pour le groupe siControl et $n=7$ pour le groupe siDRP1. L'analyse statistique a été réalisée par un t-test non apparié.

Les rats siDRP1 ne montrent aucune augmentation du poids corporel comparativement aux rats siControl, ceci malgré une hyperphagie. Ceci suggérerait que les dépenses énergétiques soient augmentées chez les animaux siDRP1. Afin d'avoir une indication sur ces dépenses, nous avons mesuré les ARNm de la protéine découplante UCP1 dans le tissu

adipeux brun interscapulaire (TABi). Cette protéine est impliquée dans les dépenses énergétiques en activant la thermogénèse du tissu adipeux brun. Nous avons mis en évidence une augmentation des taux d'ARNm d'UCP1 dans ce tissu chez les rats siDRP1 (Quantification relative (QR) en unité arbitraire (UA) : 1.46 ± 0.09 pour les siDRP1 vs. 1.0 ± 0.06 pour le groupe siControl) (**Figure 35**).

Une telle induction est observée lors d'une augmentation de la thermogénèse, les rats siDRP1 présentent donc très probablement une activité thermogénique plus importante, ce qui expliquerait le maintien de leur poids corporel comparable aux témoins siControl, ceci malgré leur hyperphagie.

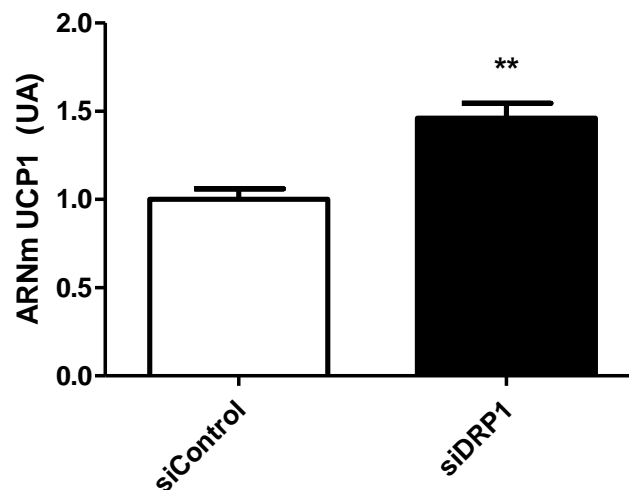


Figure 35 : Augmentation d'expression de l'ARNm codant pour UCP1 dans le tissu adipeux brun interscapulaire chez les rats siDRP1.

L'expression de l'ARNm UCP1 a été quantifiée par RT-qPCR. Les données représentent les quantifications relatives rapportées à l'ARNm de référence codant pour l'ARNr 18S. Les données sont représentées par des moyennes \pm sem. $n=5$ pour le groupe siControl et $n=6$ pour le groupe siDRP1. L'analyse statistique a été réalisée par un t-test non apparié, $**p<0.01$.

Enfin, certains paramètres biochimiques liés à l'homéostasie glucidique ont été mesurés. Ces mesures montrent que ni la glycémie (6.36 ± 0.12 mM pour les siControl vs

6.07±0.13mM pour les siDRP1) ni l'insulinémie (33.32±7.83mU/L pour les siControl vs 32.19±7.22mU/L pour les siDRP1) ne sont pas affectées par l'inhibition de DRP1 dans le VMH (**Figure 36**). Cependant, nous avons mesuré une diminution importante du contenu hépatique en glycogène (siDRP1 : 6.2±1.5µg glucose équivalent glycogène (GEG)/mg foie vs 11.4±0.9µg GEG/mg foie chez les siControl) (**Figure 37**).

Cette diminution du contenu hépatique du glycogène est en faveur d'une glycogénolyse augmentée, et suggère donc une production hépatique de glucose plus importante.

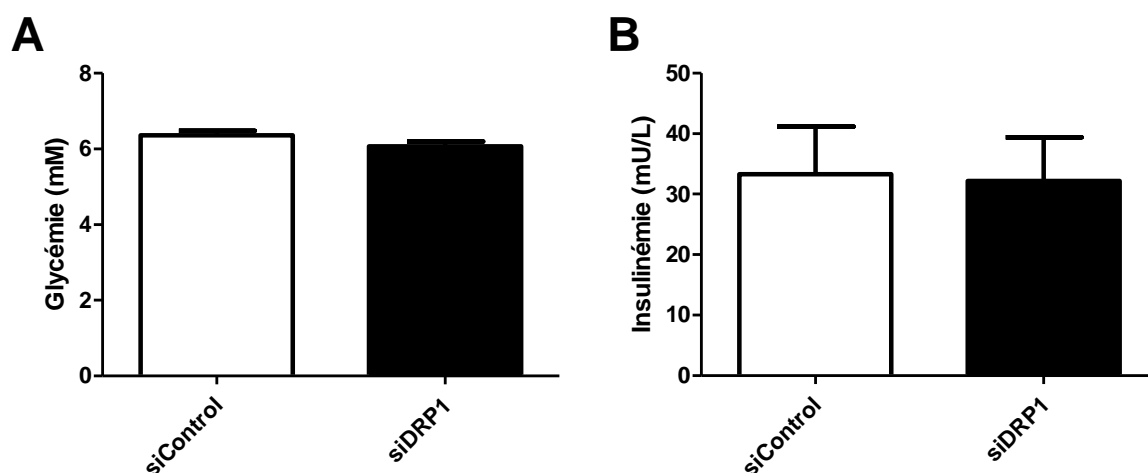


Figure 36 : Absence de modification de la glycémie et de l'insulinémie à 72hchez les rats siDRP1.

A partir des prélèvements sanguins, le dosage de la glycémie (A) et de l'insulinémie (sur les plasmas, dosage ELISA) (B) sont réalisés. Les données sont représentées par les moyennes ± sem et analysées par des t-test non appariés. n=13 pour la glycémie des siControl et n= 12 pour celle des siDRP1 ; n=17 pour chaque groupe pour l'insulinémie.

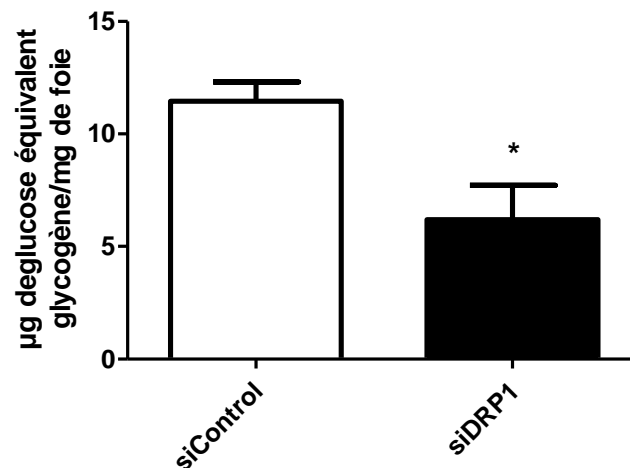


Figure 37 : Diminution du contenu hépatique en glycogène chez les rats siDRP1.

La quantité de glycogène contenue dans le foie a été mesurée par dosage du glucose produit après l'hydrolyse du glycogène (via l'amyloglucosidase) contenu dans les lysats de tissu hépatique. Les données sont représentées par les moyennes \pm sem et analysées par un t-test non apparié, n=11 pour les siControl et n=13 pour les siDRP1. * $p < 0.05$.

D. Conséquence de l'inhibition de la fission mitochondriale dépendante de DRP1 sur la sensibilité du VMH au glucose

Pour comprendre le rôle de DRP1 dans le « glucose sensing » et la signalisation mEAOs au niveau du VMH, nous avons étudié les conséquences de son inhibition dans la détection d'une augmentation cérébrale de la glycémie. Deux études ont été réalisées pour cela. La première implique l'axe hypothalamo-pancréatique et le contrôle nerveux de la sécrétion d'insuline. La seconde concerne la prise alimentaire et l'effet satiétogène du glucose sur les rats mis à jeun lors de la réalimentation.

1. Inhibition de DRP1 et détection hypothalamique du glucose : signalisation mEAOs et sécrétion d'insuline

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à l'axe hypothalamo-pancréatique. Dans l'équipe, il a été montré précédemment qu'une injection carotidienne de glucose vers le cerveau (9mg/kg) induisait 1 min après l'injection un pic de sécrétion d'insuline en périphérie. Cette injection ne provoque aucune modification de glycémie, la sécrétion observée est donc uniquement due à la détection cérébrale du glucose. Cette détection cérébrale nécessite au niveau hypothalamique (VMH) une production de mEAOs pour déclencher la réponse, en effet, l'activation neuronale enregistrée dans le NA et la sécrétion d'insuline sont abolis en présence d'antioxydants.

Nous avons donc testé la sensibilité hypothalamique au glucose des rats siDRP1 en utilisant ce test et dosé la production de mEAOs et d'insuline. La glycémie suite à l'injection carotidienne reste constante dans les deux groupes (**Figure 38A**). La sécrétion d'un pic d'insuline à 1 min est bien présente chez les rats siControl ayant reçu un bolus de glucose (delta insulinémie de 103.2 ± 20.4 mU/L en réponse au glucose) (**Figure 38B**) et est associée à une production de mEAOs dans le VMH (17033 ± 3540 UA après injection de NaCl, 37797 ± 6211 UA après injection de glucose, soit + 220%) (**Figure 38C**), cette production est absente dans les autres régions cérébrales testées (a priori non sensibles au glucose), confirmant les résultats précédents du laboratoire sur la production régio-spécifique des mEAOs lors de l'injection du bolus de glucose (**Figure 38D et E**). La détection cérébrale du glucose lors de ce test n'est donc pas altérée chez les animaux siControl.

En revanche, les rats chez lesquels la protéine DRP1 a été inhibée, le pic d'insuline est fortement diminué en réponse au glucose (delta insulinémie à 1 min de 37.8 ± 7.2 mU/L, soit une diminution de presque un facteur 3 comparée aux rats siControl). De plus, aucune production de mEAOs n'est observée dans le VMH des rats siDRP1 (13139 ± 1469 UA après injection de NaCl vs 18156 ± 1947 UA après l'injection de glucose, à 1min). Ce résultat démontre le rôle de la protéine de fission DRP1 dans la production de mEAOs hypothalamique lors de la détection du glucose (**Figure 38**).

La protéine de fission DRP1, adressée à la mitochondrie lors de ce test (induisant la fragmentation des mitochondries), apparaît donc nécessaire à la production de

mEAOs hypothalamique (VMH), cette production étant elle-même indispensable à la sécrétion d'insuline.

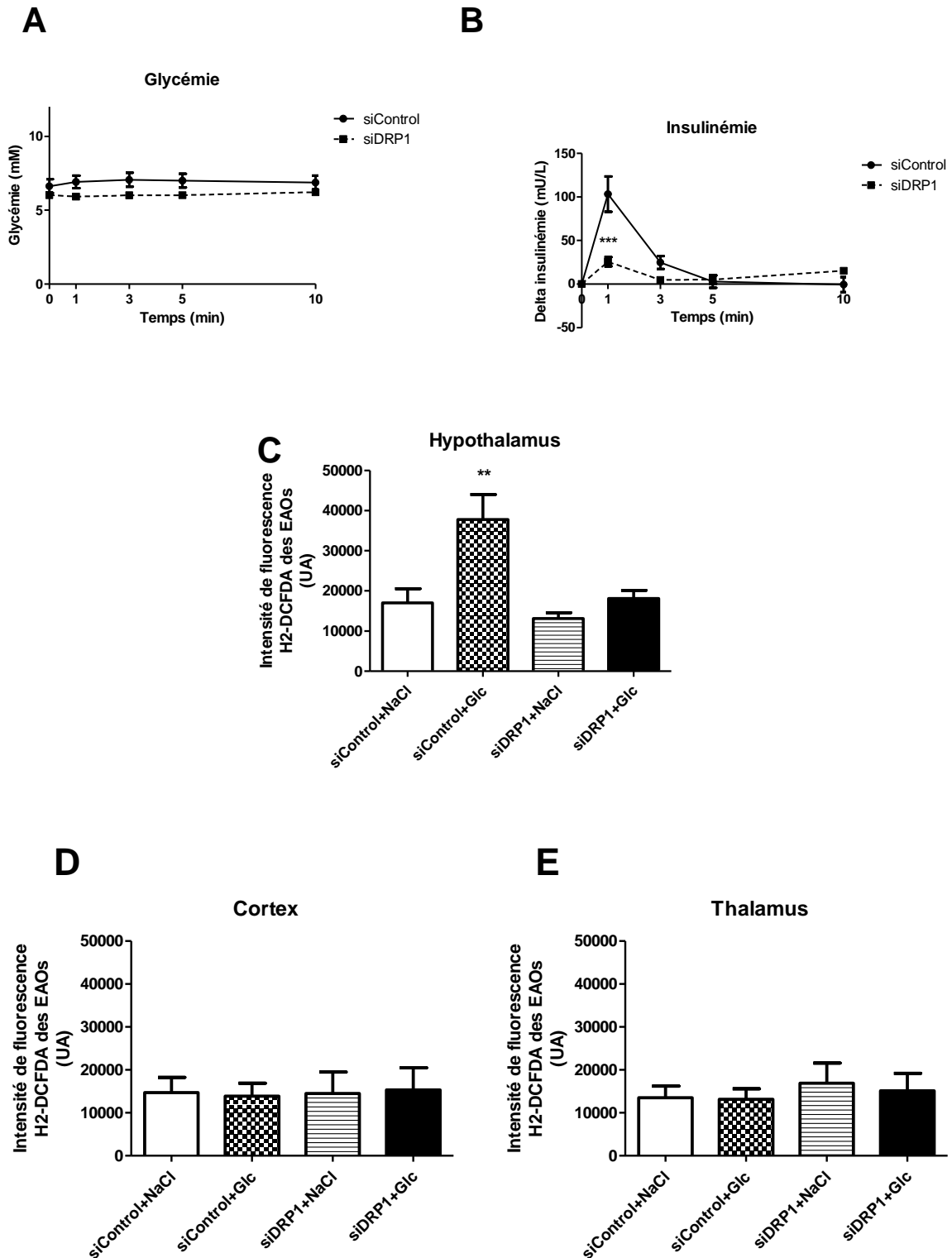


Figure 38 : Diminution de la sensibilité au glucose du VMH associée à une inhibition de la production de mEAOs lors de l'hyperglycémie.

A : Absence de variation de glycémie lors du test. Les résultats sont exprimés en mM à chaque temps suivant l'injection de Glucose (9mg/kg) et présentés sous forme de moyenne \pm sem. Aucune différence significative n'est mise en évidence par l'analyse statistique (Two way ANOVA suivie d'un post test de Bonferroni). n=6 pour chaque groupe.

B : Sécrétion d'insuline en réponse à l'injection carotidienne de glucose (9mg/kg). Les résultats sont exprimés en delta d'insulinémie par rapport au temps t0 avant injection. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm sem. Les différences significatives résultent de l'analyse statistique par une Two way ANOVA suivi d'un post test de Bonferroni. n=7 pour chaque groupe, *** p<0.001.

C : inhibition de la production d'EAOs dans le VMH des rats siDRP1 en réponse à l'injection de 9mg/kg de glucose. Le taux d'EAOs est mesuré dans le VMH en réponse à l'injection de NaCl ou du glucose chez les rats siControl ou siDRP1 à l'aide de la sonde H2DCFDA (dichlorofluoresceine diacétate), une minute après l'injection. L'étude statistique est menée avec une One way ANOVA suivie du post test de Bonferroni. n=5 pour les siControl+NaCl, n=4 pour les siControl+glucose, n=6 pour les siDRP1+NaCl, n=4 pour les siDRP1+glucose. ** p<0.01.

D et E : aucune variation de la production d'EAOs dans le Cortex ou le Thalamus suite à l'injection de NaCl ou de Glucose. Les données sont exprimées par les moyennes + SEM. L'étude statistique est menée avec une One way ANOVA suivi du post test de Bonferroni, n=5 pour les siControl+NaCl, n=6 pour les siControl+glucose, n=6 pour les siDRP1+NaCl, n=6 pour les siDRP1+glucose.

Afin de s'assurer que le défaut de sécrétion d'insuline en réponse à la détection cérébrale n'était pas dû à un défaut de la fonction pancréatique intrinsèque des animaux siDRP1 (à 72h), nous avons étudié la fonction pancréatique de ces animaux *in vitro* sur îlots fraîchement isolés. La sécrétion d'insuline a été mesurée en réponse au glucose et aucune différence de sécrétion n'a été observée entre les deux groupes, que ce soit en termes de sécrétion basale (5.5 mM glucose) ou stimulée (16.7 mM glucose) (5.5mM glucose : 4.56 \pm 0.47ng/ml/10 îlots chez les siControl, siDRP1: 4.93 \pm 0.49ng/ml/10 îlots et en condition stimulante (16.7 mM) : 6.67 \pm 0.17ng/ml/10 îlots pour les siControl vs 7.15 \pm 0.22ng/ml/10 îlots pour les siDRP1) (**Figure 39**).

Ces résultats montrent que la sensibilité pancréatique directe au glucose n'est pas altérée chez les animaux présentant une inhibition d'expression de DRP1 au niveau du VMH.

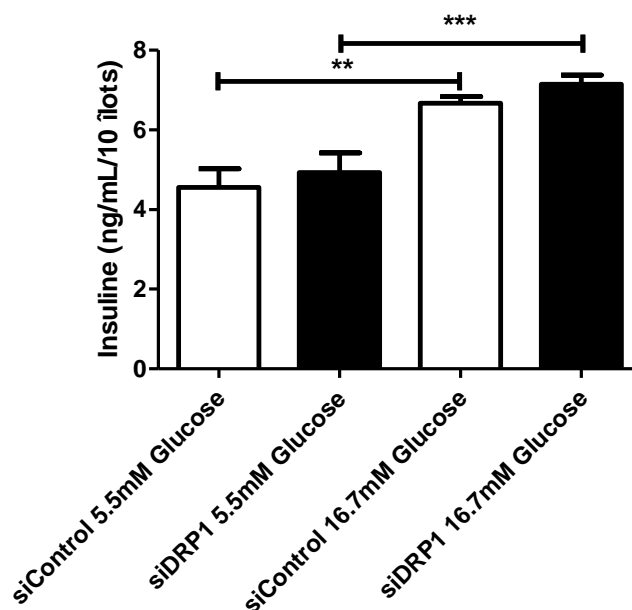


Figure 39 : Aucune modification de la sensibilité au glucose des îlots pancréatiques des animaux siDRP1.

In vitro, la libération d'insuline d'îlots pancréatiques isolés de rats siControl et siDRP1 a été mesurée en condition basale de glucose (5.5mM) ou d'hyperglycémie (16.7mM). Les données sont représentées par les moyennes \pm sem. $n=12$ dans chaque groupe; l'analyse statistique a été faite par une One way ANOVA suivi du post test de Bonferroni, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

L'injection carotidienne de glucose vers le cerveau stimule les aires hypothalamiques puis finalement déclenche l'activation du rameau pancréatique du nerf vague qui innerve, entre autres, les cellules B du pancréas. Cette activation est responsable du pic d'insuline observé. Cette réponse est due à la libération d'acétylcholine par les terminaisons nerveuses, qui se fixe sur les récepteurs muscariniques (type M3) et elle est inhibée par l'atropine, antagoniste de ces récepteurs (Atef et al., 1995; Guillod-Maximin et al., 2004; Jansson and Hellerstrom, 1986; Niiijima et al., 1988). Afin de déterminer si une modification du tonus parasympathique existait sur les îlots suite à l'inhibition hypothalamique de DRP1, nous avons mesuré la réponse d'îlots pancréatiques isolés à l'acétyl-méthylcholine bromide, un agoniste des récepteurs muscariniques cholinergiques. En effet, il est décrit que la modification du tonus du système nerveux autonome modifie la réponse des récepteurs dont l'affinité pour le ligand et/ou le nombre de récepteurs est alors augmenté ou diminué selon que le tonus diminue ou augmente, respectivement (Cruciani-Guglielmacci et al., 2005; Leon-

Quinto T, 1998). Les résultats montrent une sécrétion d'insuline qui est significativement augmentée en réponse à cet agoniste dans les îlots isolés des rats siDRP1 comparés à la sécrétion de ceux issus de rats siControl (siControls:3.84±0.10ng/ml/10 îlots vs 4.54±0.21ng/ml/10 îlots chez les siDRP1) (**Figure 40**).

Ce résultat montre une augmentation de la réponse aux agonistes des récepteurs cholinergiques muscariniques chez les rats siDRP1, qui pourrait donc être la conséquence adaptative d'une diminution du tonus parasympathique exercée sur les cellules B.

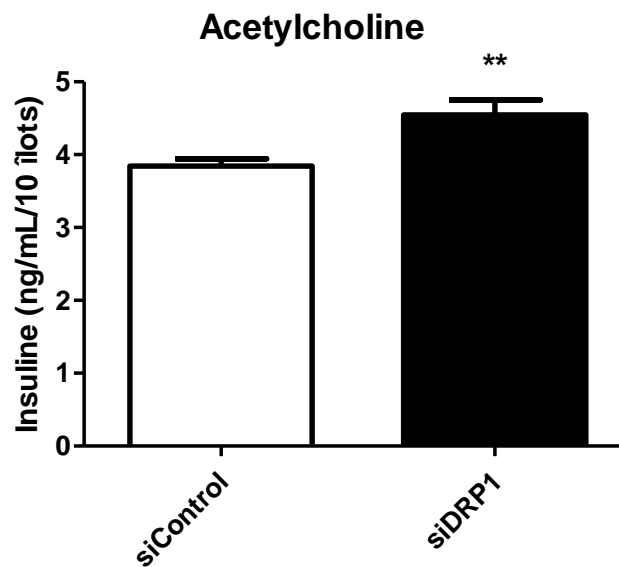


Figure 40 : Augmentation de la libération d'insuline en réponse à la stimulation par l'acétylcholine dans les îlots des rats siDRP1. Les îlots pancréatiques de rats siControl ou siDRP1 sont stimulés in vitro, par l'acetyl-méthylcholine bromide (agoniste des récepteurs cholinergiques). Les données sont représentées par les moyennes ± sem. L'analyse statistique est faite par un t-test non apparié, n=12 pour les siControl et n=12 pour les siDRP1. * * p<0.01.

2. Inhibition de DRP1, détection hypothalamique du glucose : signalisation mEAOs et signal satiétogène

Nous avons observé une hyperphagie suite à l'inhibition de la fission mitochondriale induite par l'injection de siRNA dirigés contre DRP1 dans le NA. Nous avons donc émis l'hypothèse que le défaut de sensibilité hypothalamique au glucose pouvait être impliqué dans

cette hyperphagie. Dans un premier temps, nous avons mis au point un test de réalimentation qui permette d'apprécier l'effet satiétogène du glucose. Ce test consiste en l'injection de glucose dans le NA de rats à jeun depuis 18h, chez lesquels la prise alimentaire est mesurée pendant les 4h suivant l'injection de glucose. Dans ces conditions, on observe une inhibition de ce paramètre chez les rats recevant du glucose dans le NA, avec un plateau atteint dès 2h de réalimentation (**Figure 41**), alors que les animaux témoins, qui reçoivent une injection de NaCl dans le NA, présentent une PA continue durant les 4h du test (groupe NaCl : 0.028 ± 0.002 g/g de poids corporel et groupe glucose : 0.017 ± 0.002 g/g de poids corporel) (**Figure 41**). Ces résultats indiquent que les rats ayant eu une injection de glucose dans le NA atteignent un rassasiement plus rapidement que les animaux ayant reçu du NaCl.

Ces résultats montrent le rôle satiétogène du glucose dû à sa détection dans le NA.

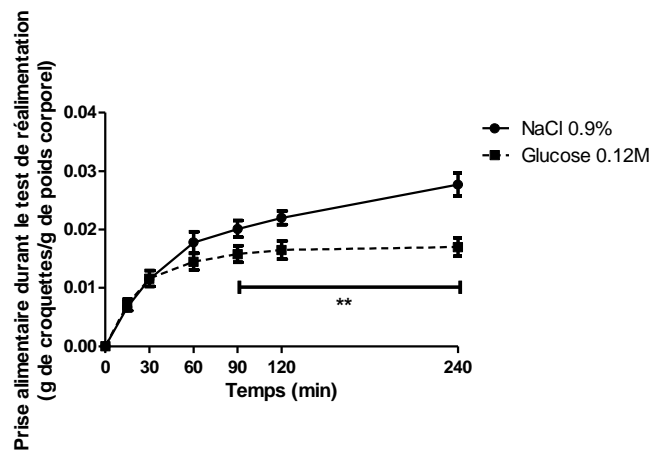


Figure 41 : Inhibition de la prise alimentaire par l'injection de glucose dans le NA lors d'un test de réalimentation.

Des rats placés à jeun durant 18h sont remis en présence de croquettes et leur prise alimentaire est mesurée durant 4h suite à une injection dans le NA de $1\mu\text{l}$ de NaCl 0.9% ou de Glucose 0.12M. Les données sont représentées par les moyennes \pm sem. L'analyse statistique est effectuée par une Two Way ANOVA suivi d'un post test de Bonferroni. N=10 dans chaque groupe, ** $p < 0.01$.

Ce test de réalimentation a alors été réalisé chez les rats siControl et siDRP1. Le même effet satiétogène du glucose est retrouvé chez les rats siControl injecté avec du glucose comparé aux animaux siControl recevant du NaCl (0.026 ± 0.002 g/g de poids corporel). En

revanche, chez les animaux siDRP1, la diminution de la PA en réponse à l'injection de glucose et n'est plus présente comparée aux groupes siControl recevant le glucose ou siDRP1 recevant du NaCl (siControl+glucose : 0.013 ± 0.002 g/g de poids corporel; siDRP1+glucose : 0.024 ± 0.002 g/g de poids corporel; siControl+NaCl : 0.026 ± 0.002 g/g de poids corporel; siDRP1+NaCl : 0.023 ± 0.001 g/g de poids corporel) (**Figure 42**).

Ces résultats mettent donc en évidence que le signal de satiété induit par le glucose injecté dans le NA n'est plus transduit lorsque la fission médiée par DRP1 est inhibée.

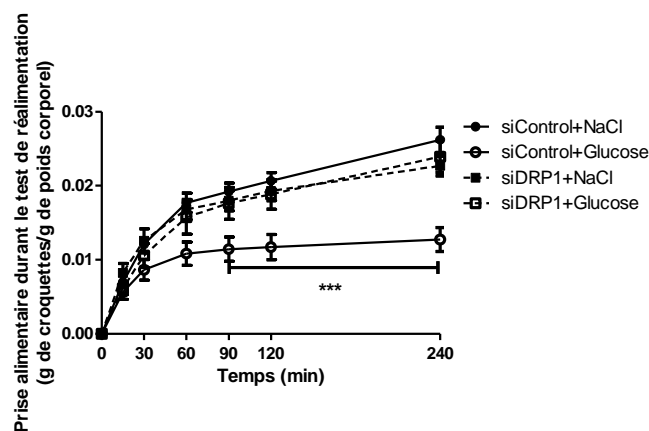


Figure 42 : Perte de l'inhibition de la prise alimentaire lors d'un test de réalimentation en réponse à une injection de Glucose dans le NA chez les rats siDRP1.

Les rats siControl ou siDRP1 placés à jeun durant 18h sont remis en présence de croquettes et leur prise alimentaire est mesurée durant 4h suite à une injection dans le NA de $1\mu\text{l}$ de NaCl 0.9% ou de Glucose 0.12M. Les données sont représentées par les moyennes \pm sem. L'analyse statistique est effectuée par une Two Way ANOVA suivi d'un post test de Bonferroni. N=14 dans chaque groupe, *** $p < 0.001$.

Lors de la détection hypothalamique du glucose, une production de mEAOs dans le VMH est observée et nous avons vu que celle-ci est nécessaire à la signalisation responsable de la sécrétion d'insuline. De la même façon, nous avons mesuré la production de mEAOs du VMH 1min après l'injection de glucose dans le NA au cours du test de réalimentation. Dans ce cas, on observe une forte augmentation du taux d'EAOs chez les animaux siControl 1 min après avoir reçu du glucose comparée à la production basale des animaux siControl injectés par du NaCl (siControl+NaCl : 1362 ± 117 UA vs 3800 ± 864 UA chez les rats siControl+glucose). Chez les animaux siDRP1, la production basale de mEAOs est identique

à celle des siControl pour l'injection de NaCl (1234 ± 204 UA pour les siDRP1+NaCl), par contre, les rats siDRP1 recevant du glucose ne présentent plus d'augmentation des mEAOs (1291 ± 119 UA), ce taux étant identique à celui mesuré chez les animaux injectés par du NaCl (siControl ou siDRP1) (**Figure 43**).

Ainsi, les animaux siDRP1 ne produisent plus de mEAOs en réponse au glucose, entraînant une perte de l'effet satiétogène du glucose. Ces résultats confirment ceux obtenus lors de la sécrétion d'insuline par une seconde approche fonctionnelle. Plus généralement, cela confirme que la détection d'une élévation de la concentration en glucose au niveau hypothalamique nécessite une signalisation redox et que celle-ci dépend en amont de la fission induite par le glucose.

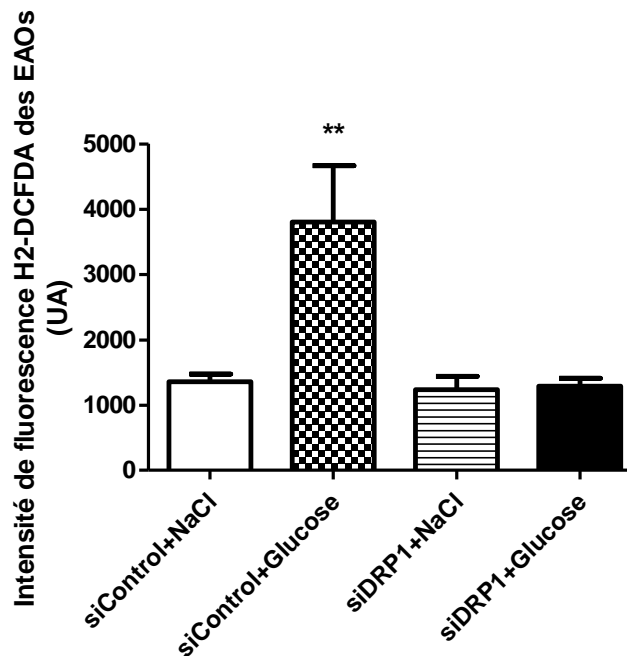


Figure 43 : Inhibition de la production d'EAOs lors de l'injection cérébrale de glucose au cours du test de réalimentation.

Inhibition de la production d'EAOs dans le VMH des rats siDRP1 en réponse à l'injection de 9mg/kg de glucose. Le taux d'EAOs est mesuré dans le VMH en réponse à l'injection de NaCl ou de glucose chez les rats siControl ou siDRP1. Le taux d'EAOs est mesuré une minute après l'injection intra-cérébrale par oxydation de la sonde H2DCFDA (Dichlorofluorescéine diacétate). L'étude statistique est menée par une One way ANOVA suivi du post test de Bonferroni, n=6 pour chaque groupe. ** p<0.01.

3. Inhibition de la fission dépendante de DRP1 dans le VMH et activité de la CRM

L'altération de la dynamique mitochondriale modifie l'activité de la CRM. Comme la CRM est le principal site de production d'EAOs en réponse au glucose, nous avons étudié l'activité de la CRM dans le VMH de rats où la protéine de fission DRP1 était inhibée. Cette étude a été réalisée grâce à la technique d'oxygraphie qui permet d'évaluer la respiration mitochondriale en mesurant la consommation d'O₂ en réponse à différents stimuli sur les tissus de VMH perméabilisés (Benani et al., 2009).

Ces expériences montrent une consommation basale d'O₂ qui n'est pas modifiée chez les siDRP1 comparés aux siControl. L'activité non stimulée de la CRM n'est donc pas altérée par l'inhibition de DRP1, ceci pouvant expliquer l'absence de phénotype marqué en l'absence de stimulation au cours des résultats précédemment mentionnés (**Figure 44**).

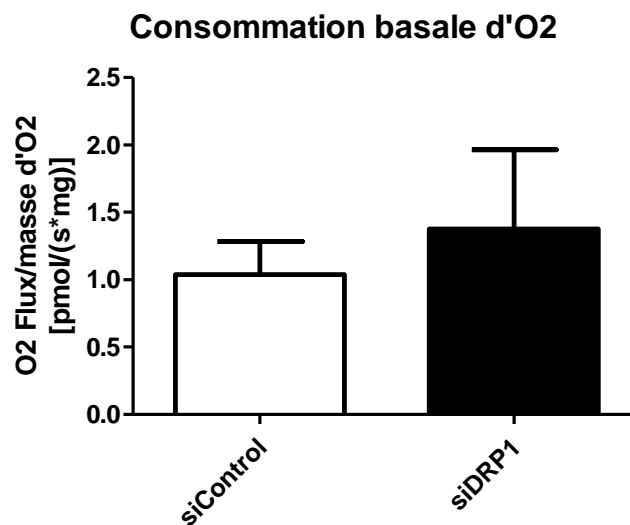


Figure 44 : Aucune modification de la consommation basale d'O₂ dans le VMH entre les rats siControl et siDRP1. Le VMH des rats est prélevé et perméabilisée puis placé dans une chambre d'oxygraphie dans un milieu permettant de mesurer la consommation d'oxygène. Par la suite, sont ajoutés successivement du glutamate (10mM) ; dose saturante d'adénosine diphosphate (ADP, 1mM) pour atteindre l'état 3 de la respiration; le Carboxy-Artractylate (CAtr, 0.5µM) pour inhiber le complexe V et pour atteindre l'état 4 de la respiration. Sur un autre lot d'hypothalami, la respiration maximale est induite par une dose de CCCP de 0.4µM. Les données sont représentées par les moyennes ± sem. L'analyse statistique est faite par un t-test non apparié, n=8 pour les siControl et n=6 pour les siDRP1.

Nous avons ensuite alimenté la CRM au niveau du complexe I par une injection de glutamate (concentration saturante de 20 mM). Ces expériences montrent une diminution de la stimulation de la respiration induite par le glutamate chez le rat siDRP1 ($148.0 \pm 5.9\%$ d'augmentation de la consommation d'oxygène chez les siControl vs $126.3 \pm 2.6\%$ chez les siDRP1). Cette diminution de la respiration révèle une diminution de la capacité du glutamate à stimuler la CRM chez les animaux siDRP1, suggérant qu'un changement de morphologie est nécessaire pour activer pleinement la respiration (**Figure 45**).

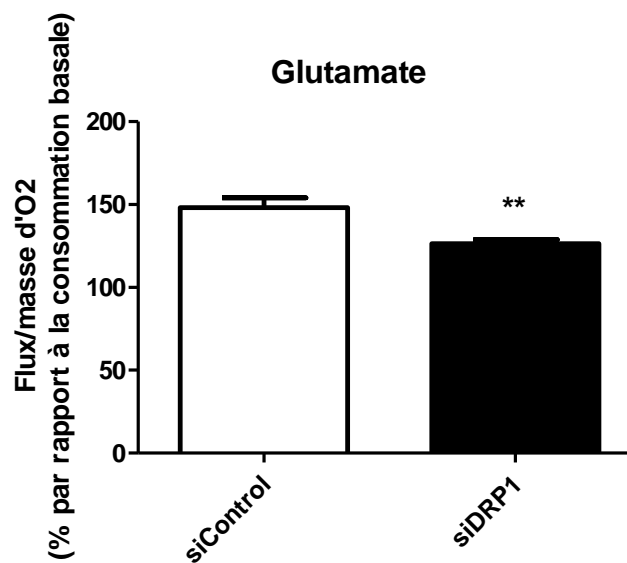


Figure 45 : Diminution de la stimulation de la consommation d'O₂ dans le VMH chez les rats siDRP1 après stimulation par du glutamate.

Une injection de glutamate (10mM) est faite dans la chambre d'oxygraphie pour stimuler l'activité du complexe I, ce qui entraîne une augmentation de la consommation d'O₂, celle-ci est cependant moins augmentée dans le VMH des rats siDRP1. Les données sont représentées par les moyennes \pm sem rapportées en % de la consommation moyenne basale. L'analyse statistique est faite par un t-test non apparié, n=8 pour les siControl et n=6 pour les siDRP1. ** p<0.01.

L'état 3, qui représente la respiration stimulée par le glutamate couplée à la fonction de phosphorylation optimale du complexe V, est obtenu en injectant une dose saturante d'ADP. La consommation d'O₂ après cette injection reste significativement diminuée chez les rats siDRP1 par rapport aux siControl (siControl : $283.83 \pm 20.49\%$ d'augmentation par rapport à la consommation basale vs $209.45 \pm 24.22\%$ d'augmentation chez les siDRP1) (**Figure 46**).

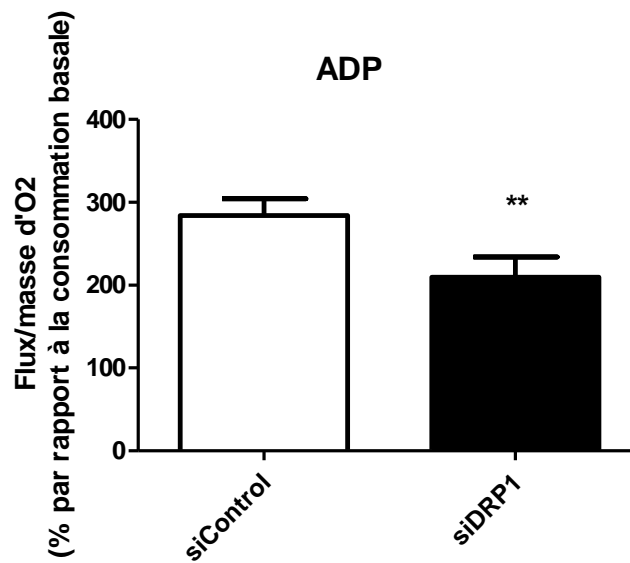


Figure 46 : Diminution de la stimulation de la consommation d'O₂ dans le VMH chez les rats siDRP1 après stimulation par l'ADP.

Une injection d'une concentration saturante en ADP (1mM) permet d'atteindre l'état 3 de la respiration en stimulant l'activité du Complexe V, ce qui permet d'atteindre la respiration couplée maximale. Les données sont représentées par les moyennes \pm sem. L'analyse statistique est faite par un t-test non apparié, n=8 pour les siControl et n=6 pour les siDRP1. ** p<0.01.

Finalement, le Carboxyatractyloside (CAtr), inhibiteur indirect du complexe V (inhibition de la translocation de l'ADP/ATP à la membrane mitochondriale) a été utilisé pour obtenir l'état 4 qui correspond à la respiration indépendamment de la phosphorylation oxydative puisque le complexe V est bloqué. La consommation d'O₂ dans ces conditions est identique dans les deux groupes après stimulation par la CAtr (siControl : 194.11 \pm 11.14% de la consommation basale ; siDRP1:177.83 \pm 11.9%) (**Figure 47A**). Ceci traduit une diminution de la consommation d'O₂ plus faible chez les siDRP1 comparé aux siControl (inhibition de -89.72 \pm 14.15% chez les siControl vs -31.62 \pm 14.26% chez les siDRP1) (**Figure 47B**). Ceci suggère que la respiration en elle-même ne soit pas affectée mais que c'est le couplage entre la respiration et le complexe V qui soit touchée.

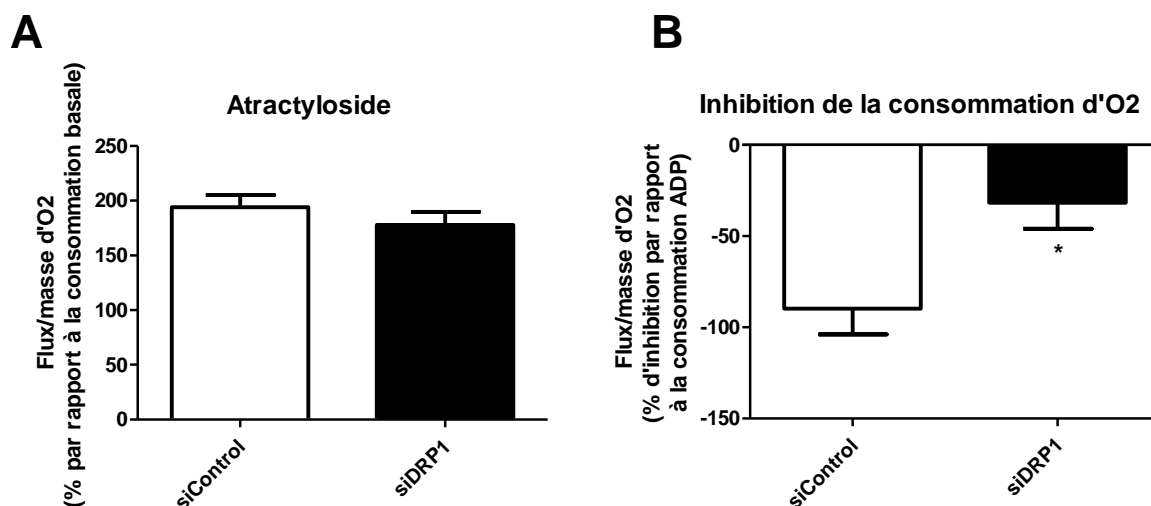


Figure 47 : La respiration indépendante du couplage n'est pas modifiée chez les rats siDRP1.

A : Mesure de la consommation d'oxygène par rapport à la consommation basale suite à l'ajout de CAtr (0.5 μ M). Les données sont représentées par les moyennes \pm sem. L'analyse statistique est faite par un t-test non apparié, n=8 pour les siControl et n=6 pour les siDRP1.

B : Mesure de l'inhibition de la consommation d'oxygène induite par la CAtr. Les données sont représentées par les moyennes \pm sem. L'analyse statistique est faite par un t-test non apparié, n=8 pour les siControl et n=6 pour les siDRP1. * p<0.05.

Le ratio de l'état 3/état4 nous permet de calculer le quotient respiratoire, celui-ci est significativement diminué chez les rats siDRP1 (siControl : 1.46 \pm 0.07 UA; siDRP1:1.16 \pm 0.07 UA), indiquant une diminution du couplage respiratoire (**Figure 48**).

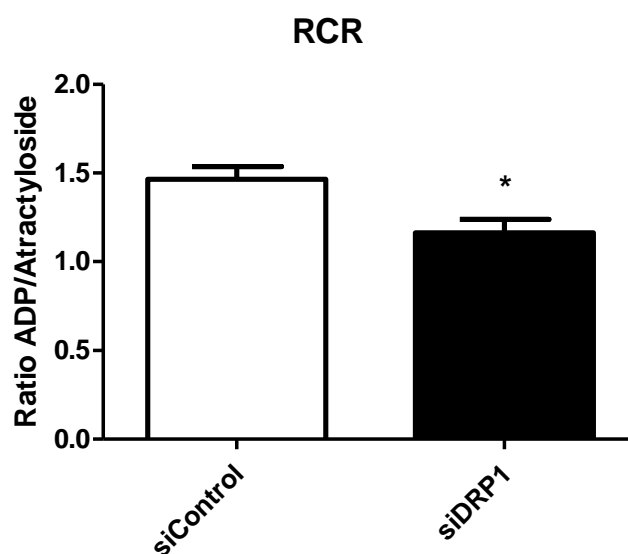


Figure 48 : Diminution du quotient respiratoire chez les rats siDRP1.

Ce quotient est défini comme le rapport état 3 (ADP)/état 4 (CAtr). Les données sont représentées par les moyennes \pm sem. L'analyse statistique est faite par un t-test non apparié, n=8 pour les siControl et n=6 pour les siDRP1.* $p < 0.05$.

La mesure de la respiration sous CCCP, un découplant pharmacologique, permet de révéler la capacité respiratoire maximale de la CRM. Celle-ci n'est pas modifiée dans le VMH de rats inhibés pour DRP1 (siControl : $+239.79 \pm 15.75\%$ de la consommation basale vs $+225.71 \pm 31.49\%$ chez les siDRP1) (**Figure 49**). Les capacités respiratoires maximales des deux groupes sont donc identiques, ce qui confirme que la respiration ne semble pas altérée entre les deux groupes.

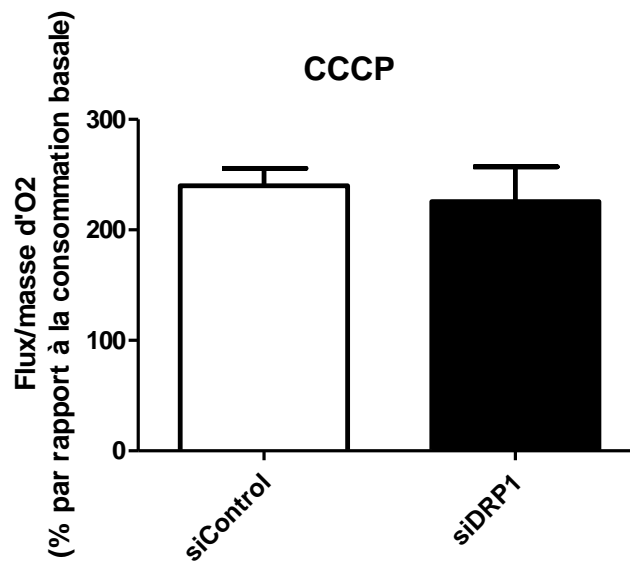


Figure 49 : Aucune modification de la respiration maximale dans le VMH entre les rats siControl et siDRP1.

La respiration maximale est induite par une dose de CCCP de 0.4µM. Les données sont représentées par les moyennes ± sem. L'analyse statistique est faite par un t-test non apparié, n=8 pour les siControl et n=6 pour les siDRP1.

Enfin, nous avons évalué les taux d'ARNm de la protéine découplante UCP2 qui est la protéine découplante majoritaire dans l'hypothalamus de rongeurs et serait responsable d'un « mild uncoupling » (Richard et al., 1999). Le résultat indique qu'il n'y a aucune différence de l'expression de ce taux entre les deux groupes (**Figure 50**).

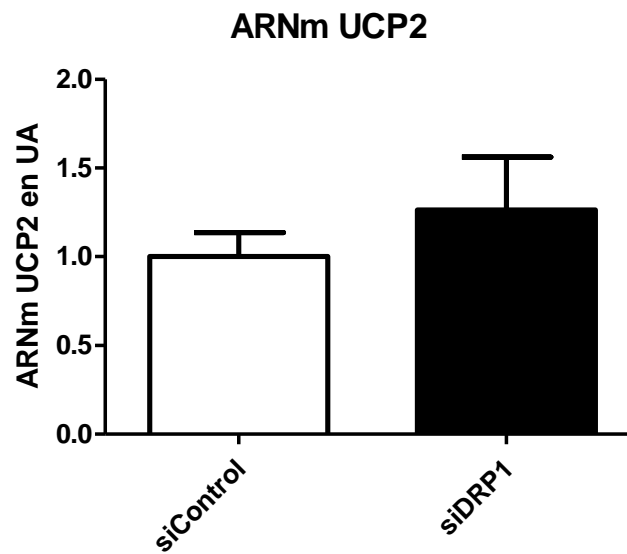


Figure 50 : Pas de modification de l'expression des ARNm d'UCP2 dans le VMH des rats siDRP1.

L'expression des ARNm d'UCP2 a été quantifiée par RT-qPCR. Les données représentent les quantifications relatives rapportées à l'ARNm de référence codant pour l'ARNr 18S. Les données sont représentées par les moyennes \pm sem. N=8 pour le groupe siControl et n=6 pour le groupe siDRP1. L'analyse statistique a été réalisée par un t-test non apparié.

L'ensemble des résultats obtenus en oxygraphie indique donc que les rats siDRP1 présentent une diminution globale de la capacité respiratoire mitochondriale dans le VMH, et que cette diminution semble due à une diminution du couplage de la CRM lorsque la fission est inhibée.

Discussion

Au cours des dernières années, l'équipe a mis en évidence que la détection hypothalamique du glucose mettait en jeu une production de mEAOs nécessaire à l'activation électrique du NA, puis aux réponses physiologiques associées (Leloup et al., 2006). Ce travail suggère qu'il existe une signalisation redox lors de la détection hypothalamique du glucose, bien que pour le moment les cibles de ces mEAOs ne soient pas encore identifiées. Cette signalisation est retrouvée également dans la cellule β (Leloup et al., 2011; Leloup et al., 2009; Pi et al., 2007; Pi et al., 2010), où la détection du glucose est primordiale à la sécrétion d'insuline et où le rôle clef du métabolisme oxydatif mitochondrial est identifié depuis longtemps (Wollheim and Maechler, 2002). Au niveau hypothalamique, nous avons également montré que cette signalisation était perturbée dans le modèle de rats Zucker obèse et insulino-résistant, mettant ainsi en avant l'importance d'une production de mEAOs qui soit parfaitement gérée (Colombani et al., 2009). L'ensemble de ces travaux montre qu'en réponse au stimulus glucose, il existe une capacité rapide et transitoire pour déclencher un signal redox par la mitochondrie. Cependant, les mécanismes permettant cette adaptation rapide de la production de mEAOs sont encore mal connus.

Au cours de ce travail, je me suis intéressé à la dynamique mitochondriale. En effet, des travaux antérieurs menés *in vitro* suggéraient que les modifications d'équilibre de cette composante étaient impliquées en amont de la production de mEAOs en réponse aux substrats, en particulier lors de l'hyperglycémie (Men et al., 2009; Molina et al., 2009; Paltauf-Doburzynska et al., 2004; Yoon et al., 2011; Yu et al., 2006; Yu et al., 2008). De plus, dans les pathologies métaboliques telles que l'obésité et le diabète, l'expression des acteurs de la dynamique mitochondriale est modifiée au niveau musculaire par exemple (Bach et al., 2005; Bach et al., 2003), bien qu'aucune relation de cause à effet n'ait été étudiée. Les données bibliographiques montrent que la dynamique mitochondriale intervient dans la régulation de la bioénergétique mitochondriale, l'activité de la CRM, ainsi que la production de mEAOs. Ces données nous ont orientés vers l'hypothèse que le contrôle continu de la plasticité morphologique des mitochondries pouvait être impliqué dans la signalisation mEAOs lors de la détection hypothalamique du glucose.

Ce travail nous a permis de mettre en évidence, pour la première fois *in vivo*, le rôle de la dynamique mitochondriale, et en particulier de la fission mitochondriale dépendante de DRP1, lors du « glucose sensing » hypothalamique. Nous avons montré qu'elle représente un processus nécessaire à la production de mEAOs lors de la détection d'une augmentation de la glycémie. Ce travail permet de mettre en évidence une implication forte de la dynamique mitochondriale dans les mécanismes de contrôle de l'homéostasie énergétique. Ainsi, nous montrons au cours de ce travail :

- que la fission mitochondriale dépendante de DRP1 est déclenchée par une hyperglycémie cérébrale.
- que l'inhibition de l'expression de DRP1 dans le VMH empêche la mise en place d'une signalisation par les mEAOs en réponse à l'hyperglycémie cérébrale, conduisant à une perte de l'effet satiétogène du glucose et de la sécrétion d'insuline.
- que cette inhibition de fission via DRP1 modifie la respiration mitochondriale et notamment le couplage à la phosphorylation oxydative.
- Enfin, plus généralement, un remaniement de l'équilibre énergétique de ces animaux transitoirement inhibés pour DRP1 au niveau du VMH, puisque leur prise alimentaire est augmentée comparée aux animaux contrôles, sans modification de la prise de poids.

Chez les Mammifères, les mécanismes de fission mitochondriale dépendent essentiellement de deux protéines. La protéine DRP1, majoritairement cytoplasmique et qui peut être adressée à la membrane mitochondriale où elle se lie à une deuxième protéine, Fis1, au niveau de sites spécifiques d'induction de fission (Pitts et al., 1999; Smirnova et al., 2001). Les protéines DRP1, ainsi relocalisées à la surface des mitochondries, s'oligomérisent et forment alors une spirale autour de la mitochondrie, puis via l'hydrolyse du GTP, cette spirale se contracte et entraîne la division des mitochondries. L'adressage de DRP1 à la mitochondrie se fait dans diverses conditions (stress oxydant, NO, hypoxie...) mais les mécanismes moléculaires permettant cette relocalisation subcellulaire de DRP1 en fonction de certains stimuli sont encore mal connus (Uo et al., 2009).

Au cours de ce travail, nous avons pu observer pour la première fois, un adressage rapide de DRP1 du cytosol à la mitochondrie, dès 1min *in vivo*, en réponse au glucose. La

capacité du glucose à induire un adressage de DRP1 aux mitochondries, puis leur fragmentation, est en accord avec de précédents travaux montrant une fragmentation du réseau mitochondrial dans des conditions d'hyperglycémie sur des cultures de myoblastes et d'hépatocytes en culture (Yu et al., 2006). Ces études montraient également que ces processus étaient dépendants de la protéine de fission DRP1 puisque sa délétion ou l'utilisation d'un dominant négatif de DRP1 (DLP1-K38A), empêchait la fragmentation induite en condition d'hyperglycémie (Men et al., 2009; Uo et al., 2009; Yu et al., 2006). Ici, l'adressage a été mesuré en réponse au glucose. Les travaux de Yu et coll. ont montré que l'utilisation d'un analogue non métabolisable du glucose, et non transporté dans la cellule ne provoquait ni la fragmentation mitochondriale, ni la production de mEAOs. En revanche, l'utilisation d'un bloqueur du transport du pyruvate (produit de la glycolyse) dans la mitochondrie empêche la production de mEAOs, mais une fragmentation des mitochondries est toujours présente (Yu et al., 2006). Ces résultats suggèrent que l'adressage pourrait être dû à un signal métabolique issu de la glycolyse qui agirait directement sur DRP1 ou bien à un contrôle indirect par des protéines interagissant avec DRP1 (MARCHV, l'ubiquitine ligase E3, phosphorylation par des kinases...). DRP1 serait alors la cible de signaux qui bloquerait ou permettrait son adressage à la mitochondrie. (Braschi et al., 2009; Chang and Blackstone, 2007; Cho et al., 2009; Cribbs and Strack, 2007; Han et al., 2008; Harder et al., 2004; Nakamura et al., 2006; Wasiak et al., 2007; Yonashiro et al., 2006; Zunino et al., 2007).

Cet adressage de DRP1 déclenche la fission et induit une fragmentation du réseau mitochondrial. Dans ce cas les mitochondries apparaissent plus courtes et sont transitoirement plus nombreuses. Cet adressage en réponse au glucose dans l'hypothalamus se produit très rapidement (1 min), et cette cinétique est concordante avec le temps auquel une production de mEAOs est mesurée, ainsi que le déclenchement des réponses physiologiques. Cette fragmentation rapide est en accord avec d'autres études montrant une capacité des mitochondries à se diviser rapidement. En effet, le mode d'action de DRP1 (adressage) semble permettre une réponse rapide aux stimuli inducteurs de fission, comme cela a été observé lors de la mitose ou d'autres signaux inducteurs de fission (James et al., 2003; Karbowski et al., 2004; Molina et al., 2009; Okamoto and Shaw, 2005; Suzuki et al., 2003; Westermann, 2002).

Afin de déterminer si cette fission était nécessaire à la production des mEAOs lors de la détection hypothalamique du glucose, nous avons choisi de bloquer la fission mitochondriale dépendante de DRP1. L'injection d'une séquence siRNA dirigée contre DRP1 a permis d'inhiber transitoirement son expression. Le NA a été la cible de l'injection, car ce noyau hypothalamique est identifié comme étant le premier à percevoir les variations de glycémie et contient une forte concentration de neurones sensibles au glucose (Blouet and Schwartz, 2010; Ciofi et al., 2009; Penicaud et al., 2006). Cette stratégie nous a permis de réduire l'expression protéique de DRP1 d'environ 80% trois jours après l'injection, temps auquel l'efficacité maximale de l'inhibition est atteinte. A ce temps, aucune compensation dans l'expression des autres acteurs de la dynamique mitochondriale n'a été mise en place (OPA1 et Mfn2 pour la fusion, et Fis 1 pour la fission).

L'altération de l'expression d'une des protéines de la dynamique modifie la morphologie mitochondriale. Ainsi, lors d'une diminution d'expression des protéines de fission, on observe une élongation du réseau mitochondrial (Coppola A, 2007; Molina et al., 2009; Pitts et al., 1999; Smirnova et al., 2001). Au cours de notre étude, l'inhibition *in vivo* de DRP1 entraîne effectivement une élongation du réseau mitochondrial, associé à un nombre diminué de mitochondries, confirmant la création d'un déséquilibre en faveur de la fusion dans le VMH. .

Nos résultats indiquent que la fission mitochondriale précède la production de mEAOs induite par la détection hypothalamique de l'hyperglycémie. En effet, l'inhibition de la protéine DRP1 dans le VMH bloque les réponses déclenchées par l'hyperglycémie cérébrale. Ainsi, on n'observe plus de production de mEAOs (et les réponses physiologiques associées). La fission mitochondriale dépendante de DRP1 est donc nécessaire à la mise en place d'une signalisation par les mEAOs *in vivo* dans notre modèle de détection du glucose.

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence une hyperphagie chez les rats inhibés pour DRP1 dans le VMH. Cette hyperphagie n'est pas corrélée à une modification des taux des ARNm des neuropeptides NPY et POMC, principaux neuropeptides orexigène et anorexigène du NA, respectivement. Cependant, il reste possible que la libération de l'un et/ou l'autre soit modifiée, en effet, il a déjà été montré que l'absence de modification des taux de messagers de ces neuropeptides pouvait exister alors que leur libération était modifiée (Coppola A, 2007; Tung et al., 2010). Enfin, nous ne pouvons pas exclure que d'autres

populations peptidergiques soient impliquées (neurones à orexines A et B ou neurones MCH), ce que nous n'avons pas exploré dans cette étude.

Cette hyperphagie n'est pas suivie d'une prise de poids, ce qui traduit une augmentation des dépenses énergétiques. Nous avons alors évalué le taux d'ARNm d'UCP1 dans le tissu adipeux brun interscapulaire (TABi), marqueur de l'activité thermogénique de ce tissu, et indirectement, des dépenses énergétiques (nous ne disposons pas de cages métaboliques). Une augmentation des ARNm d'UCP1 est classiquement retrouvée lors d'expériences d'exposition au froid, ou encore au régime gras, induisant une forte thermogénèse (Bartness et al., 2010; Cannon and Nedergaard, 2004; Collins et al., 2010; Himms-Hagen et al., 1990; Li et al., 2004a; Nedergaard et al., 2001; Nicholls and Rial, 1999; Puigserver et al., 1998). L'induction de la thermogénèse dans le TAB implique l'activation du système nerveux sympathique (SNS) et suggère que ce puisse être le cas chez les animaux inhibés pour DRP1. De plus, une diminution du contenu en glycogène hépatique est également observée dans notre modèle. Ce résultat, en accord avec d'autres études, est corrélé à une stimulation du SNS lorsque les dépenses énergétiques sont augmentées (Robertson et al., 2008; Scheurink et al., 1996; Scheurink and Nolan, 1996). Finalement, ces résultats suggèrent que l'augmentation des dépenses énergétiques chez les animaux inhibés pour DRP1 puisse être due à une augmentation du tonus sympathique sur le foie et le TABi. Ainsi, nous pouvons faire l'hypothèse que le blocage des mécanismes de fission mitochondriale au niveau du VMH a probablement modifié l'activité de certaines populations neuronales, modifiant l'activité du SNA sur au moins deux effecteurs, le TABi et le foie.

L'obésité et le diabète de type 2 sont associés à des altérations des dépenses énergétiques dues à des modifications du tonus du SNA et présentent des modifications de l'expression des acteurs de la dynamique mitochondriale dans divers tissus, notamment les muscles (Bach et al., 2005; Bach et al., 2003). Dans les muscles squelettiques d'obèses ou de diabétiques de type 2, le poids corporel et l'indice de masse corporel (IMC) est corrélé à l'expression de Mfn2, protéine de fusion. Cette dernière est plus faible lorsque le poids et l'IMC augmentent. La perte de poids entraîne une augmentation de l'expression de Mfn2. De plus, une corrélation positive a également été mise en évidence entre Mfn2 et la sensibilité à l'insuline. Cette diminution d'expression de Mfn2 provoque une fragmentation du réseau mitochondrial, une diminution de la fonction de cet organelle et en particulier de la chaîne respiratoire (diminution d'expression des complexes I, II, III et IV, de l'activité enzymatique des complexes I et III, de l'oxydation du glucose, du pyruvate et du palmitate et une

diminution du potentiel de membrane mitochondrial). Par ailleurs, d'autres études ont mis en évidence une modification de la structure des crêtes mitochondriales suite à une modification morphologique des mitochondries (Cipolat et al., 2006; Frey and Mannella, 2000; Frezza et al., 2006). Ceci s'accompagne d'un réarrangement des complexes de la CRM qui affecte principalement les complexes I et III (Lenaz et al., 2010; Lenaz and Genova, 2010). La respiration mitochondriale couplée à la phosphorylation représente un véritable senseur énergétique, puisqu'elle utilise les substrats provenant du métabolisme des nutriments et permet de produire des signaux énergétiques tels que l'ATP, connu depuis longtemps, mais aussi les mEAOs, dont le rôle de signal est plus récent. Ainsi, la dynamique mitochondriale, en modifiant les capacités de la CRM à prendre en charge les substrats et/ou à produire ces signaux, permettrait de moduler ces signalisations en fonction des variations de flux de substrats, ou encore, à plus long terme, du statut énergétique.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'inhibition de DRP1 dans le VMH sur la détection du glucose et la signalisation mEAOs qu'elle induit. Nous montrons que les rats dont la fission mitochondriale est bloquée par l'inhibition de DRP1 ne produisent plus de mEAOs en réponse à l'hyperglycémie cérébrale et que la sécrétion d'insuline (commande vagale) normalement observée est alors fortement diminuée. Ce résultat suggère que la fission mitochondriale dépendante de DRP1 est une étape précoce précédant la production de mEAOs et indispensable à celle-ci. Ceci est en accord avec des études précédentes montrant une production de mEAOs dépendante d'une fission mitochondriale dans des conditions de forte concentration en glucose (Paltauf-Doburzynska et al., 2004; Yoon et al., 2011; Yu et al., 2006; Yu et al., 2008).

Cette inhibition de la sécrétion d'insuline aurait pu être la conséquence d'un défaut secondaire de la détection directe du glucose par les cellules β chez les animaux inhibés pour DRP1. Pour exclure un tel défaut, nous avons étudié la réponse au glucose d'îlots pancréatiques isolés de ces animaux et aucune différence de réponse n'a été observée indiquant que l'îlot a conservé ses capacités sécrétoires. Cependant, l'utilisation d'un agoniste des récepteurs muscariniques, mimant les effets de la stimulation vagale, montre une augmentation de la sécrétion d'insuline, ce qui pourrait traduire une sensibilité accrue des îlots à la stimulation cholinergique (Cruciani-Guglielmacci et al., 2005; Leon-Quinto T, 1998). En effet, cette réponse est observée lorsque l'activité du tonus parasympathique est diminuée, due à une augmentation de la quantité et/ou de l'affinité du récepteur. Cette hypothèse est en accord avec les résultats obtenus lors de l'hyperglycémie cérébrale chez les

animaux inhibés pour DRP1, en effet, la sécrétion d'insuline est inhibée et le contrôle de cette sécrétion est d'origine vagale (Niiijima, 1986, 1989), ce qui suggère fortement que le SNPS sur le pancréas soit affecté. L'inhibition de DRP1 au niveau du VMH aurait donc affecté les circuits neuronaux impliqués dans le contrôle du tonus parasympathique vers le pancréas.

Une autre approche pour étudier l'importance de la fission par DRP1 sur la signalisation mEAOs a été mise en place. Nous avons regardé le rôle satiétogène du glucose chez les animaux inhibés pour DRP1 au niveau du VMH. Après mise à jeun, l'inhibition de la prise alimentaire normalement observée après injection de glucose dans le NA est totalement absente chez ces animaux. Cet effet est associé à une absence de production de mEAOs dans le VMH lors de la stimulation par le glucose.

Dans les deux principales populations neuronales impliquées dans le contrôle de la PA du NA, NPY/AgRP et POMC, des effets opposés des mEAOs (inhibiteurs sur les NPY/AgRP et excitateurs sur les POMC) ont été décrits en réponse à la ghréline (Andrews et al., 2008; Horvath et al., 2009). Bien que nous n'ayons pas déterminé ici les populations impliquées, ces travaux suggèrent que dans notre étude, les neurones anorexigènes POMC pourraient être impliqués. En effet, une forte proportion de ces neurones sont gluco-excités et libèrent alpha-MSH proportionnellement aux concentrations de glucose (Parton et al., 2007). Une absence de fission lors d'une hyperglycémie dans ces neurones serait alors responsable d'une diminution de la production de mEAOs et finalement, expliquerait la perte de l'effet satiétogène du glucose et l'hyperphagie observée sur les 3 jours d'inhibition (progressive) de DRP1.

L'exploration de la fonction de la CRM mitochondriale nous a permis de mettre en évidence des modifications de la respiration dans la région cérébrale inhibée pour DRP1. Nos résultats indiquent que le défaut de production de mEAOs en réponse au glucose est associé à une diminution de la capacité de la CRM mitochondriale à oxyder les substrats (le glutamate), liée à une diminution du couplage respiratoire. En effet le calcul du quotient respiratoire (ratio entre la consommation d'O₂ stimulée par l'ADP et la consommation d'O₂ quand le complexe V est inhibé, ce ratio représentant l'activité de couplage de la CRM) est diminué. Différentes études rapportent des diminutions du couplage et de la fonction de la chaîne respiratoire lors d'altération de la dynamique mitochondriale (Benard et al., 2007; Loiseau et al., 2007; Yu et al., 2006). Ainsi, des mitochondries isolées à partir de cellules déficientes pour la protéine DRP1 présentent une inhibition de la respiration mitochondriale associée à une diminution du

couplage à la phosphorylation oxydative, suggérant une altération de la fonction de la CRM (Parone et al., 2008). En accord avec ces observations, Benard et coll. ont proposé que la délétion de DRP1 augmenterait la fluidité des membranes mitochondriales, ce qui diminuerait les contraintes sur les supercomplexes formés dans la CRM, entraînant des défauts dans l'organisation de ces complexes et le transfert des substrats (Benard et al., 2007; Benard and Rossignol, 2008).

Les mEAOs sont produites lors du transit des électrons le long de la CRM. Lors d'un apport de substrats, le taux de production de mEAOs est augmenté lorsque la respiration augmente et que le couplage mitochondrial est insuffisant (Brownlee, 2005; Yamagishi SI, 2001). Il est suggéré depuis longtemps que les mitochondries très actives sont plus condensées (plus petites et sphériques), ce qui permettrait d'obtenir une matrice très dense en électrons. Cet état favoriserait alors la probabilité de réaction des électrons avec l'oxygène, et donc augmenterait la production de mEAOs (Hackenbrock, 1966). Ainsi, la fragmentation mitochondriale induite lors d'une augmentation de la glycémie permettrait ces modifications morphologiques, lesquelles permettraient un remaniement de la structure interne des mitochondries (crêtes mitochondriales et réarrangement des associations des complexes de la CRM), favorisant la mise en place de la signalisation mEAOs (Mannella, 2006; Yoon et al., 2011).

Ces hypothèses sont en accord avec des observations faites dans d'autres études et montrant une diminution de la respiration lors de l'inhibition de la fission de mitochondries (Yu et al., 2006). Ainsi, l'activité de la CRM serait en partie dépendante de la morphologie des mitochondries, sous contrôle des acteurs de la dynamique, lesquels dépendraient aussi étroitement du statut énergétique de la cellule considérée. Dans notre étude, le glucose induirait ce changement de morphologie via la fission de DRP1 et permettrait ainsi un réarrangement de la CRM favorable une production transitoire de mEAOs. La dynamique mitochondriale représenterait donc une fonction essentielle et précoce dans la signalisation mEAOs lors de la détection hypothalamique du glucose.

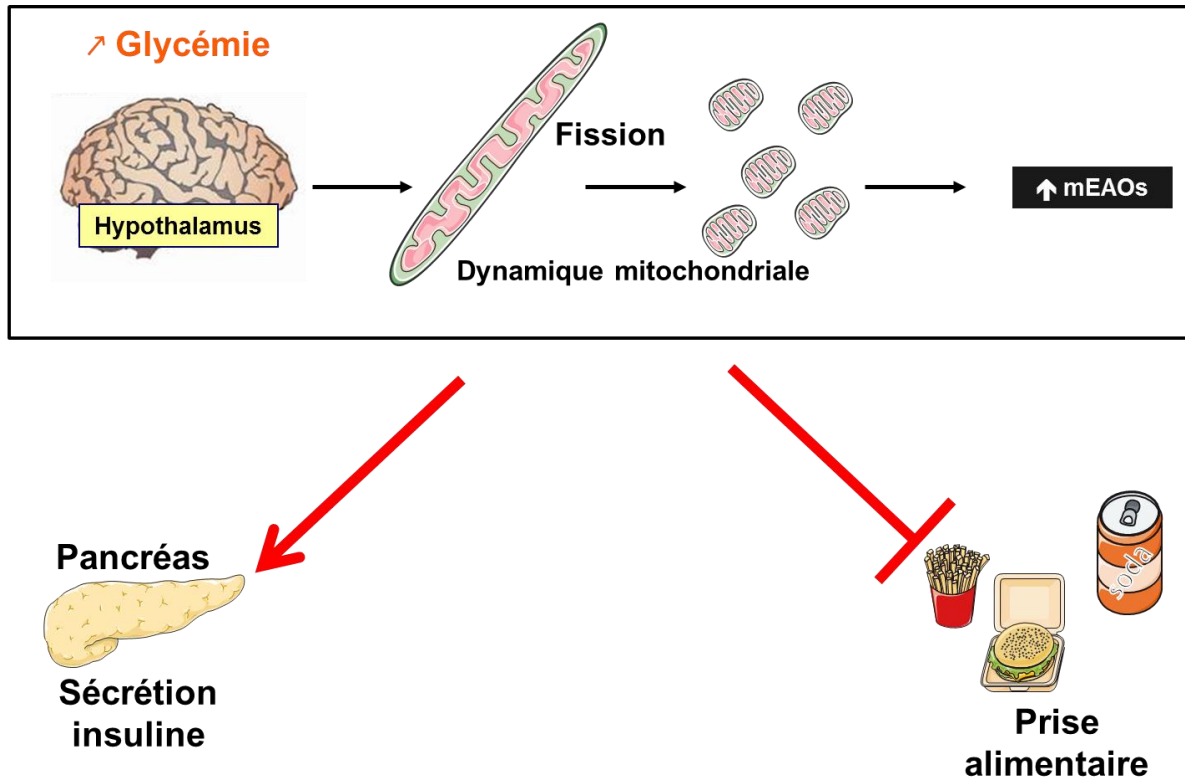


Figure 51 : Conclusion du travail.

L'ensemble de ce travail nous a permis de montrer que la détection hypothalamique du glucose faisait intervenir une fission mitochondriale dépendante de DRP1 nécessaire au déclenchement de la signalisation par les mEOs. Cette fission mitochondriale participe ainsi, d'une part au déclenchement d'une sécrétion d'insuline par le pancréas, et d'autre part, à l'effet satiétogène induit par une augmentation de la glycémie cérébrale.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans le cadre de la régulation du métabolisme énergétique par le SNC, le laboratoire a montré que les mEAOs sont requises pour la détection hypothalamique du glucose (Leloup et al., 2006). Cette notion a pu être étendue au « glucose sensing » pancréatique (Leloup et al., 2011; Leloup et al., 2009; Pi et al., 2007). Elles sont également nécessaires au contrôle de la prise alimentaire dans le cadre de la détection hypothalamique des lipides (Benani et al., 2007) et nous le montrons dans cette étude lors de la détection du glucose. D'autres auteurs ont montré le rôle de la production des mEAOs hypothalamiques en réponse à d'autres stimuli, comme la ghréline (Andrews et al., 2008).

Nous avons étudié si cette production de mEAOs en réponse au glucose impliquait la morphologie des mitochondries, laquelle est dépendante de la dynamique mitochondriale. Nous montrons chez le rat *in vivo* que l'hyperglycémie cérébrale permet de déclencher la fission des mitochondries en provoquant l'adressage de DRP1 à la mitochondrie. Le blocage de cette fission montre une perte des réponses au glucose, corrélée à une perte de la production des mEAOs.

Ce travail montre donc pour la première fois, *in vivo*, le rôle de la dynamique mitochondriale dans un mécanisme de régulation physiologique de l'homéostasie énergétique, au niveau du SNC. La détection hypothalamique du glucose nécessite une fragmentation mitochondriale nécessaire à la production de mEAOs, laquelle est indispensable à la mise en place des réponses régulatrices.

Notre travail indique que l'hyperglycémie constitue un signal de fission mitochondriale. Toutefois, la molécule signal responsable de l'adressage de DRP1 à la mitochondrie reste encore à identifier. Une étude précédente montre, *in vitro*, une fragmentation des mitochondries dans des conditions de forte concentration en glucose. Au cours de ce travail, il a également été montré que l'ensemble de ces événements était aboli si un analogue du glucose non transportable dans la cellule (L-glucose) était utilisé. En revanche, le blocage pharmacologique du transport du pyruvate dans la mitochondrie inhibe la production des mEAOs bien que la fragmentation mitochondriale soit déclenchée (Yu et al., 2006). Le signal d'adressage de DRP1 lors d'une hyperglycémie pourrait donc être un des produits de la glycolyse. L'utilisation de bloqueurs des différentes étapes de la glycolyse (hexokinase, phosphofructokinase, ...) devrait permettre d'identifier ce signal. Enfin, le mode d'action de ce signal sur la protéine DRP1, qui provoque sa relocalisation cellulaire, n'est pas connu. Les mécanismes de régulation de cette protéine sont divers (S-nitrosylation,

phosphorylation, sumoylation, interaction avec d'autres protéines...), ce qui pourrait suggérer un contrôle très fin de son action. La compréhension de ces mécanismes et de leur régulation suivant un contexte physiologique et leur dérégulation possible en contexte de pathologies métaboliques sont de nouvelles pistes de recherche, aussi bien dans le cadre de la détection hypothalamique que dans d'autres organes et tissus où la dynamique est affectée par les substrats.

Comme nous l'avons vu, la détection hypothalamique des lipides implique, elle aussi, une signalisation par les mEAOs (Benani et al., 2007). Il sera intéressant de déterminer si cette signalisation nécessite aussi une modification de la dynamique ou bien si ce mécanisme est propre au métabolisme du glucose. En effet, des travaux *in vitro* montrent une augmentation de la fragmentation mitochondriale lors de forte concentration en lipides, mais ceci uniquement quand une forte concentration en glucose est associée. Les lipides seuls n'ont pas cet effet (Molina et al., 2009; Yoon et al., 2011). Il semble donc intéressant d'identifier si une situation similaire est observée au niveau du VMH, où le glucose, comme les lipides, sont détectés. Notamment, les effets conjugués des lipides au glucose pourraient interférer sur le contrôle de la dynamique et la signalisation mEAOs et intervenir, entre autres, dans la mise en place de dysfonctionnement de la mitochondrie, comme cela est déjà connu dans sur la cellule B du pancréas (Lameloise et al., 2001). L'une des hypothèses permettant d'expliquer une production de mEAOs contrôlée par les modifications morphologiques des mitochondries concerne l'action de la dynamique sur la réorganisation des complexes de la CRM. En effet, des travaux ont permis de montrer un agencement différent des complexes de la CRM dépendant de la morphologie mitochondriale (Lenaz et al., 2010; Lenaz and Genova, 2010). Ces réarrangements en supercomplexes concernent essentiellement les complexes I et III, deux sites de production des mEAOs. La dynamique mitochondriale, en modifiant ces arrangements, pourrait faciliter ou au contraire ralentir la production de mEAOs. Il sera donc intéressant de mettre en évidence l'organisation des complexes de la CRM en réponse aux nutriments (glucose, lipides) et de déterminer s'il existe une corrélation avec l'équilibre fission/fusion des mitochondries.

Le NA de l'hypothalamus constitue une zone où est présente la majorité des neurones sensibles aux substrats énergétiques (Blouet and Schwartz, 2010; Fioramonti et al., 2007; Fioramonti et al., 2004; Karnani and Burdakov, 2011; La Fleur et al., 1999). Quel que soit le

substrat énergétique (glucose, acides gras), le type cellulaire (neurone ou astrocyte), les produits de l'oxydation mitochondriale de ces substrats permettent l'émission de signaux dont les mEAOs font partie et dont le rôle est sans doute primordial.

Un point important des perspectives que l'équipe souhaite développer est l'identification du type cellulaire qui produit les mEAOs en réponse au glucose. Si cette identification a été faite en réponse à la ghréline, cela n'a pas été montré pour les réponses au glucose. Dans l'équipe, et par d'autres auteurs, l'activation des astrocytes et leur rôle lors de la détection du glucose a été montré (Guillod-Maximin et al., 2004; Lam et al., 2005a). Dans notre étude, l'inhibition de la protéine DRP1 affecte l'ensemble des cellules du VMH. La dynamique mitochondriale se trouve donc altérée à la fois dans les astrocytes et les neurones. Le rôle de chacun des types cellulaires dans la signalisation mEAOs, et en particulier l'implication de la dynamique mitochondriale, devra être explorée. Il faudra donc déterminer ce point en imagerie pour étudier l'aspect du réseau mitochondrial des astrocytes (avec un double marquage astrocytes/mitochondrie) en réponse à une stimulation par le glucose. La même approche devra être faite pour les neurones.

Finalement, pour la population neuronale en particulier, il faudra déterminer quel est l'identité des neurones sensibles au glucose dont la dynamique mitochondriale est affectée et qui produit les mEAOs. Nos données laissent penser que la dynamique mitochondriale pourrait agir à la fois sur les neurones NPY et POMC. Ces deux populations ont de nombreux neurones sensibles au glucose : les premiers sont gluco-inhibés et les seconds, gluco-excités. Les modifications de dynamique auraient un rôle différent dans ces deux types neuronaux, dans l'hypothèse où elle pourrait affecter ces deux populations. Ainsi, une fragmentation favoriserait la production d'EAOs et permettrait l'activation des neurones POMC alors que cette même production inhiberait celle des NPY/AgRP. Des co-marquages POMC/Mitochondries et NPY/Mitochondries lors d'une hyperglycémie permettra d'identifier la présence de ces mécanismes dans ces deux types neuronaux.

Il est aussi possible d'imaginer aux vues des connaissances actuelles que d'autres mécanismes soient affectés. Il a notamment été montré un remodelage des connections synaptiques entre les neurones NPY et POMC suivant le statut énergétique (Pinto et al., 2004). Or, les mécanismes de la dynamique mitochondriale, sont eux aussi impliqués dans la synaptogénèse (Chang and Reynolds, 2006). En effet, classiquement, la fission favorise la formation de synapse en facilitant la migration des mitochondries vers les extrémités

axonales, et permettent l'apport d'énergie nécessaire à la mise en place des synapses, puis à leur fonctionnalité, alors que la fusion l'inhibe en ralentissant la migration des mitochondries. Le blocage de la fission pourrait donc avoir pour conséquence de bloquer ces processus de plasticité synaptique et de déséquilibrer le tonus orexigène et/ou anorexigène entre ces populations.

De plus amples recherches seront donc nécessaires pour discerner le rôle précis de la dynamique mitochondriale dans les réponses intégrées que nous avons identifiées.

Dans notre modèle d'invalidation partielle et transitoire de DRP1 dans le VMH, nos animaux présentent un phénotype métabolique qui commence à être altéré (une prise alimentaire augmentée sans prise de poids à 3 jours, une modification hypothalamique de la signalisation mEAOs en condition stimulée par le glucose). La compréhension du rôle de la dynamique mitochondriale en réalisant une invalidation de Drp1 de plus long terme permettrait de mieux déterminer le rôle de la dynamique mitochondriale dans ce contrôle, mais aussi dans le développement de pathologies métaboliques. Enfin, la caractérisation de la dynamique mitochondriale et de la signalisation mEAOs dans un modèle où l'hyperphagie (conduisant à l'obésité) est induite par un régime permettrait de déterminer la part de la dynamique mitochondriale dans l'établissement des dérégulations de la PA.

ARTICLES

L'ensemble de mon travail de thèse fait l'objet d'une publication en cours de soumission. De plus, j'ai pu participer à d'autres travaux de l'équipe ayant donné lieu à 3 articles et 1 revue.

PUBLICATION 1

La publication 1 rassemble les résultats obtenus au cours de mon doctorat sur le rôle de la dynamique mitochondriale dans la détection hypothalamique du glucose. Une partie des résultats présentés dans ce manuscrit ont ainsi permis de soumettre ce travail dans le journal *Antioxydant and Redox Signaling*. Cette publication représente donc la plus grande partie de mon travail de thèse effectué au sein du laboratoire.

Importance of Dynamin Related Protein 1 (DRP1)-dependent mitochondrial fission in hypothalamic glucose sensitivity in rats

Running title: mitochondrial Drp1 in hypothalamic glucose sensing

Lionel Carneiro¹, Camille Allard¹, Christophe Guissard², Xavier Fioramonti¹, Cécile Tourrel-Cuzin³, Danielle Bailbé³, Corinne Barreau², Géraldine Offer², Emmanuelle Nédelec¹, Pascale Belenguer², Luc Pénicaud¹ and Corinne Leloup^{1*}

¹Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation (CSGA), UMR 6265 CNRS, UMR 1324 INRA, Université de Bourgogne, F-21000 Dijon, France

²Université de Toulouse, UPS and CNRS UMR 5241, Laboratoire Métabolisme Plasticité Mitochondries, F-31000, France

³Laboratoire de Biologie et Pathologie du Pancréas Endocrine, Unité Biologie Fonctionnelle et Adaptative, Université Paris Diderot, CNRS EAC 4413, Paris, France

*Correspondence: Leloup Corinne, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation (CSGA), UMR 6265 CNRS, UMR 1324 INRA, Université de Bourgogne, F-21000 Dijon, France, leloup@cict.fr, tel 33 380 681 665, fax 33 380 681 601

ABSTRACT

OBJECTIVE: Hypothalamic mitochondrial reactive oxygen species (mROS)-mediated signaling has been recently shown to be involved in the regulation of energy homeostasis. However, the upstream signals that control this mechanism have not yet been determined. Here, we hypothesized that glucose induced mitochondrial fission plays a significant role in mROS-dependent hypothalamic glucose sensing.

RESEARCH DESIGN AND METHODS: Glucose triggered translocation of fission protein DRP1 to mitochondria was firstly investigated *in vivo* in hypothalamus. Then, expression was transiently knocked down by intra-arcuate nucleus (ARC) DRP1 siRNA (siDRP1) injection. 72h post siRNA injection, mitochondrial morphology was assessed and some phenotypic parameters measured. Brain intracarotid glucose induced insulin secretion and ARC glucose infusion-induced refeeding decrease were measured, as well as mROS production. Mitochondrial function was evaluated by oxygen consumption measurements after DRP1 knock down.

RESULTS: We show that intracarotid glucose injection induces the recruitment of DRP1 to VMH mitochondria *in vivo* and changes mitochondrial morphology. SiDRP1 rats presented more elongated mitochondria in accordance with increased fusion. The SiDRP1 rats decreased mROS and impaired intracarotid glucose injection-induced insulin secretion. In addition, the ARC glucose infusion-induced refeeding decrease was lost in siDRP1 rats. Furthermore, food intake was increased 72 h after ARC siDRP1 infusion, without weight modification. Although hypothalamic mitochondrial respiration was not modified in the resting state, substrate-driven respiration was impaired in siDRP1 rats and associated with an alteration of the coupling mechanism.

CONCLUSIONS: Collectively, our results suggest that glucose-induced DRP1-dependent mitochondrial fission is an upstream regulator for mROS signaling and consequently, a key mechanism in hypothalamic glucose sensing and energy balance regulation.

INTRODUCTION

The hypothalamus and more particularly the arcuate nucleus (ARC) plays a key role in energy homeostasis (1-4). In addition to fueling role of glucose, it also monitors physiological functions, such as food intake and insulin secretion, through modulation of glucose-sensitive neuron activity (5, 6). Analogies between mechanisms involved in hypothalamic glucose-responsive neurons and the pancreatic β -cells have been highlighted (6-9). Recently, several studies have indicated that mitochondrial reactive oxygen species (mROS) are required for the hypothalamic glucose-sensing mechanism. Increased brain glucose level increases hypothalamic mROS, and inhibition of hypothalamic mROS impairs increased brain glucose-induced insulin secretion (10-12). Interestingly, the mROS regulatory pathway might also be involved in lipid sensing in the same area of the brain (13) and in glucose sensing in pancreatic β -cells (14). Altogether, these studies suggest that mROS are important physiological messengers in metabolite-sensitive cells. Respiratory studies have helped to define a better understanding of how mROS vary upon different metabolic/hormonal states according to metabolic status and why they constitute an integrative signal (10-15).

Mitochondria are dynamic organelles that continually change form. Different sets of proteins control mitochondria dynamics through fission and fusion mechanisms (16). Fusion mechanisms are under control of Optic Atrophy 1 (OPA1) and Mitofusins (MFNs). The fission machinery involves Fission Protein 1 (FIS1) and Dynamin-Related Protein 1 (DRP1). DRP1, which is mainly cytoplasmic under basal conditions, translocates to the mitochondrial membrane where it forms a contractile "ring" involved in the division of the mitochondria. Mitochondrial fusion and fission are on a tightly regulated equilibrium to maintain mitochondrial morphology in the cell and are critical for cell function (17).

Mitochondrial morphology is associated with mROS production and energy status. Nutrients and hormones can alter mitochondria morphology (18, 19). For instance, a recent study showed the involvement of mitochondrial dynamics in high glucose-induced ROS production (20). Acute exposure of hepatic and muscular cell lines to high glucose concentrations induced a rapid and transient mitochondrial fission associated with an increase in ROS levels, whereas inhibiting mitochondrial fission was shown to restore high glucose-induced ROS levels. Thus, morphological changes of mitochondria appeared to be an upstream causal factor for ROS production under acute hyperglycemic stimulation, suggesting that mitochondrial dynamics act as a regulating factor of mitochondrial activity.

The aim of this study was to determine whether mitochondrial dynamics could constitute an upstream actor in hypothalamic mROS production and consequently play a role in hypothalamic glucose sensing. We hypothesized that mitochondrial fragmentation occurs in VMH in response to a transient cerebral hyperglycemia and that this process is necessary for the mROS-induced physiological responses.

RESEARCH AND METHODS

Animals: Diet and Experimental Procedures.

Male Wistar rats (7 weeks old; Charles River) were individually housed in a controlled environment (12h light/dark cycle, light on at 7:00a.m., 22°C), with *ad libitum* access to food and water. Surgeries and experiments were performed under pentobarbital anesthesia (50mg/kg, Centravet, France) except when noted. All procedures involving rats followed the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and were approved by a local committee. All experiments were performed after 4h fasting, excepted when noted. Body weight and food intake were measured every day, 3h after the beginning of the light cycle.

Cannula implantation and siRNA injection.

In anesthetized animals, intracerebral double guide stainless-steel cannulae (26-gauge (Plastics One) were inserted bilaterally into the ARC according to stereotaxic coordinates (anterior-posterior: -3.14mm vs. bregma; medial-lateral: 0.25mm; dorsal-ventral: 9.4mm). Cannulae location was confirmed by bromophenol blue injection after experimentation. The animals were allowed to recover for 6 days and were handled daily. On the day of the experiment, a double-stranded 21-nucleotide small interfering RNA (siRNA) obtained from GeneCust was transduced using the JetSI system (OZYME) ((21) and injected (100pM, 10µl at 0.67µl/min) through the cannula guide to knockdown the expression of DRP1. The siRNA sequence efficiently targeting rat DRP1 (Accession N° BC085843) corresponds to the coding region 258-278 relative to the first nucleotide of the start codon (siRNA, sense strand: 5'-AACUCAGAGCAGUGGAAAGAG-UdTdT-3'). Knockdown of DRP1 in the VMH was measured 24h, 48h, 72h and 96h post-injection.

Intracarotid (i.c.) injection of glucose towards the brain.

Experiments were performed as previously described (10). Plasma insulin level was determined using the ultrasensitive ELISA kit (Eurobio).

Mitochondrial isolation.

After euthanasia by cervical dislocation, brains were quickly removed and immediately immersed in ice-cold MB+ buffer (10mM HEPES, 210mM mannitol, 1mM DTT, 240mM sucrose, protease inhibitor cocktail tablet (Roche). Hypothalami or other brain areas were dissected, immersed for 15min in MB+ buffer and homogenized with a dounce homogenizer (7.5µl/10mg tissue). Homogenates were resuspended in 125µl/10mg tissue of MB+ buffer and centrifuged (1,000g, 10min, 4°C). Supernatants were centrifuged (12,000g, 10min, 4°C). The remaining mitochondrial pellet was resuspended for western blot analysis.

ROS level measurement.

One minute after the carotid or ARC glucose injection, rats were decapitated, hypothalamus, thalamus and cortex were harvested and frozen and stored at -80°C. ROS were assessed as previously described (11).

Western blot.

Proteins were separated on 10% SDS-PAGE. Antibodies against OXPHOS, Actin, DRP1, OPA1, FIS1 or MFN2 were used. After transfer and blocking, membranes were probed in 1% nonfat milk prepared in TBS-T with 1/1,000 mouse anti-OXPHOS (Mitosciences, Euromedex), 1/100,000 mouse anti-Actin (Millipore), 1/10,000 mouse anti-DRP1 (BD Biosciences), 1/500 mouse anti-OPA1 (BD Biosciences Europe), 1/500 rabbit anti-FIS1 (Biovision) or 1/500 mouse anti-MFN2 (Abnova) overnight at 4°C. Specific bands of the proteins were detected using a goat anti-mouse (1/10,000 in TBST-1X) or anti-rabbit (1/10,000 in TBST-1X) peroxidase-conjugated secondary antibody (Amersham) incubated for 1h at room temperature, were revealed with a chemiluminescence kit (Amersham) and were exposed to a ChemiDoc XRS+ system (BioRad) for densitometry analysis.

O₂ consumption measurement on permeabilized VMH

Oxygen consumption was measured using a respirometer (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments) as previously described (11, 22). Mitochondrial respiration was stimulated by the addition of 10mM glutamate to achieve the state 2. Next, 1mM ADP was added to achieve the state 3 respiration. Then, 0.5µM carboxyatractylate (CAtr) was added to block ATP synthesis and achieve the state 4 respiration. Finally, 0.4µM CCCP, a chemical uncoupler, was used to measure the maximal respiration.

Refeeding test in response to ARC glucose injection

After overnight fasting, glucose (0.12M in 0.9% saline) was injected into the ARC (1µl at 1µl/min). Food consumption was measured 15, 30, 45, 60, 90, 120 and 240min post-injection. For ROS measurements, brains were removed 1min after glucose injection as described above.

RNA extraction, reverse transcription and quantitative real-time PCR.

cDNA were synthesized from total VMH RNA and amplified by PCR with NPY POMC, UCP1, UCP2 or 18S primers using the StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) (primer sequences: NPY forward 5'-3':CAC-AGA-AAA-TGC-CCC-CAG-AA, reverse 5'-3':GTC-AGG-AGA-GCA-AGT-TTC-ATT-TCC; POMC forward 5'-3':CTC-ACC-ACG-GAA-AGC-AAC-CT, reverse 5'-3':TTC-AGT-CAA-GGG-CTG-TTC-ATC-TC; UCP1 forward 5'-3':GTC-TTA-GGG-ACC-ATC-ACC-A, reverse 5'-3':CCA-GTG-TAG-CGG-GGT-TTG (23); UCP2 forward 5'-3':GGC-GGT-GGT-CGG-AGA-TA, reverse 5'-3':GGC-AGA-AGT-GAA-GTG-GCA-AGG-G(24); 18S forward 5'-3':CCA-TTC-GAA-CGT-CTG-CCC-TAT, reverse 5'-3':GTC-ACC-CGT-CAC-CAT-G (24)).

Islet treatments and insulin measurement.

Islets isolation and preincubation period were performed as previously described Groups of (14, 25). Over the preincubation period, islets were incubated in the different glucose concentrations (5.5mM or 16.7mM) for 30min at 37°C. The acetylcholine receptor agonist acetyl-methylcholine bromide (Sigma, 0.1mM) was assessed in 5.5mM glucose. Incubation medium was harvested and stored at -20°C before insulin measurement. The release of insulin by the islets was measured using a radioimmunoassay kit (Cis-Bio International).

Immunohistochemistry.

After either cerebral hyperglycaemia or 72h after ARC siRNA injection, brain were quickly frozen in isopentane, -40°C. 10 µm hypothalamic cryosections were fixed, then permeabilized for 10min and blocked in PBS/0.5% Tween20/3% normal goat serum (NGS Mitosciences) (38). After incubation with mouse anti-OXPHOS (1/2000 in PBS/0.5% Tween 20/3% NGS, Mitosciences) overnight at 4°C and washing, sections were incubated in goat anti-mouse alexa 488 (1/4000 in PBS/0.5% Tween20) for 1h. Sections were mounted and examined under a confocal or Apotome fluorescence microscope (Leica or Zeiss, respectively). Specificity of labeling was ascertained with omission of primary antibody. Mitochondrial morphology analysis was performed by computer-assisted morphometric analyses (ImageJ) that calculate form factor (FF) and aspect ratio (AR). Both parameters have a minimal value of 1, which represents a perfect circle, and the values increased as mitochondria elongate (25).

Hepatic glycogen measurement.

Homogenised livers (0.2g) in 2ml ice-cold citrate buffer (100mM citric acid, 50mM NaF, pH=4.2) were centrifuged (10min, 5,000g at 4°C). Glycogen was estimated in the supernatant after hydrolysis of glycogen into glucose by amylo- α -1.4- α -1.6-glucosidase (Sigma).

Statistical analysis.

Results are presented as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using Prism 4.0. Normality has been tested with Kolmogorov-Smirnov test. According to the result, unpaired t-test or Mann Whitney test (when normality was not assumed), one way ANOVA or two-way ANOVA analysis (followed by Bonferroni post test) were performed as detailed in figure legend). Differences are symbolized as *, ** or *** on graphic representations for p values of <0.05, 0.01 and 0.001, respectively.

RESULTS

Transient hypothalamic glucose increase triggers the recruitment of DRP1 to the mitochondrial membranes

Under basal conditions, most of the cellular DRP1 is located in the cytosol. Fusion is induced when DRP1 is addressed to the mitochondrial membrane (26). We evaluated VMH DRP1 cellular localization in response to an intracarotid glucose bolus injection (9mg/kg). Intracarotid glucose injection toward the brain significantly increased DRP1 level (263% of controls), in VMH mitochondria extract one minute post-injection. No significant modification of increased mitochondrial DRP1 was detected in the cortex and thalamus (data not shown). In addition, the non metabolizable glucose analog L-glucose did not increase mitochondrial DRP1 (**Fig.1A**). These data suggest that DRP1 is rapidly addressed to the mitochondria in response to increased extracellular VMH glucose. The quantification of the mitochondrial shapes in response to intracarotid glucose injection confirmed that increased glucose level triggers ARC mitochondrial fission. Both the mitochondrial aspect ratio (AR) and form factor (FF) was significantly diminished under cerebral hyperglycemia. By opposition, the number of mitochondria per cell was increased (**Figure 1B and Table 1**).

DRP1 down-regulation inhibits mitochondrial fission *in vivo*

Down-regulation of DRP1 by RNA interference was used to investigate its role in hypothalamic glucose sensing. Therefore, siRNAs directed against DRP1 or siRNA controls were injected into the ARC, and DRP1 levels estimated by western blot in whole VMH. DRP1 extinction reached 28.9±5.8%, 35.1±9.9%, 76.6±2.5% and 40.7±23.3% at 24, 48, 72 and 96h post-injection, respectively (**Fig.2A**). No modification in DRP1 expression was observed in the cortex, thalamus, brainstem and LH 72h post-injection (**Fig.2B**). No modification in other proteins expression involved in mitochondrial dynamics was found, showing that only DRP1 expression was affected (**Fig.2C**). Because the greatest decrease in DRP1 levels occurred 72h post-injection, we chose this time to evaluate the impact of VMH DRP1 siRNA on glucose sensing. The impact of DRP1 siRNA injection on mitochondrial morphology was evaluated by confocal imaging. Mitochondria of siControl-injected animals (siControl group) appeared as small and numerous dots, while siRNA DRP1 injected-animals (siDRP1 group) showed longer and more filamentous mitochondria (**Fig.2D**). Mitochondria morphological analysis showed that both the form factor (FF) and the aspect ratio (AR) is increased in SiDRP1 animals, confirming that fission inhibition occurred. As a consequence, the average of mitochondria per cell was decreased in siDRP1 animals (Table 2). Thus, DRP1 down-regulation led to the inhibition of mitochondrial fission leading to an imbalance in favor of fusion.

DRP1 down-regulation in VMH increases food intake without increasing body weight

To evaluate the effect of VMH DRP1 inhibition on homeostatic parameters, we first measured the daily food intake and weight. Both groups showed a similar food intake before siRNA injection. 24h post-siRNA injection, decreased food intake was observed in both groups (siControl:0.038±0.007g/g of body weight (BW); siDRP1:0.051±0.006g/g). Food ingestion was progressively restored at 48h (siControl:0.046±0.004g/g BW; siDRP1 0.059±0.005g/g BW) and reached its initial level at 72h for both groups (siControl:0.068±0.003 g/g BW; siDRP1:0.081±0.002g/g). However, siDRP1 animals systematically exhibited a significant higher food intake than siControl rats at 24, 48 and 72h post-injection. Body weight was not affected by siRNA injection in both groups (**Fig.3A, 3B**). Surprisingly, neither neuropeptide Y (NPY) nor pro-opiomelanocortin (POMC) mRNA levels were modified in siDRP1-treated animals (**Fig.3C, 3D**). Because siDRP1-treated rats did not gain weight despite of their increased food intake, we investigated their thermoregulatory capacity. The marker of thermogenic activation uncoupling protein 1 (UCP1) mRNA levels was measured in the interscapular brown adipose tissue (iBAT). iBAT UCP1 mRNA was

increased in siDRP1 animals (Relative Quantification (RQ) of 1.46 ± 0.09 for siDRP1 vs. 1.0 ± 0.06 for siControls) (Fig.3E). We further estimated hepatic glycogen content and found that hepatic glycogen content was decreased in siDRP1-treated rats (siDRP1: $6.2 \pm 1.5 \mu\text{g}$ glycogen/mg liver; siControls: $11.4 \pm 0.9 \mu\text{g}$ /mg liver) (Fig.3F). Neither basal glycemia nor insulinemia were changed in siDRP1-treated animals (Fig.3G, 3H).

Down-regulation of DRP1 in VMH decreases glucose sensitivity due to the loss of mROS signaling and impacts both insulin secretion and the satiating effect

To decipher the role of DRP1 in VMH glucose sensing, we evaluated the consequences of its down-regulation in the detection of an increased glucose concentration through two different tests. The first test involved the hypothalamic pancreatic axis and the parasympathetic control of insulin secretion. The second test allowed the measurement of the satiating effect of glucose on fasted rats with a refeeding test. The role of DRP1 inhibition was first determined in response to intracarotid glucose injection-induced insulin secretion (10). Intracarotid glucose injections had no effect on peripheral blood glucose level in both control and siDRP1 groups (Fig.4A). However, intracarotid glucose injection-induced insulin secretion was significantly inhibited in siDRP1-treated rats (for siControls, delta insulin level $103.2 \pm 20.4 \text{mU/L}$; siDRP1 = $37.8 \pm 7.2 \text{mU/L}$) (Fig.4B). In addition, impaired insulin secretion was accompanied with a complete inhibition of mROS production induced by a glucose load (siControl+NaCl: $17033 \pm 3540 \text{AU}$; siControl+Glucose: $37797 \pm 6211 \text{AU}$; siDRP1+NaCl: $13139 \pm 1469 \text{AU}$; siDRP1+Glucose: $18156 \pm 1974 \text{AU}$) (Fig.4C). No difference was found in other brain regions such as the cortex (Fig.4D) or thalamus (Fig.4E). To assume that decreased insulin secretion was not the consequence of impaired pancreatic β -cell function, *ex vivo* glucose-induced insulin secretion was evaluated in islets of siControl and siDRP1-injected animals. Islets of siDRP1-treated rats had a similar basal insulin secretion (in 5.5mM glucose) to siControl islets, and they did not show any impairment in pancreatic insulin secretion in response to 16.7mM glucose (siControl: $6.67 \pm 0.17 \text{ng/ml/10islets}$, siDRP1: $7.15 \pm 0.22 \text{ng/ml/10islets}$) (Fig.4F). Because intracarotid glucose injection-induced insulin secretion involves the activation of parasympathetic nerves (27-29), we evaluated the islets' sensitivity to a cholinergic agonist. Islets were stimulated with a muscarinic cholinergic receptor agonist (acetyl-methylcholine bromide) or 16.7mM glucose. SiDRP1 animals showed increased insulin secretion in response to the acetyl-methylcholine bromide (siControls: $3.84 \pm 0.10 \text{ng/ml/10islets}$; siDRP1: $4.54 \pm 0.21 \text{ng/ml/10islets}$) (Fig.4G).

We next evaluated the effect of siDRP1 treatment on ARC glucose infusion-induced decrease in food intake after refeeding. In control animals, ARC glucose infusion attenuated increased food intake after refeeding following an overnight fast (NaCl group: $0.028 \pm 0.002 \text{g/g BW}$; and glucose group: $0.017 \pm 0.002 \text{g/g BW}$ at the end of the test) (Fig.5A). SiDRP1 animals showed a significant reduction in food intake inhibition during 4h of refeeding while food ingestion during 4h of refeeding in response to NaCl ARC infusion was similar in siDRP1-treated animals (siControl+glucose: $0.013 \pm 0.002 \text{g/g BW}$; siDRP1+glucose: $0.024 \pm 0.002 \text{g/g BW}$; siControl+NaCl : $0.026 \pm 0.002 \text{g/g BW}$; siDRP1+NaCl: $0.023 \pm 0.001 \text{g/g BW}$) (Fig.5C, 5D). No difference in either VMH NPY or POMC mRNA levels was detected between siDRP1 and siControl rats (data not shown). As for intracarotid glucose-induced insulin secretion, we examined if decreased food intake induced by ARC glucose infusion involved impaired VMH ROS production in siDRP1 rats. In control animals, ARC glucose infusion increased mROS production threefold the level of controls (siControl+NaCl: $1362 \pm 117 \text{AU}$; siControl+Glucose: $3800 \pm 864 \text{AU}$) (Fig.5C). However, mROS production was not increased in siDRP1-treated rats (siDRP1+NaCl: $1234 \pm 204 \text{AU}$; siDRP1+Glucose: $1291 \pm 119 \text{AU}$) (Fig. 5E). These results suggest that the satiating effect of ARC glucose infusion is dependent on mROS production through mitochondrial DRP1-dependent fission.

Ventromedial hypothalamic mitochondrial respiration of DRP1-inhibited rats exhibits a decreased activity in response to substrates

To explore the VMH mitochondrial function, oxygen consumption was analyzed on permeabilized hypothalamic tissue. Basal respiratory activity was similar between siControl and siDRP1 VMH mitochondria (**Fig.6A**). Substrate-driven respiration determined by glutamate stimulation was significantly decreased in siDRP1 rats (siControls:126.3±2.6% of basal consumption; siDRP1:148.0±5.9%) (**Fig.6B**). State 3 (substrate/ADP-driven) respiration was assessed with saturating ADP concentration (**Fig.6C**). In these conditions, the O₂ flux was decreased in siDRP1 rats (siControls:283.83±20.49% of basal O₂ flux; siDRP1:209.45±24.22%), showing a decrease of complex V activity. Carboxyatractyloside (CAtr), an ATP-ADP exchange inhibitor, was then added to obtain the ADP-independent resting state 4. Respiratory inhibition was significantly attenuated in siDRP1 rats (siControl:-89.72±14.15%; siDRP1:-31.62±14.26%) (**Fig.6D**), confirming a lower activity of Complex V, which resulted in an identical O₂ consumption in both groups after CAtr stimulation (siControls:194.11±11.14% of basal O₂ consumption; siDRP1:177.83±11.9%) (**Fig.6E**). Finally, the calculated Respiratory Control Ratio (RCR, which represents the ratio of state 3/state 4) was significantly decreased in siDRP1 rats (siControls:1.46±0.07; siDRP1:1.16±0.07) (**Fig.6F**), indicating a loss of coupling in mitochondria. The maximal respiratory capacity induced by carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) was not different between siControl and siDRP1 rats (siControl:239.79±15.75% of basal O₂ consumption; siDRP1:225.71±31.49%) (**Fig.6G**). To assess the role of mitochondrial uncoupling proteins (UCPs) on the respiratory modification, we quantified the mRNA level of uncoupling protein 2 (UCP2), which is the major rodent hypothalamus UCP2(30) and did not find any difference between groups (**Fig.6H**). These results reveal that siDRP1 rats present the following: 1) a decreased mitochondria respiratory capacity, 2) a decreased coupling respiration, which does not involve a modification of UCP2 mRNA content and 3) a decreased capacity of substrate-driven respiration.

DISCUSSION

We recently highlighted that the hypothalamic glucose-sensing mechanism requires mROS production to trigger both electrical ARC activation and insulin secretion (10). Moreover, this signaling is altered in the Zucker obese, insulin-resistant rat model (11). Here, we show for the first time the importance of mitochondrial dynamics in glucose-induced hypothalamic mROS production and energy metabolism regulation. We found the following: (1) DRP1-dependent mitochondrial fission is activated by increased central glucose; (2) VMH DRP1 down-regulation blocks glucose-induced mROS signaling as well as central glucose-induced insulin secretion and central glucose-induced food intake decrease; and (3) decreased glucose-induced mROS signaling is consistently associated with altered mitochondrial respiratory activity.

The fission process is mainly dependent on DRP1, a cytoplasmic protein addressed to the mitochondrial membrane under various stimuli (31). Here, we show that increased glucose level rapidly (1 min) promotes DRP1 translocation from the cytosol to the mitochondria in the VMH *in vivo*. The ability of glucose to induce *in vivo* DRP1 translocation to the mitochondria is consistent with previous work showing that mitochondrial fragmentation in high glucose conditions requires mitochondrial fission machinery in cell culture (20, 31, 33). Our results

suggest that the mitochondrial fission mechanism may be an upstream actor in glucose-induced mROS signaling in the hypothalamus, thereby promoting the effects of glucose *in vivo* (10, 11).

To explore this mechanism, a down-regulation of DRP1 in the VMH was performed by RNA interference. Using this strategy, we determined a maximal extinction (80%) of DRP1 expression 3 days after injection. At this time, there was no compensation through the other main mitochondrial dynamics actors (OPA1, MFN2 and FIS1). As a consequence, VMH mitochondrial morphology was changed. Mitochondria appeared much more elongated, confirming that the siRNA method had created an imbalance in favor of fusion (26, 34-36). In this context, we found that VMH DRP1 inhibition induced a strong hyperphagia. However, mRNA levels of POMC and NPY, VMH-expressed genes classically associated with the control of food intake, were not affected by the manipulation of DRP1. These discrepancies have already been described and suggest that the release of neuropeptides rather than their transcription was altered (36, 37). Furthermore, the strong increase in food intake did not affect the body weight, suggesting that energy expenditure was increased. In support of this, we found that UCP1 mRNA level, a strong indicator of thermogenic activation, was increased in the iBAT (38, 39). We also found decreased liver glycogen content in siDRP1-treated animals. This result is consistent with previous work showing that decreased hepatic glycogen content is related to increased energy expenditure (40, 41). Human obesity and type II diabetes, which are classically associated with alterations in energy expenditure, exhibit dysfunctions of mitochondrial dynamics in various tissues, such as muscles (42, 43). Mitochondrial dynamics in skeletal muscle from obese or nonobese type 2 diabetic subjects is regulated by body weight loss, and a strong negative correlation between mitochondrial fusion and their body mass index exists. These studies support that mitochondrial morphology regulation depends on energy status. Further complementary approaches to manipulate DRP1 expression or mitochondrial networks (for instance overexpression of the dominant-negative DLP1-K38A or overexpression of fusion actors (20)) will reinforce this conclusion.

We then explored the impact of VMH DRP1 inhibition on the hypothalamic glucose-sensing mechanism. We previously showed that an intracarotid injection of a glucose load that does not alter peripheral blood glucose level induces a transient insulin secretion. In addition, we also showed that this intracarotid glucose load-induced insulin secretion is VMH mROS production-dependent (10). In this study, there was no increased mROS production in siDRP1-treated animals 1min post-glucose injection. This result suggests that the mitochondrial DRP1-dependent fission is an early and rapid event preceding mROS production. This suggestion is consistent with a study by Yu et al. (20) and previous studies on mitochondrial fission showing the ability of mitochondria to rapidly split and re-fuse (44).

As previously described, we found that intracarotid glucose injection-induced insulin secretion was altered in ARC siDRP1-treated rats. This result could be the consequence of altered β -cell function. To gain further insight into the control of insulin secretion in transient DRP1-deficient rats, their freshly isolated islets were compared to control ones for both their intrinsic response to glucose and to a classical muscarinic receptor agonist. This approach is used as a marker of parasympathetic control, as previously described (45, 46). Regarding islet response to high glucose, there was a normal response of the VMH DRP1-deficient rats, showing that direct glucose stimulation was not altered. However, the muscarinic islet activation through a cholinergic agonist triggered a hyper response. This response reflects an increased sensitivity of the muscarinic receptor and is classically observed when parasympathetic tone decreases, enhancing either the activity and/or the number of receptors

on the islets (45, 46). We can conclude that parasympathetic activity was decreased. Indeed, the *in vivo* response of the islets to a central glucose load showed a drastic drop of insulin release, which is explained by this down-regulated parasympathetic tone.

The satiating role of glucose in DRP1-deficient animals was completely abolished. This effect was concomitant with an absence of VMH mROS production. In at least two key populations of arcuate neurons, NPY/AgRP and POMC neurons, opposite effects of mROS (inhibitory vs. stimulatory, respectively) have been described (15, 47). Here it suggests that anorexigenic POMC neurons are no more activated by mROS. Together with the defective response to central glucose-induced insulin secretion, these results reinforce the role of fission in hypothalamic glucose-induced mROS signaling as well as a role in hypothalamic glucose sensing. We speculate that the alteration of ARC glucose sensitivity in DRP1-treated rats is the cause of the hyperphagia we observed in those animals. Finally, the exploration of mitochondrial respiration highlighted changes induced by DRP1 down-expression in the VMH. The results demonstrate that the loss of mROS production in response to glucose load is due to decreased capacity of the mitochondrial electron transfer chain (ETC) to oxidize the substrates, associated with decreased coupled respiration. Indeed, the RCR (ratio between O₂ flux of ADP-stimulated respiration to ATP synthase-inhibited respiration, which represents the coupling activity of the ETC) was decreased. These observations are consistent with others showing modifications of coupling activity when mitochondrial dynamics are altered (17, 20). ROS are produced by electron leakage during mitochondrial metabolism. The rate of ROS formation is enhanced as mitochondrial metabolism increases when mitochondria are well coupled (48, 49). Classical observations indicate that active mitochondria are more condensed and have an electron dense matrix, which favors mROS production (50). This suggests that physiological mitochondrial fragmentation upon glucose increase triggers contracted and condensed mitochondria. Dynamic changes of the internal structure (mitochondrial cristae and the complexes' arrangement) are tightly associated with functional respiration (19, 51). These explanations are consistent with previous observations describing decreased glucose oxidation associated with mitochondrial dynamics disruption in peripheral tissues of obese patients (42, 43). These mitochondrial metabolically-regulated dynamics and the mROS signaling it triggers appear to be an essential upstream actor of glucose sensing in the hypothalamus.

Collectively, this work demonstrates for the first time *in vivo* that DRP1-dependent mitochondrial fission is essential for glucose-induced mROS signaling in hypothalamic glucose sensing. Further investigations to determine which metabolic or hormonal factors trigger changes in mitochondrial dynamics and mROS production will help us to better understand the mechanisms involved in the central control of energy homeostasis.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

L.C. and C.L. designed and performed the experiments, interpreted data and wrote the manuscript. C.T-C. and D.B. performed pancreatic islets experiments, C.A., L.C. and C.B. carried out histochemistry and pictures analysis. X.F., C.G. and G.O. helped on *in vivo* experiments. L.C. and E.N. performed RT- qPCR. P.B. and L.P. contributed to discussion and reviewed the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

L. C. has a fellowship from the Ministère de la Recherche et de la Technologie. C. L., L. P. and P. B. have a grant from Agence Nationale de la Recherche (ANR-06-PHYSIO-Oox, "MetaDisMitoDyn"), and C. L. has a grant from Alfediam (Prize Merck-Lipha 2009). We are indebted to A. Lefranc (Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation (CSGA), UMR

6265 CNRS, UMR 1324 INRA, Université de Bourgogne, F-21000 Dijon, France) for assistance with the rats.

REFERENCES

1. Oomura Y, Ono T, Ooyama H, Wayner MJ. Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. *Nature* 1969;222(5190):282-4.
2. Song Z, Levin BE, McArdle JJ, Bakhos N, Routh VH. Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes* 2001;50(12):2673-81.
3. Penicaud L, Leloup C, Fioramonti X, Lorsignol A, Benani A. Brain glucose sensing: a subtle mechanism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006;9(4):458-62.
4. Blouet C, Schwartz GJ. Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behav Brain Res* 2010;209(1):1-12.
5. Karnani MM BD. Multiple hypothalamic circuits sense and regulate glucose levels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300:R47-55
6. Jordan SD, Konner AC, Bruning JC. Sensing the fuels: glucose and lipid signaling in the CNS controlling energy homeostasis. *Cell Mol Life Sci* 2010;67(19):3255-73.
7. Leloup C, Arluison M, Lepetit N, Cartier N, Marfaing-Jallat P, Ferre P, et al. Glucose transporter 2 (GLUT 2): expression in specific brain nuclei. *Brain Res* 1994;638(1-2):221-6.
8. Leloup C, Orosco M, Serradas P, Nicolaidis S, Penicaud L. Specific inhibition of GLUT2 in arcuate nucleus by antisense oligonucleotides suppresses nervous control of insulin secretion. *Brain Res Mol Brain Res* 1998;57(2):275-80.
9. Yang XJ, Kow LM, Funabashi T, Mobbs CV. Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms. *Diabetes* 1999;48(9):1763-72.
10. Leloup C, Magnan C, Benani A, Bonnet E, Alquier T, Offer G, et al. Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing. *Diabetes* 2006;55(7):2084-90.
11. Colombani AL, Carneiro L, Benani A, Galinier A, Jaillard T, Duparc T, et al. Enhanced hypothalamic glucose sensing in obesity: alteration of redox signaling. *Diabetes* 2009;58(10):2189-97.
12. Leloup C, Casteilla L, Carriere A, Galinier A, Benani A, Carneiro L, et al. Balancing mitochondrial redox signaling: a key point in metabolic regulation. *Antioxid Redox Signal* 2011;14(3):519-30.
13. Benani A, Troy S, Carmona MC, Fioramonti X, Lorsignol A, Leloup C, et al. Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: redox regulation of food intake. *Diabetes* 2007;56(1):152-60.
14. Leloup C, Turrel-Cuzin C, Magnan C, Karaca M, Castel J, Carneiro L, et al. Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 2009;58(3):673-81.
15. Andrews ZB, Liu ZW, Wallingford N, Erion DM, Borok E, Friedman JM, et al. UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* 2008;454(7206):846-51.
16. Chen H, Chomyn A, Chan DC. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 2005;280(28):26185-92.
17. Benard G, Bellance N, James D, Parrone P, Fernandez H, Letellier T, et al. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci* 2007;120(Pt 5):838-48.

18. Zorzano A, Liesa M, Palacin M. Role of mitochondrial dynamics proteins in the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41(10):1846-54.
19. Yoon Y, Galloway CA, Jhun BS, Yu T. Mitochondrial dynamics in diabetes. *Antioxid Redox Signal* 2011;14(3):439-57.
20. Yu T, Robotham JL, Yoon Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(8):2653-8.
21. Hassani Z LG, Erbacher P, Palmier K, Alfama G, Giovannangeli C, Behr JP, Demeneix BA. Lipid-mediated siRNA delivery down-regulates exogenous gene expression in the mouse brain at picomolar levels. *J Gene Med* 2005;7:198-207.
22. Benani A, Barquissau V, Carneiro L, Salin B, Colombani AL, Leloup C, et al. Method for functional study of mitochondria in rat hypothalamus. *J Neurosci Methods* 2009;178(2):301-7.
23. Shimizu H, Arima H, Ozawa Y, Watanabe M, Banno R, Sugimura Y, et al. Glucocorticoids increase NPY gene expression in the arcuate nucleus by inhibiting mTOR signaling in rat hypothalamic organotypic cultures. *Peptides* 2010;31(1):145-9.
24. Kitahara T, Horii A, Kizawa K, Maekawa C, Kubo T. Changes in mitochondrial uncoupling protein expression in the rat vestibular nerve after labyrinthectomy. *Neurosci Res* 2007;59(3):237-42.
25. Koopman WJ, Verkaart S, Visch HJ, van der Westhuizen FH, Murphy MP, van den Heuvel LW, et al. Inhibition of complex I of the electron transport chain causes O₂⁻-mediated mitochondrial outgrowth. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;288(6):C1440-50.
26. Smirnova E GL, Shurland DL, and van der Bliek AM. Dynamin-related protein DRP1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 2001;12:2245-2256.
27. Jansson L, Hellerstrom C. Glucose-induced changes in pancreatic islet blood flow mediated by central nervous system. *Am J Physiol* 1986;251(6 Pt 1):E644-7.
28. Atef N, Ktorza A, Penicaud L. CNS involvement in the glucose induced increase of islet blood flow in obese Zucker rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995;19(2):103-7.
29. Guillod-Maximin E, Lorsignol A, Alquier T, Penicaud L. Acute intracarotid glucose injection towards the brain induces specific c-fos activation in hypothalamic nuclei: involvement of astrocytes in cerebral glucose-sensing in rats. *J Neuroendocrinol* 2004;16(5):464-71.
30. Richard D, Huang Q, Sanchis D, Ricquier D. Brain distribution of UCP2 mRNA: in situ hybridization histochemistry studies. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;23 Suppl 6:S53-5.
31. Uo T, Dworzak J, Kinoshita C, Inman DM, Kinoshita Y, Horner PJ, et al. Drp1 levels constitutively regulate mitochondrial dynamics and cell survival in cortical neurons. *Exp Neurol* 2009;218(2):274-85.
32. Karbowski M, Arnoult D, Chen H, Chan DC, Smith CL, Youle RJ. Quantitation of mitochondrial dynamics by photolabeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion is blocked during the Bax activation phase of apoptosis. *J Cell Biol* 2004;164(4):493-9.
33. Men X, Wang H, Li M, Cai H, Xu S, Zhang W, et al. Dynamin-related protein 1 mediates high glucose induced pancreatic beta cell apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41(4):879-90.
34. Molina AJ, Wikstrom JD, Stiles L, Las G, Mohamed H, Elorza A, et al. Mitochondrial networking protects beta-cells from nutrient-induced apoptosis. *Diabetes* 2009;58(10):2303-15.

35. Pitts KR YY, Krueger EW, and McNiven MA. The dynamin-like protein DLP1 is essential for normal distribution and morphology of the endoplasmic reticulum and mitochondria in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 1999;10:4403-4417.
36. Coppola A LZ, Andrews ZB, Paradis E, Roy MC, Friedman JM, Ricquier D, Richard D, Horvath TL, Gao XB, Diano S. A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell Metab* 2007;5:21-33.
37. Tung YC, Ayuso E, Shan X, Bosch F, O'Rahilly S, Coll AP, et al. Hypothalamic-specific manipulation of Fto, the ortholog of the human obesity gene FTO, affects food intake in rats. *PLoS One* 2010;5(1):e8771.
38. Nedergaard J, Golozoubova V, Matthias A, Asadi A, Jacobsson A, Cannon B. UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim Biophys Acta* 2001;1504(1):82-106.
39. Collins S, Yehuda-Shnaidman E, Wang H. Positive and negative control of Ucp1 gene transcription and the role of beta-adrenergic signaling networks. *Int J Obes (Lond)* 2010;34 Suppl 1:S28-33.
40. Scheurink AJ, Balkan B, Strubbe JH, van Dijk G, Steffens AB. Overfeeding, autonomic regulation and metabolic consequences. *Cardiovasc Drugs Ther* 1996;10 Suppl 1:263-73.
41. Robertson SA, Leininger GM, Myers MG, Jr. Molecular and neural mediators of leptin action. *Physiol Behav* 2008;94(5):637-42.
42. Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, et al. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem* 2003;278(19):17190-7.
43. Bach D, Naon D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Rieusset J, et al. Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Diabetes* 2005;54(9):2685-93.
44. Mitra K WC, Roysam B, Lin G, Lippincott-Schwartz J. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:11960-5.
45. Leon-Quinto T MC, Portha B. Altered activity of the autonomous nervous system as a determinant of the impaired beta-cell secretory response after protein-energy restriction in the rat. *Endocrinology* 1998;139:3382-9.
46. Cruciani-Guglielmacci C, Vincent-Lamon M, Rouch C, Orosco M, Ktorza A, Magnan C. Early changes in insulin secretion and action induced by high-fat diet are related to a decreased sympathetic tone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288(1):E148-54.
47. Horvath TL, Andrews ZB, Diano S. Fuel utilization by hypothalamic neurons: roles for ROS. *Trends Endocrinol Metab* 2009;20(2):78-87.
48. Yamagishi SI ED, Du XL, Brownlee M. Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes* 2001;50:1491-1494.
49. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005;54(6):1615-25.
50. Hackenbrock CR. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J Cell Biol* 1966;30(2):269-97.
51. Mannella CA. Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys Acta* 2006;1763(5-6):542-8.

FIGURES LEGENDS

Figure 1: Transient cerebral hyperglycemia induces the translocation of DRP1 to mitochondria in the VMH and changes of mitochondrial morphology. **(A)** Western blot analysis of DRP1 expression on mitochondrial membranes after an intracarotid injection of 0.9% NaCl (Control group, n=8), 9 mg/kg D-Glucose (Stimulated group, n = 8) or 9mg/kg L-Glucose (Osmotic control group, n=5). Representative immunoblots for mitochondrial DRP1 and CoxII (control for lane quantity) are shown. Results are expressed as density ratio of DRP1/CoxII in arbitrary units (AU). One way ANOVA analysis, followed by Bonferroni post test, *** $p < 0.001$. **(B)** Representative mitochondrial network of either NaCl (left panel) or hyperglycemic (right panel) treatment.

Figure 2: SiDRP1 rats show decreased protein levels of DRP1 without affecting the other main actors of mitochondrial dynamics and also exhibit an elongation of the mitochondrial network in the VMH. **(A)** Representative immunoblots for VMH DRP1 and Actin protein levels in siDRP1 or siControl rats 24, 48, 72, 96 h post-injection (upper panel). Relative DRP1 expression quantification (lower panel) are expressed as the ratio of DRP1 density to Actin density. There is a significant decrease in DRP1 protein level in siDRP1 rats 72 h post-injection. n=5 for all groups; unpaired t-test (with Welch's correction for time 24h), * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. **(B)** Relative DRP1 expression quantification in other brain regions 72h after siRNA injection; n=5 for all groups, unpaired t-test (with Welch's correction for LH) **(C)** Immunoblot quantification of OPA1 and MFN2 (mitochondrial fusion proteins) and FIS1 (mitochondrial fission protein) 72 h post-injection, n =5 for all groups, unpaired t-test. Results are expressed as the ratio of protein density to actin density. There is no difference in OPA1, MFN2 or FIS1 expression in siDRP1-treated animals compared to controls **(D)** Representative confocal pictures after processing of VMH mitochondrial network of a rat injected in the left side (left panel) with siControl and (right panel) in the right side with siDRP1 72 h post-injection. Mitochondria are more elongated in the siDRP1-injected side.

Figure 3: General phenotype of siRNA DRP1-injected rats **(A)** Food intake 48h before to 72h after ARC siDRP1 injection expressed in g of food ingested by g of body weight, n=17 for each time and group; two way ANOVA followed by a Bonferroni post-test, * $p < 0.05$, ## $p < 0.01$. **(B)** Body weight 48h before to 72h after ARC siDRP1 injection in g. n = 19 for each group, two way ANOVA followed by a Bonferroni post-test. **(C, D)** VMH NPY and POMC mRNA relative quantification in siDRP1 and siControl rats 72 h post-injection. Expression levels are measured as the ratio of NPY or POMC mRNA/18S mRNA (which is not modified by the treatment). There is no change in VMH NPY or POMC mRNA level in siDRP1 rats. n=6 for siControl and n=7 for siDRP1; Mann Whitney test (C) and Unpaired t-test (D). **(E)** PCR quantification of interscapular brown adipose tissue UCP1 mRNA. Expression levels are measured as the ratio of UCP1 mRNA/18S mRNA (which is not modified by the treatment). UCP1 mRNA is increased in siDRP1 rats 72 h post-injection. n=5 for siControl and n=6 for siDRP1; Unpaired t-test, ** $p < 0.01$. **(F)** Liver glycogen content in siDRP1 and siControl rats 72 h post injection. siDRP1 rats showed a decreased liver glycogen content. n=13 for siControl and n=12 for siDRP1 group; Mann Whitney test, * $p < 0.05$. **(G, H)** Basal glycemia (mM) (n=17 for both groups) and insulinemia (mU/L of siDRP1 and siControl rats 72 h post-injection, n=11 for siControl group and n=13 for siDRP1 group). Unpaired t-test (G) and Mann Whitney (H).

Figure 4: Fission inhibition induced by VMH siDRP1 knockdown inhibits hypothalamic glucose sensing, VMH mROS production and insulin secretion. **(A)** Peripheral blood glucose

level after 9 mg/kg intracarotid glucose injection in siDRP1 and siControl rats. n=7 per group, Two way ANOVA followed by Bonferroni post-test. **(B)** Plasma insulin level after 9 mg/kg intracarotid glucose injection in siDRP1 and siControl rats. Intracarotid glucose injection-induced insulin secretion is significantly impaired in siDRP1 rats at 1 and 3 min post-injection. n=7 per group; two way ANOVA followed by Bonferroni post-test, *** p < 0.001. **(C-E)** VMH **(C)**, Cortex **(D)** and Thalamus **(E)** mROS production in siDRP1 and siControl rats measured 1 min after intracarotid glucose load. Data are represented as H2-DCFDA fluorescence intensity in AU. mROS production is increased in the VMH (n=5 for siControl NaCl, n=4 siControl glucose, n=6 siDRP1 NaCl and n=4 siDRP1 glucose, one way ANOVA followed by Bonferroni post-test, **p < 0.01) and not affected in the cortex (n=5 for siControl NaCl, n=6 siControl glucose, n=6 siDRP1 NaCl and n=6 siDRP1 glucose, one way ANOVA followed by Bonferroni post-test) or thalamus (n=6 for siControl NaCl, n=6 siControl glucose, n=5 siDRP1 NaCl and n=5 siDRP1 glucose, one way ANOVA followed by Bonferroni post-test) **(F)** Insulin release from siDRP1 and siControl rat islets at 5.5 or 16.7 mM extracellular glucose level. Insulin release is increased in response to 16.7 mM glucose increase in siControl and siDRP1 rats. n=12 in each group except for siControl 16.7 mM, n=11; one way ANOVA followed by Bonferroni post-test, ** p < 0.01, *** p<0.001. **(G)** Insulin release from siDRP1 and siControl rat islets treated with acetyl-methylcholine bromide (muscarinic receptor agonist) showed increased insulin secretion compared with siControl group. Data are mean ± SEM. n= 12 for siControl and n=11 for siDRP1; Unpaired t test with Welch's correction, ** p < 0.01.

Figure 5: Knockdown of DRP1 in the VMH alters the satiating effect of glucose and is a ROS-dependent mechanism. **(A)** Time course of food intake after an 18-h fast. The food consumption of control NaCl-injected animals was decreased by ARC glucose injection (0.12 M) Data are mean ± SEM; n=10 for both groups, two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test, ** p< 0.01. **(B)** The food consumption of siControl rats injected with 0.12 M glucose was decreased compared to siControls injected with 0.9% NaCl, whereas siDRP1 animals exhibited a complete loss of glucose-induced satiation and had a similar refeeding than after NaCl injection. Data are mean ± SEM; n=14, two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test, *** p< 0.01 **(C)** Glucose injection into the ARC induced overproduction of ROS in the siControl group, which was absent in the siDRP1 group during the refeeding test. Data are mean ± SEM; n=6, one way ANOVA followed by Bonferroni post-test, ** p < 0.01.

Figure 6: Functional study of mitochondria in the VMH. **(A)** Basal respiratory capacities of mitochondria from siControl rats and siDRP1 rats were equivalent. **(B)** siDRP1 mitochondria displayed a decreased sensitivity to 10 mM glutamate **(C)** to 1 mM ADP (full activation of ATP synthase), state 3, and **(D)** to 0.5 μM CAtr (full inhibition of ATP synthase). **(E)** Percent O₂ consumption of basal state resulting from CAtr treatment, state 4. **(F)** No difference in maximal respiratory capacity was caused by the 0.4-μM CCCP treatment. **(G)** Respiratory Control Ratio (RCR) (state 3/state 4) indicating the coupling level of mitochondria. **(A-G)** Data are mean ± SEM; n=8 for siControls and n=6 for siDRP1, Mann Whitney test for (A), unpaired t-test with Welch's correction (B and C) and unpaired t-test for D to G; *p < 0.05; ** p < 0.01. **(H)** UCP2 mRNA relative quantification. The UCP2 mRNA level was not modified in siDRP1 rats compared to siControl rats. Expression levels were measured as the ratio of UCP2 mRNA/18S mRNA (which was not modified by the treatment). Data are mean ± SEM; n=8 for siControls and n=6 for siDRP1 groups, unpaired t-test.

Table 1: (FF) and (AR) are means±SEM of total analyzed mitochondria in ARC. NaCl group, n=3 rats; Glucose, n=3 rats, 6 fields per rat, Mann and Whitney test for AR and unpaired t-test for FF, *p<0.05, **p<0.01

Table 2: (FF) and (AR) are means±SEM of total analyzed mitochondria in ARC. SiControl group, n=3 rats; siDRP1 group, n=3 rats, 6 fields per rat, unpaired t-test, *p<0.05, **p<0.01

Table 1: Morphology analysis of mitochondria after NaCl or glucose treatment

	NaCl	Glc 9mg/kg
Mitochondria/Cell	373.98±35.88	421.23±12.63
Form Factor (FF)	2.73±0.03	2.58±0.04**
Aspect Ratio (AR)	2,37±0.02	2,30±0.02*

Table 2: Morphology analysis of mitochondria 72h after siControl or siDRP1 treatment

	siControl	siDRP1
Mitochondria/Cell	376.86±45.62	229.15±27.79*
Form Factor (FF)	2.45±0.01	2.51±0.01**
Aspect Ratio (AR)	2.15±0.01	2.18±0.01*

FIGURE 1

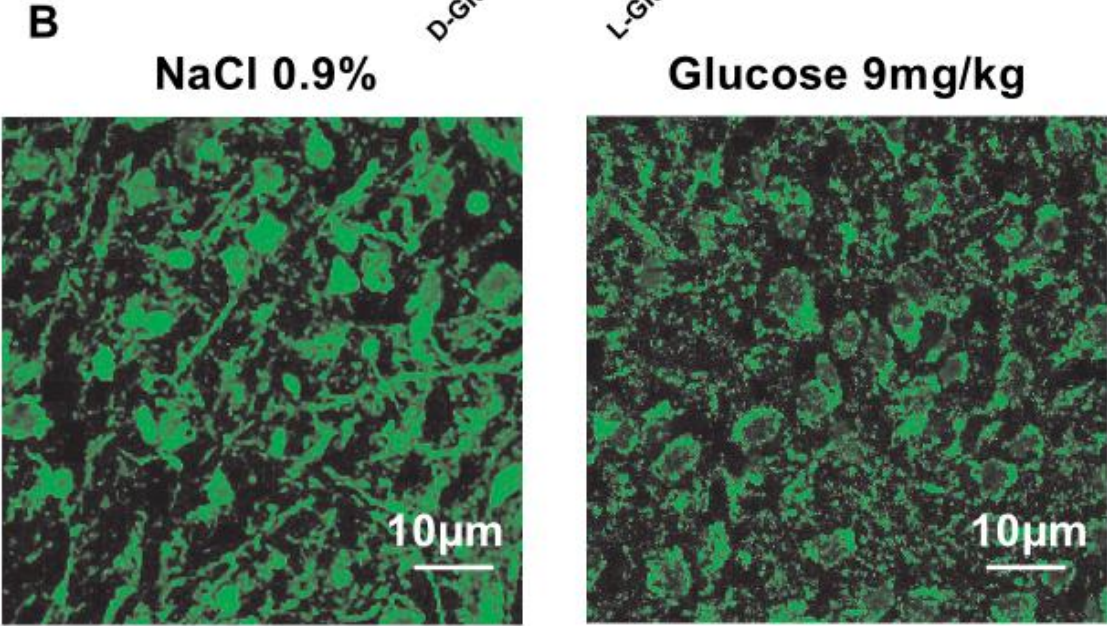
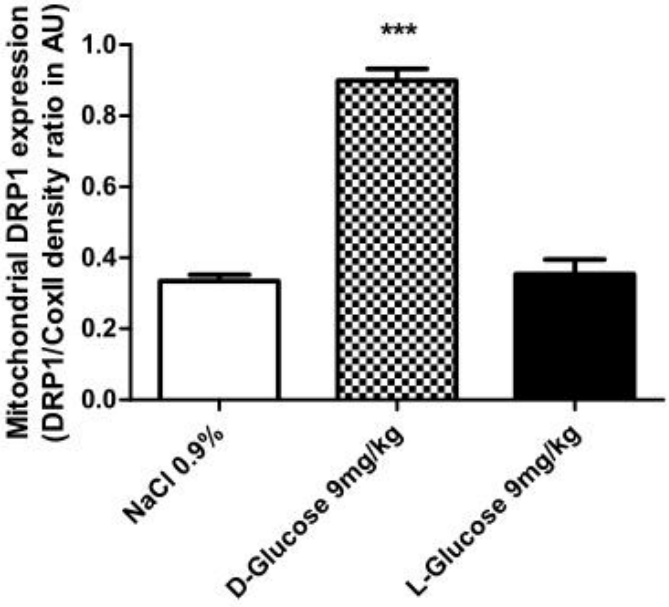
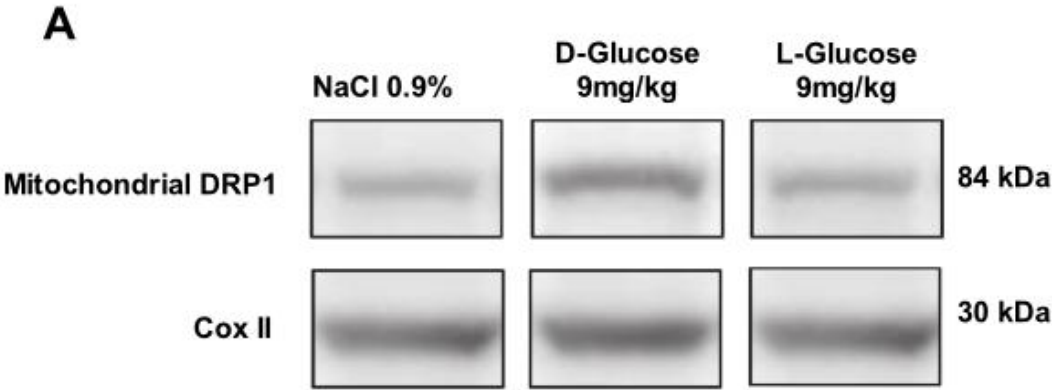
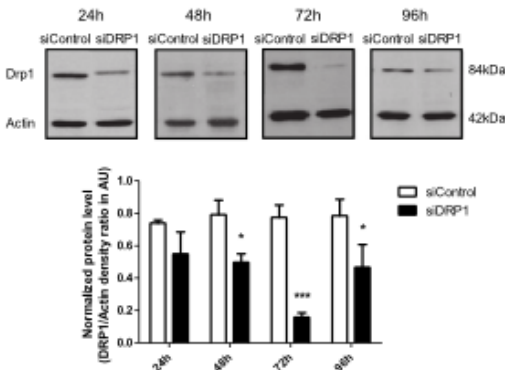
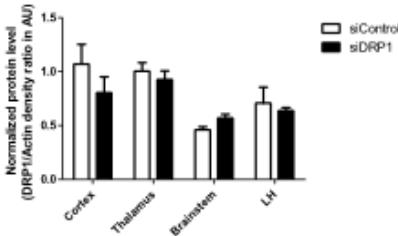


FIGURE 2

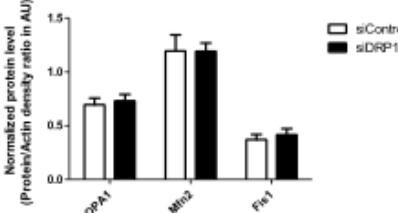
A



B



C



D

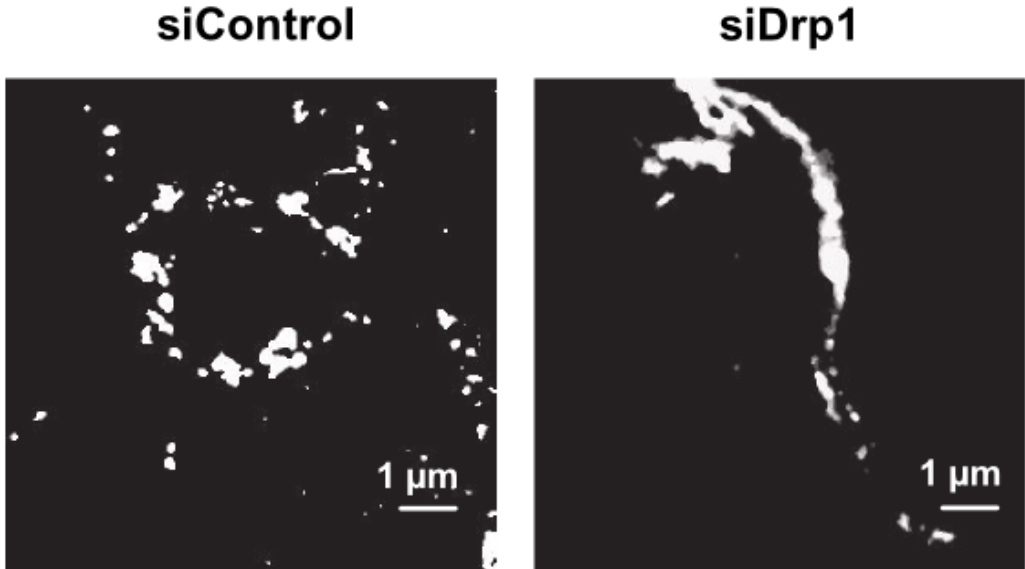
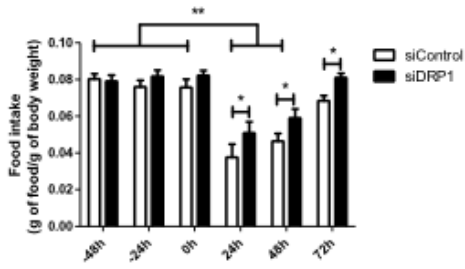
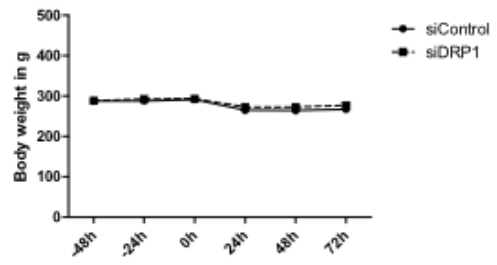


FIGURE 3

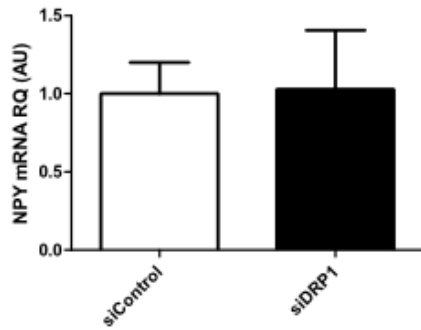
A



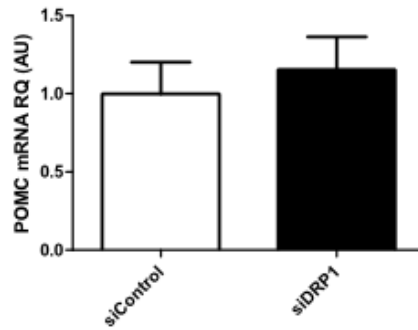
B



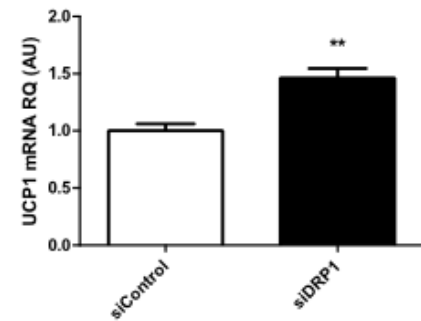
C



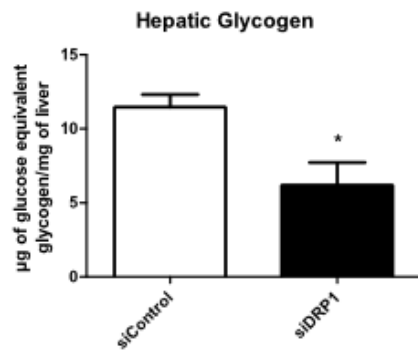
D



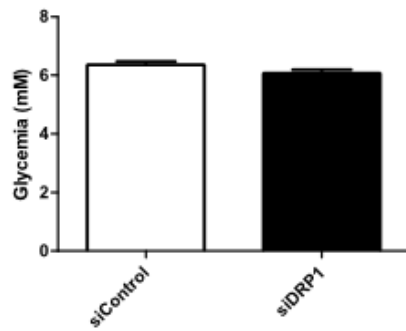
E



F



G



H

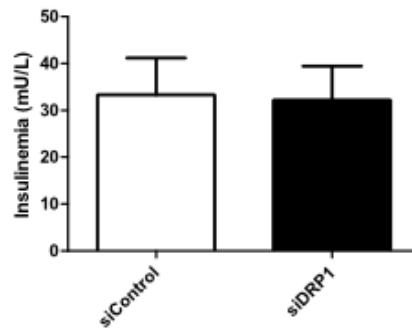


FIGURE 4

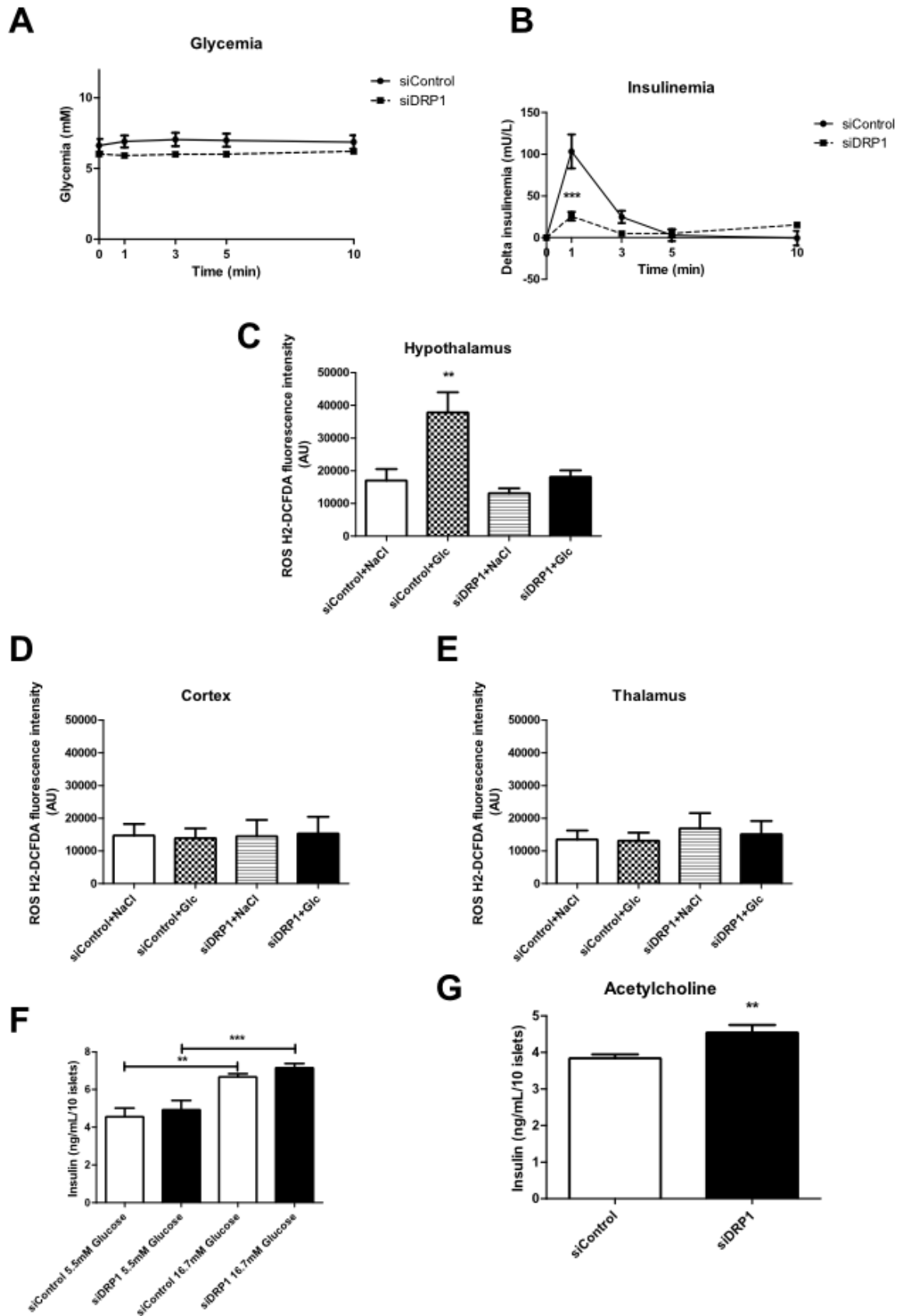


FIGURE 5

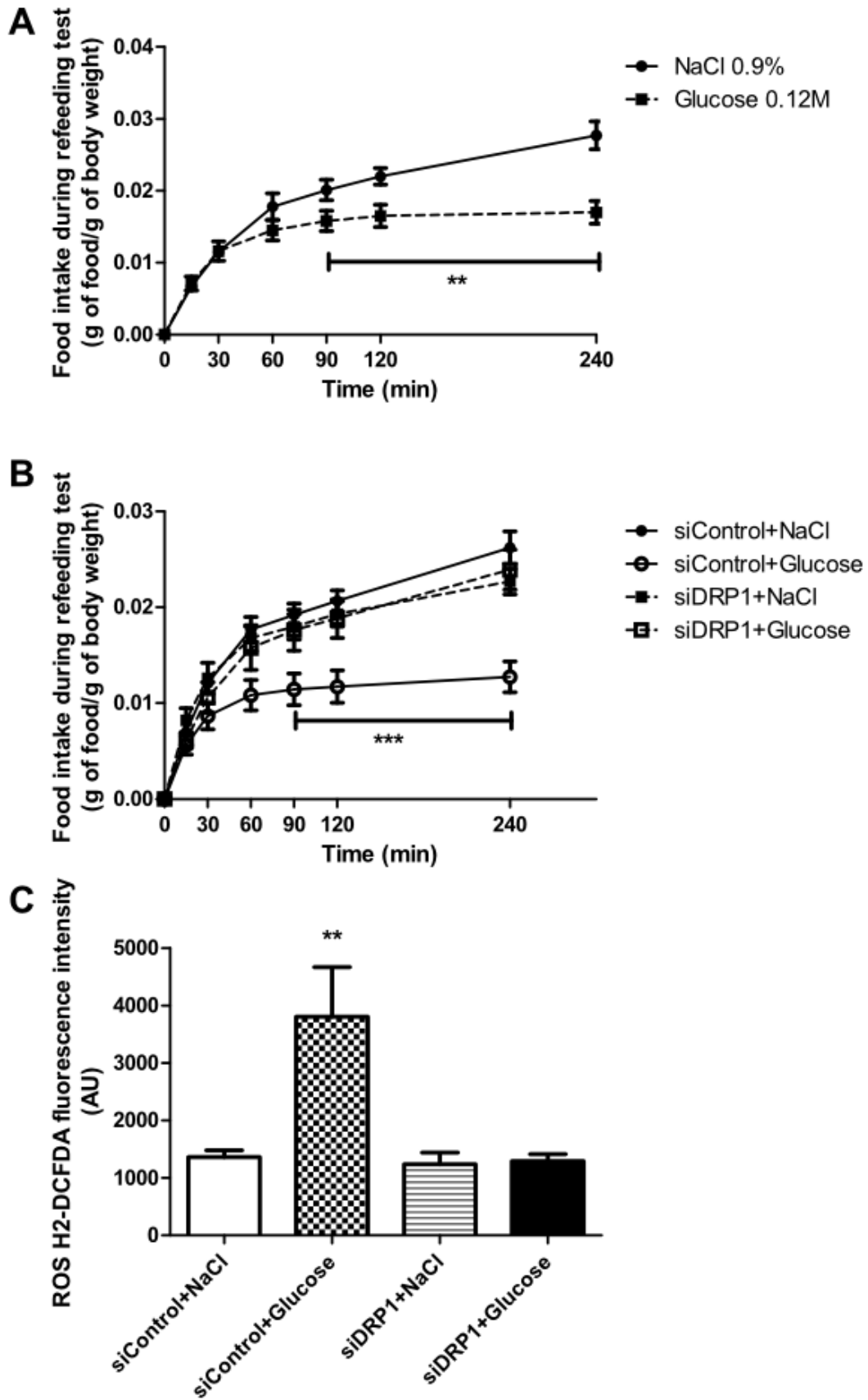
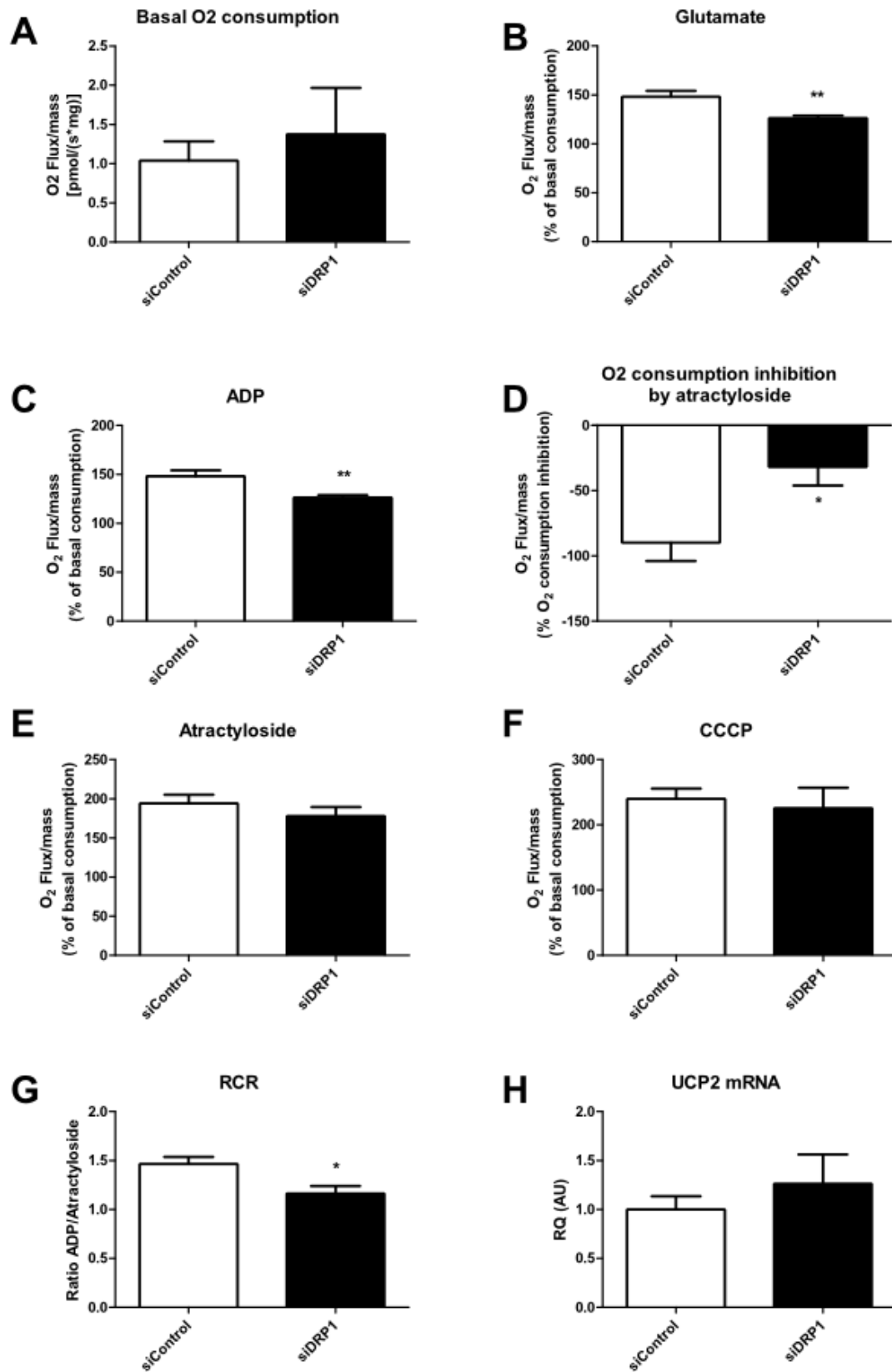


FIGURE 6



PUBLICATION 2

La publication 2, publié dans Diabetes en 2009 par Corinne Leloup, est un travail montrant le rôle de la signalisation par les mEAOs dans la libération d'insuline dans les îlots de Langherans. J'ai participé a ce travail lors de mon arrivé dans l'équipe par des dosages biochimiques ainsi que des dosages d'EAOs, ainsi qu'aux dosages de la peroxydation lipidique.

Mitochondrial Reactive Oxygen Species Are Obligatory Signals for Glucose-Induced Insulin Secretion

Corinne Leloup,¹ Cécile Turrel-Cuzin,² Christophe Magnan,² Melis Karaca,² Julien Castel,² Lionel Carneiro,¹ Anne-Laure Colombani,¹ Alain Ktorza,² Louis Casteilla,¹ and Luc Pénicaud¹

OBJECTIVE—Insulin secretion involves complex events in which the mitochondria play a pivotal role in the generation of signals that couple glucose detection to insulin secretion. Studies on the mitochondrial generation of reactive oxygen species (ROS) generally focus on chronic nutrient exposure. Here, we investigate whether transient mitochondrial ROS production linked to glucose-induced increased respiration might act as a signal for monitoring insulin secretion.

RESEARCH DESIGN AND METHODS—ROS production in response to glucose was investigated in freshly isolated rat islets. ROS effects were studied using a pharmacological approach and calcium imaging.

RESULTS—Transient glucose increase from 5.5 to 16.7 mmol/l stimulated ROS generation, which was reversed by antioxidants. Insulin secretion was dose dependently blunted by antioxidants and highly correlated with ROS levels. The incapacity of β -cells to secrete insulin in response to glucose with antioxidants was associated with a decrease in ROS production and in contrast to the maintenance of high levels of ATP and NADH. Then, we investigated the mitochondrial origin of ROS (mROS) as the triggering signal. Insulin release was mimicked by the mitochondrial-complex blockers, antimycin and rotenone, that generate mROS. The adding of antioxidants to mitochondrial blockers or to glucose was used to lower mROS reversed insulin secretion. Finally, calcium imaging on perfused islets using glucose stimulation or mitochondrial blockers revealed that calcium mobilization was completely reversed using the antioxidant trolox and that it was of extracellular origin. No toxic effects were present using these pharmacological approaches.

CONCLUSIONS—Altogether, these complementary results demonstrate that mROS production is a necessary stimulus for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 58:673–681, 2009

Elucidating the mechanisms by which pancreatic β -cells couple glucose sensing to insulin secretion, a vital process in energy homeostasis, is of prime importance. Although ATP production is considered the main mitochondrial signal, detailed studies show that insulin secretion cannot be restricted to ATP synthesis, and numerous experimental clues show that

additional mitochondrial factors involved in glucose-secretion coupling are necessary, although not yet identified (1).

Transient increases in glucose metabolism generate NADH and FADH₂, leading rapidly to increased superoxide anion (O₂⁻) production; obligatorily associated with the respiratory chain function, superoxide anion will be converted into H₂O₂ (2). This production of mitochondrial reactive oxygen species (mROS)—transient because H₂O₂-inactivating enzymes rapidly quench it before a damage to the physiological conditions of the cell occurs—is now recognized as an intracellular messenger (3,4). These features make mROS a good candidate for rapidly regulating pathways that depend directly on metabolic fluxes. Based on such a view, we recently demonstrated that mROS production is required for hypothalamic glucose and lipid sensing (5,6). These results lead us to speculate that O₂ might operate more generally in nutrient-sensitive cells and also to look for the role of mROS as a signal involved in glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). Recently, a study revealed that H₂O₂ is effectively a signal of GSIS (7). Here, we provide clues that glucose-induced mitochondrial O₂ production is an obligatory stimulus for insulin secretion.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Male Wistar rats, weighting 250–300 g, were maintained in animal quarters at a constant temperature (21–23°C) and with a 12-h light/12-h dark cycle. Food and water were available ad libitum. All rats were treated in accordance with European Community guidelines, and our local institution approved the experimentation. Pharmacological agents were all purchased from Sigma-Aldrich, except carbonyl cyanide *m*-trichlorophenylhydrazone (CCCP), which was obtained from Calbiochem.

Islet isolation. Rats were anesthetized using pentobarbital (4 mg/100 g body wt i.p.; Sanofi Santé Animale, Libourne, France). Islets of Langerhans were isolated after collagenase digestion of the pancreas, as previously described (8). Briefly, the pancreatic duct was ligated distally and injected with an ice-chilled solution of collagenase (Type V collagenase; Sigma) and 5.5 mmol/l glucose in Hank's balanced salt solution (HBSS: 137 mmol/l NaCl, 5.36 mmol/l KCl, 4.17 mmol/l NaHCO₃, 0.88 mmol/l MgSO₄, 0.44 mmol/l KH₂PO₄, 0.34 mmol/l Na₂HPO₄, 1.27 mmol/l CaCl₂, 10 mmol/l HEPES, and 0.5% BSA). The pancreas was removed and incubated for 9 min at 37°C. The suspension was repeatedly passed through a 14-gauge needle. After several centrifugations and resuspensions in ice-cold HBSS, the dispersed pancreas was filtered through a 500- μ m screen. The filtrate was pelleted and resuspended in 20 ml Histopaque 1077 (Sigma), on the top of which 20 ml HBSS was carefully layered. After 20 min of centrifugation at 2,500 rpm at room temperature, the islets were recovered from the interface and washed twice in HBSS. The islets were immediately used for static incubations or perfusion experiments.

Insulin release, ATP, NADH, and ROS evaluations under static incubation. Insulin release was measured on the islet batches in the supernatant using radioimmunoassay. Groups of 60–80 islets were first preincubated for 60 min at 37°C in silicone-coated glass tubes, in 1 ml Krebs-Ringer bicarbonate HEPES buffer (KRBH buffer supplemented with 5 mg/ml BSA (fraction V; Sigma) and 2.8 mmol/l glucose. For the first 15 min of preincubation, the tubes were gassed with a mixture of O₂:CO₂ (95%:5%). Over the preincubation period, the medium was eliminated and replaced with 1 ml KRBH-BSA medium [KRBH buffer (140 mmol/l NaCl, 3.6 mmol/l KCl, 0.5 mmol/l NaH₂PO₄, 0.5 mmol/l MgSO₄, 2 mmol/l NaHCO₃, 1.5 mmol/l CaCl₂, and 10 mmol/l HEPES)

From the ¹Department of Metabolism, Plasticity, and Mitochondria, Unité Mixte de Recherche 5241, Centre National de la Recherche Scientifique-Université Paul Sabatier, Institut Fédératif de Recherche 31, Institut Fédératif de Recherche 109, Toulouse, France; and ²Unité Mixte de Recherche 7059, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, France.

Corresponding author: Corinne Leloup, coleloup@toulouse.inserm.fr.

Received 31 July 2007 and accepted 4 December 2008.

Published ahead of print at <http://diabetes.diabetesjournals.org> on 10 December 2008. DOI: 10.2337/db07-1056.

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

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

and 1% BSA (fraction V; Sigma) containing the different glucose concentrations and/or pharmacological agents 1 mmol/l trolox, 100 μ mol/l rotenone, 20 μ mol/l antimycin, 1 mmol/l glutathione ethylester, and 1 μ mol/l CCCP. Rotenone and antimycin partially block the electron transfer in the mitochondrial chain (depending on concentration), favoring the reaction with molecular O_2 , and then increasing anion superoxide formation, which is itself being rapidly converted into H_2O_2 (via the mitochondrial manganese superoxide dismutase [MnSOD]). The islets were further incubated for 30 min at 37°C. At the end of this period, the medium was stored at 4°C until assayed for insulin, except for rescretion tests. The islets were sonicated, and ATP and NADH contents were respectively determined using a bioluminescent kit (Sigma-Aldrich) and a spectrophotometer to measure NADH through the absorbance at 340 nm. In experiments to determine intracellular ROS, islets were loaded with a fluorescent probe that corresponds to intracellular H_2O_2 increase, because the probe used (CMH₂DCFDA) is a classical H_2O_2 marker. The incubation was conducted as previously described (6). At the end of the experiments, islets were rinsed and disrupted using sterile water. After a 5-min centrifugation (3,000 \times g), islet supernatants containing the oxidized product fluorescing due to ROS were analyzed as previously described (6).

Evaluation of insulin release during perfusion experiments. Kinetics of insulin release *in vitro* were studied using the perfusion procedure already described (8). Four columns were run at the same time, each containing 85–120 freshly isolated islets of Langerhans. The perfusion medium containing the basal buffer [2.8 mmol/l glucose in KRBH containing 140 mmol/l NaCl, 3.6 mmol/l KCl, 0.5 mmol/l NaH_2PO_4 , 0.5 mmol/l $MgSO_4$, 2 mmol/l $NaHCO_3$, 1.5 mmol/l $CaCl_2$, 10 mmol/l HEPES, and 1% BSA (fraction V; Sigma)] was supplemented with a high glucose concentration (16.7 mmol/l) and/or the pharmacological agents 1 mmol/l trolox (a vitamin E analog, involved in the synergic regeneration of antioxidant defenses, such as reduced glutathione, as well as a powerful scavenger of peroxide radicals in membranes) and 100 μ mol/l rotenone as needed. The perfusion fluid was collected at 1-min intervals and kept on ice until the end of the experiment. Fractions collected were stored at 4°C until assayed for insulin.

Measurements of islet intracellular free calcium concentration. Freshly isolated islets were loaded for 1 h with 5 μ mol/l Fura-2/AM at 37°C in KRBH containing 115 mmol/l NaCl, 5 mmol/l KCl, 24 mmol/l $NaHCO_3$, 1 mmol/l $CaCl_2$, 1 mmol/l $MgCl_2$, and 5.5 mmol/l glucose and 5 mg/ml BSA. After loading, eight islets at a time were allowed to attach onto a polylysine-treated coverglass transferred to a perfusion chamber placed on the stage of an inverted fluorescent microscope (Nikon Diaphot, Champigny sur Marne, France). Canulas feeding into the chamber were connected to a peristaltic pump and allowed a continuous superfusion of the islets at a flow rate of 1 ml/min with a 25 mmol/l HEPES-buffered medium maintained at 37°C containing 125 mmol/l NaCl, 5.9 mmol/l KCl, 1.28 mmol/l $CaCl_2$, 1.2 mmol/l $MgCl_2$, 5.5 mmol/l glucose, and 1 mg/ml BSA. Intracellular free Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) was determined as previously described (9,10). Briefly, a selected area of the islets was excited at 340 and 380 nm alternatively (every 2 s), and the fluorescence intensity emitted at 510 nm was measured by using a Photonics II microfluorometer (Photon Technology International, Biotek Kontron, St. Quentin Yvelines, France). The measurements of successive 340/380 fluorescence ratios (R) reflect the cytosolic free calcium concentration that is abbreviated as follows: $[Ca^{2+}]_i$. Finally, calcium origin was investigated by imaging intracellular Ca^{2+} activity in presence of 1 μ mol/l thapsigargin or 1 mmol/l EGTA. Effects of ROS on depolarization were done in presence of the antioxidant trolox (1 mmol/l) by stimulating islets with 30 mmol/l KCl. Before islet measurement, background fluorescence was recorded for both wavelengths in areas devoid of islets, and the data were subtracted from the corresponding measurements of fura-2-loaded islets.

Insulin rescretion test. After antimycin or rotenone exposition (static condition) for 30 min, islets were replaced for 30 min in 5.5 mmol/l glucose, insulin was measured, and then islets were rinsed and re-exposed to 16.7 mmol/l glucose for the same lapse of time; *de novo* insulin secretion was evaluated on supernatants.

Insulin radioimmunoassay. Insulin was measured by means of a radioimmunoassay kit (Cis-Bio International, Gif-sur-Yvette, France) using ^{125}I -labeled porcine insulin tracer and tube coated with anti-porcine guinea pig antiserum. Rat insulin standard was obtained from Linc Research (St. Charles, MO). The lower limit of the assays was 75 pmol/l with a variation coefficient of 6% within the assays and of 8% between the assays.

Lipid peroxidation determinations. Hydroperoxides in biological samples were estimated using the Lipid Hydroperoxide Assay kit (Cayman; Alexis Biochemicals). This method is based on lipid extraction into chloroform, eliminating interference caused by hydrogen peroxide or endogenous ferric ions.

Statistical analysis. Values are expressed as means \pm SE. The statistical significance of differences between two groups was determined by Student's *t* test, and multiple comparisons were made by ANOVA followed by Student-

Newman-Keuls test. For the regressions, a Pearson correlation matrix using SYSTAT software was used, followed by a matrix of Bonferroni probabilities.

RESULTS

Glucose induces ROS production in isolated rat islets. A glucose challenge (16.7 mmol/l) during 30-min incubation triggered a threefold increase of ROS fluorescence as shown in Fig. 1A. This ROS production was accompanied by a classical GSIS (Fig. 1B). We then investigated whether a causal link exists between these two events by quenching ROS rise using an antioxidant. As expected, ROS production was completely abolished by trolox, a vitamin E analog (Fig. 1A). Strikingly, this was associated with a complete blunting of GSIS, suggesting the involvement of ROS in GSIS (Fig. 1B). To confirm these data, we performed perfusion experiments, which allow a dynamic view of insulin secretion. As was the case previously, the presence of the antioxidant induced a pronounced and significant reduction of GSIS (Fig. 1C). We then investigated whether a dose response might be established between ROS production and insulin secretion. This was achieved in static incubation by gradual antioxidant levels to modulate ROS production under GSIS (Fig. 1D and E). Under these conditions, the regression linking ROS production to insulin secretion ($r = 0.899$) was highly significant ($P < 0.001$; Fig. 1F). Moreover, kinetics of both ROS production and insulin secretion were measured under GSIS and revealed the ROS elevation shown at 5 min coincided with the start of insulin secretion under static conditions. A plateau was maintained for both ROS production and insulin secretion during the 30 min that lasted the experiment (Fig. 2A and B). Altogether, these results indicated that ROS was produced under acute glucose stimulation and was required for insulin secretion. Moreover insulin was dose dependently released, reinforcing the fact that ROS could be an important part of the in GSIS signaling.

mROS mimic GSIS. To test whether mROS have the ability to mimic GSIS, specific mitochondrial blockers that increase mROS production were used. Rotenone and antimycin, complex I and III inhibitors, respectively, were added to the 30-min static incubation with no glucose challenge in basal glucose condition (5.5 mmol/l). The concentrations (100 μ mol/l rotenone and 20 μ mol/l antimycin) were chosen to mimic a similar ROS production to that obtained with a 16.7 mmol/l glucose stimulus (Fig. 3A). Trolox (1 mmol/l) or 1 mmol/l glutathione reduced ethyl ester cotreatment blunted the ROS fluorescence (Fig. 3A) and the insulin release (Fig. 3B). To assess this response in a dynamic model, perfusion experiments were also conducted. The presence of the mitochondrial blocker rotenone perfectly mimicked GSIS (Fig. 3C), which was significantly reduced in the presence of the antioxidant trolox (Fig. 3C). To test our hypothesis in static incubation, we coadministered an antioxidant in a dose response-dependent manner. It consequently diminished ROS production (Fig. 3D and E). ROS production was clearly correlated to insulin secretion ($r = 0.883$), and the regression was highly significant ($P < 0.001$; Fig. 3F). To confirm the mitochondrial origin of glucose-induced ROS, cells were cotreated with 16.7 mmol/l glucose and the mild uncoupler CCCP (1 μ mol/l), which makes it possible to block the ATP rise without decreasing its level (11). This uncoupler accelerates electron transit by dissipating the H^+ gradient, decreasing the probability of the electrons reacting with oxygen and thus leading to the

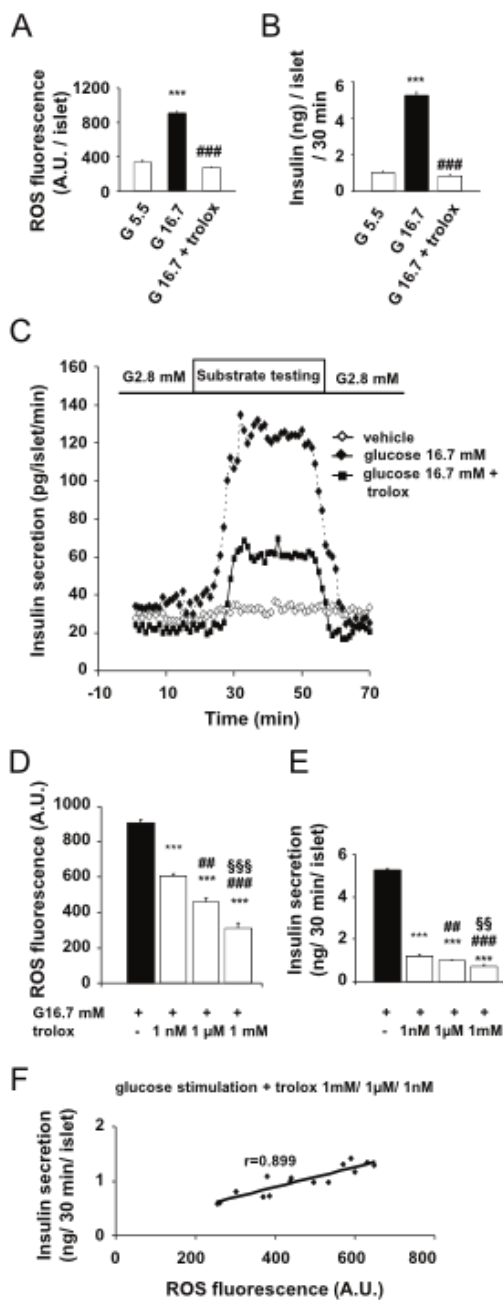


FIG. 1. Glucose induces ROS production in isolated rat islets. *A*: Glucose challenge (16.7 mmol/l) in a 30-min static incubation triggered a threefold increase in ROS fluorescence. *B*: ROS production was accompanied by a classical GSIS. Quenching ROS by trolox completely blunted GSIS. *A* and *B*: Three independent experiments, $n = 6$ per group; $***P < 0.001$, glucose 5.5 vs. 16.7 mmol/l; $###P < 0.001$, glucose 16.7 vs. 16.7 mmol/l + trolox. *C*: Dynamic experiments using perfusion demonstrating the antioxidant-induced reduction of GSIS. Three independent experiments, $P < 0.001$ between vehicle and treated groups and between 16.7 mmol/l glucose vs. 16.7 mmol/l glucose + trolox. *D* and *E*: Modulation of glucose-induced ROS production and GSIS by gradual antioxidant doses. Three independent experiments, $n = 6$ per group; $**P < 0.01$ or $***P < 0.001$, 16.7 mmol/l glucose + 1 nmol/l trolox vs. 16.7 mmol/l glucose + 1 μ M trolox; $##P < 0.01$ or $###P <$

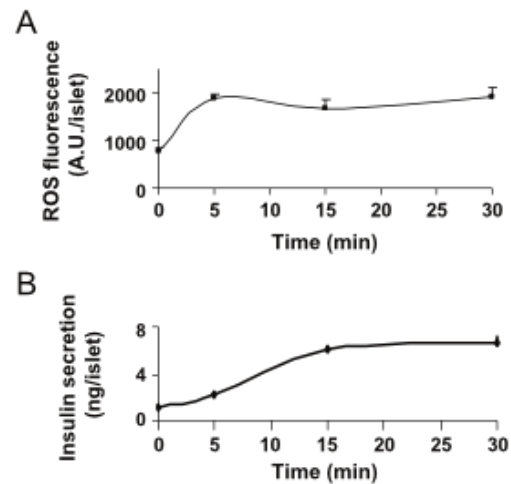


FIG. 2. ROS kinetics paralleled insulin secretion in GSIS. *A*: Intracellular H_2O_2 production measured with H_2 -DCFDA probe. Freshly isolated islets on 5.5 mmol/l glucose before time 0 were treated with 16.7 mmol/l glucose the lasting 30 min. ROS production appeared maximally and reached a plateau at 5 min. *B*: Insulin secretion immediately followed this ROS production and shared a similar profile.

complete abrogation of ROS fluorescence as shown in Fig. 3*A*. In this case, insulin secretion was completely blunted (Fig. 3*B*). Finally, the effects of rotenone and antimycin in the presence of 16.7 mmol/l glucose had been tested: They increased the ROS production and insulin secretion more efficiently than 16.7 mmol/l glucose alone or mitochondrial blockers alone (data not shown). These results suggest that increasing glucose to 16.7 mmol/l (i.e., electron donors) while partially inhibiting the mitochondrial respiration (slowing down the electron transit) led to the greatest ROS production, finally increasing insulin secretion. NADH and ATP increases are not necessary for mROS-induced insulin secretion. The results presented in Fig. 1 suggested that quenching ROS was strikingly enough to blunt insulin secretion. Because ATP and NADH—two crucial products of glucose metabolism and respiration—have been considered as main cellular triggers for insulin secretion, we undertook a last set of experiments to definitively rule out their involvement. As shown in Fig. 4*C* and *D*, although both ATP and NADH were highly significantly increased, insulin secretion was completely abolished when adding antioxidant as previously reported. In this case, only ROS enhancement was completely blunted (Fig. 4*A*). In the reverse experiment, using mitochondrial blocker 100 μ M rotenone, a concentration that did not modify ATP and NADH concentrations (Fig. 4*C* and *D*) but ensured mROS production (Fig. 4*A*), showed that insulin secretion was still stimulated (Fig. 4*B*). In these experiments, it is noteworthy that insulin secretion was achieved with almost identical levels of ROS fluorescence produced either by 16.7 mmol/l glucose or by rotenone, regardless of the high or basal ATP and NADH levels (Fig. 4*A–D*). Moreover, no correlation was observed between ATP and NADH levels and insulin secretion. These complementary results strongly suggest

0.001, 16.7 mmol/l glucose + 1 μ M trolox vs. 16.7 mmol/l glucose + 1 nmol/l trolox. *F*: In these conditions, the regression linking ROS production to insulin secretion ($r = 0.899$) was highly significant $P < 0.001$. A.U., arbitrary unit.

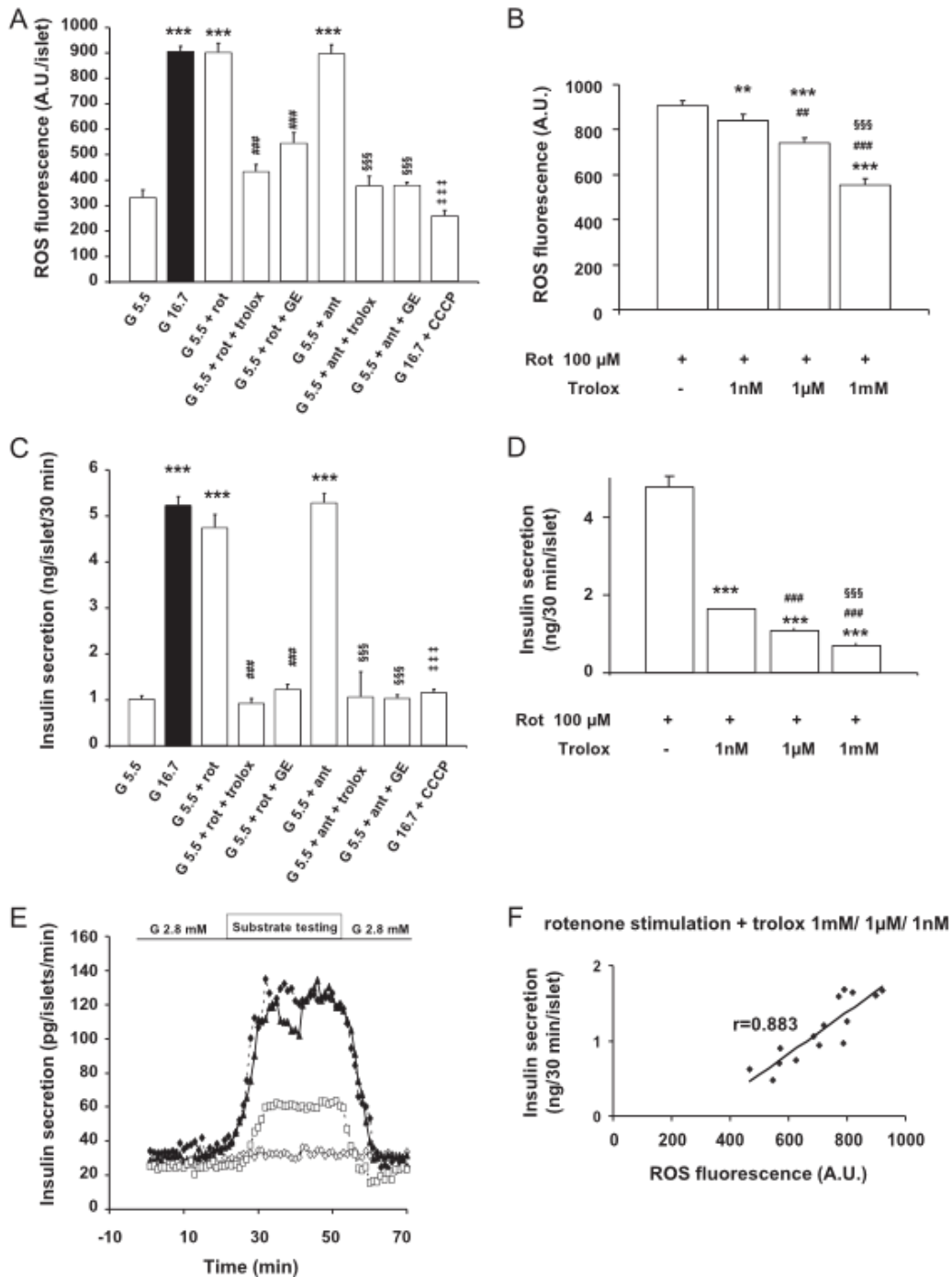


FIG. 3. mROS mimic GSIS in β -cells islets. **A:** Effect of treatments on intracellular H_2O_2 production measured with H_2 -DCFDA probe. Treatments were as follows: 100 μ mol/l rotenone or 20 μ mol/l antimycin, inhibitors of complexes I and III, respectively, added to the 30-min static incubation in 5.5 mmol/l glucose; 1 mmol/l trolox or 1 mmol/l glutathione reduced ethyl ester (GE) cotreatment with 16.7 mmol/l glucose or rotenone (rot) or antimycin (ant); 16.7 mmol/l glucose coadministered with the uncoupler CCCP. **C:** Insulin release measurement in the same conditions. **A** and **C:** Three independent experiments, $n = 6$ per group. *** $P < 0.001$, glucose 5.5 vs. 16.7 mmol/l, vs. 5.5 mmol/l glucose \downarrow rot or 5.5 mmol/l glucose \downarrow ant; ### $P < 0.001$, 5.5 mmol/l glucose \downarrow rot vs. 5.5 mmol/l glucose \downarrow rot \downarrow trolox or glutathione ethyl ester (GE); §§§ $P < 0.001$, 5.5 mmol/l glucose \downarrow ant vs. 5.5 mmol/l glucose \downarrow ant \downarrow trolox or glutathione ethyl ester (GE); ††† $P < 0.001$, 16.7 mmol/l glucose vs. 16.7 mmol/l glucose \downarrow CCCP. **E:** Dynamic insulin secretion using perfusion model under rotenone alone or in presence of the antioxidant trolox. Three independent experiments, with one perfused column per case, $P < 0.001$ between vehicle and treated groups and between rotenone vs. rotenone \downarrow trolox. **B** and **D:**

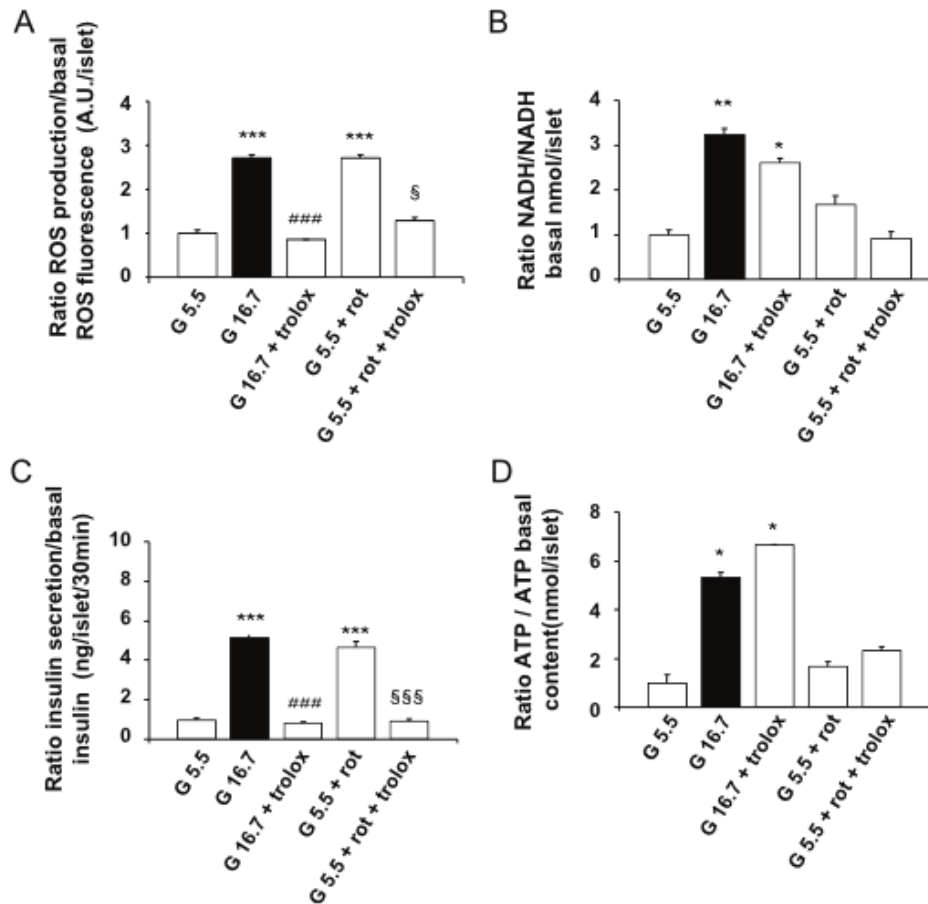


FIG. 4. NADH and ATP increases are not necessary for mROS-induced insulin secretion. Ratio of either ROS production as measured with H_2 -DCFDA (A), NADH (B), insulin secretion (C), or ATP (D) compared with basal condition (5.5 mmol/l glucose) in three independent experiments, $n = 4$ per group. A and C: Static islet incubation for 30 min in 16.7 mmol/l glucose cotreated with trolox abolished ROS production and blunted insulin secretion: *** $P < 0.001$, glucose 16.7 vs. 5.5 mmol/l; ### $P < 0.001$, 16.7 mmol/l glucose + trolox vs. 16.7 mmol/l glucose alone. B and D: Both NADH and ATP were increased, although insulin secretion was abolished when ROS were blunted: * $P < 0.05$ or ** $P < 0.001$, 16.7 mmol/l glucose + trolox vs. 16.7 mmol/l glucose alone. Conversely, 100 μ mol/l rotenone (rot) stimulated ROS production and insulin secretion (A and C), independently of NADH or ATP (B and D), which were unchanged compared with controls. *** $P < 0.001$, 5.5 mmol/l glucose + rotenone vs. 5.5 mmol/l glucose; §§§ $P < 0.001$ or § $P < 0.05$, 5.5 mmol/l glucose + rotenone vs. 5.5 mmol/l glucose + rotenone + trolox.

that mROS are robust stimulators of insulin secretion independently of these other products linked to glucose metabolism.

Effect of quenching ROS production on intracellular calcium profiles after glucose, mitochondrial blocker, or KCl treatment. Switching the extracellular glucose concentration from 5 to 16.7 mmol/l led to an increase in $[Ca^{2+}]_i$. The subsequent addition of 1 mmol/l trolox led to a marked fall in $[Ca^{2+}]_i$ to basal level in the following 5 min, suggesting that ROS quenching led to impaired $[Ca^{2+}]_i$ mobilization (Fig. 5A). Switching the extracellular glucose concentration from 5 mmol/l to 5 mmol/l plus 100 μ mol/l rotenone first led to a transient fall in $[Ca^{2+}]_i$ in the first 8 min, followed by a large sustained increase (Fig. 5B). The addition of the antioxidant trolox (1 mmol/l) to rotenone completely abolished the $[Ca^{2+}]_i$ mobilization

(Fig. 5B), showing that mROS production might importantly serve as signals mediating the necessary Ca^{2+} recruitment for insulin secretion. Finally, Fig. 5C and D show one representative example of three experiments for the $[Ca^{2+}]_i$ mobilization under either 1 mmol/l EGTA (chelating extracellular Ca^{2+} ions) or 1 μ mol/l thapsigargin (irreversible inhibition of Ca^{2+} pumps from intracellular stores). Increasing the glucose concentration or adding rotenone first triggered a typical biphasic response; second, the presence of EGTA (calcium-free medium) resulted in a profound decrease of fluorescence fura-2 ratio 340:380, i.e., intracellular calcium mobilization, for both glucose and rotenone, suggesting the calcium might be mainly of extracellular origin (Fig. 5C). Figure 5D shows the complementary experiment using thapsigargin, which did not suppress the massive increase of $[Ca^{2+}]_i$, whatever

D: Modulation of rotenone-induced ROS production and GSIS by gradual antioxidant doses. ROS-dependent response might be established with insulin secretion in static incubation. Three independent experiments, $n = 6$ per group; *** $P < 0.001$, rotenone + 1 mmol/l trolox vs. rotenone + 1 μ mol/l trolox; ### $P < 0.001$, rotenone + 1 μ mol/l trolox vs. rotenone + 1 mmol/l trolox. $r = 0.883$ was highly significant $P < 0.001$. □, vehicle; ◻, glucose 16.7 mM; ◻, rotenone; ✕, rotenone + trolox.

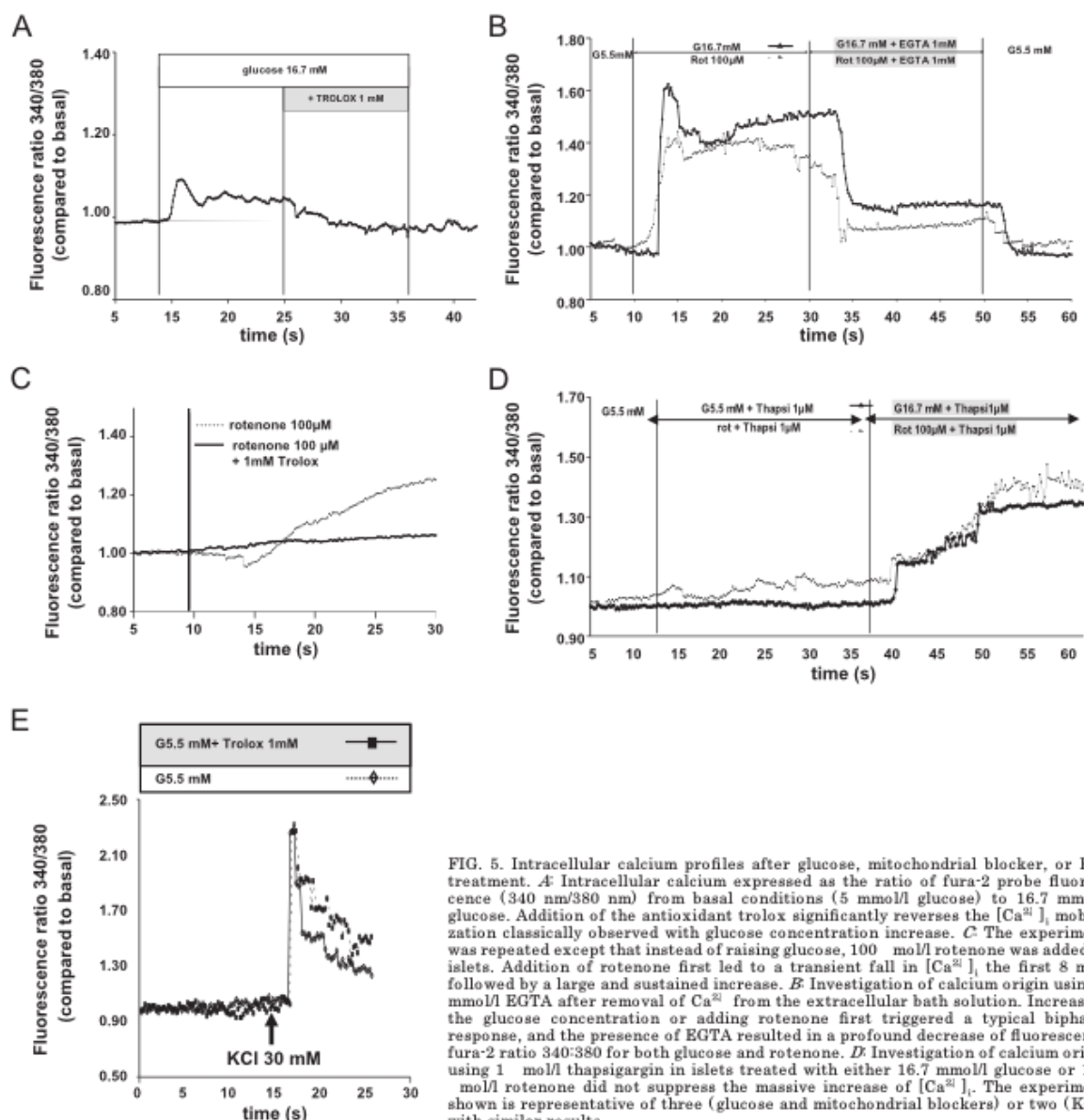


FIG. 5. Intracellular calcium profiles after glucose, mitochondrial blocker, or KCl treatment. *A*: Intracellular calcium expressed as the ratio of fura-2 probe fluorescence (340 nm/380 nm) from basal conditions (5 mmol/l glucose) to 16.7 mmol/l glucose. Addition of the antioxidant trolox significantly reverses the $[Ca^{2+}]_i$ mobilization classically observed with glucose concentration increase. *C*: The experiment was repeated except that instead of raising glucose, 100 μmol/l rotenone was added to islets. Addition of rotenone first led to a transient fall in $[Ca^{2+}]_i$, the first 8 min, followed by a large and sustained increase. *B*: Investigation of calcium origin using 1 mmol/l EGTA after removal of Ca^{2+} from the extracellular bath solution. Increasing the glucose concentration or adding rotenone first triggered a typical biphasic response, and the presence of EGTA resulted in a profound decrease of fluorescence fura-2 ratio 340:380 for both glucose and rotenone. *D*: Investigation of calcium origin using 1 μmol/l thapsigargin in islets treated with either 16.7 mmol/l glucose or 100 μmol/l rotenone did not suppress the massive increase of $[Ca^{2+}]_i$. The experiment shown is representative of three (glucose and mitochondrial blockers) or two (KCl) with similar results.

the stimulus, glucose or rotenone. However, the typical biphasic rise disappeared in both cases, emphasizing that the first peak might require calcium of intracellular origin. In the next experiment, we tested whether the ROS scavenger trolox (1 mmol/l) would abrogate the calcium effect of KCl. It had no inhibitory effect on KCl-induced $[Ca^{2+}]_i$ mobilization (Fig. 5*E*).

No toxic effects are present in the model used. To rule out a putative damaging effect on membrane integrity due to peroxidation and a nonspecific oxidative stress of ROS, lipid peroxidation was evaluated. Hydroperoxide measurements were conducted on glucose and pharmacologically treated islets. No difference in peroxidation in the pharmacologically treated groups compared with glucose was observed (Fig. 6*A*). To definitively exclude a toxic effect,

cells previously treated with the mitochondrial blockers for 30 min were replaced in a fresh medium, and insulin was reevaluated before and after a glucose challenge. Under these conditions, only a slight insulin release was detected in the fresh medium under basal conditions, and the ability of glucose to stimulate insulin secretion was totally maintained after the pharmacological treatments (Fig. 6*B*). Altogether, these results exclude the possibility of damaging effects of rotenone or antimycin on islets.

DISCUSSION

It is now accepted that small fluctuations in the steady-state concentration of ROS may play a role in intracellular signaling (3,12). Their pivotal role in nutrient sensing is

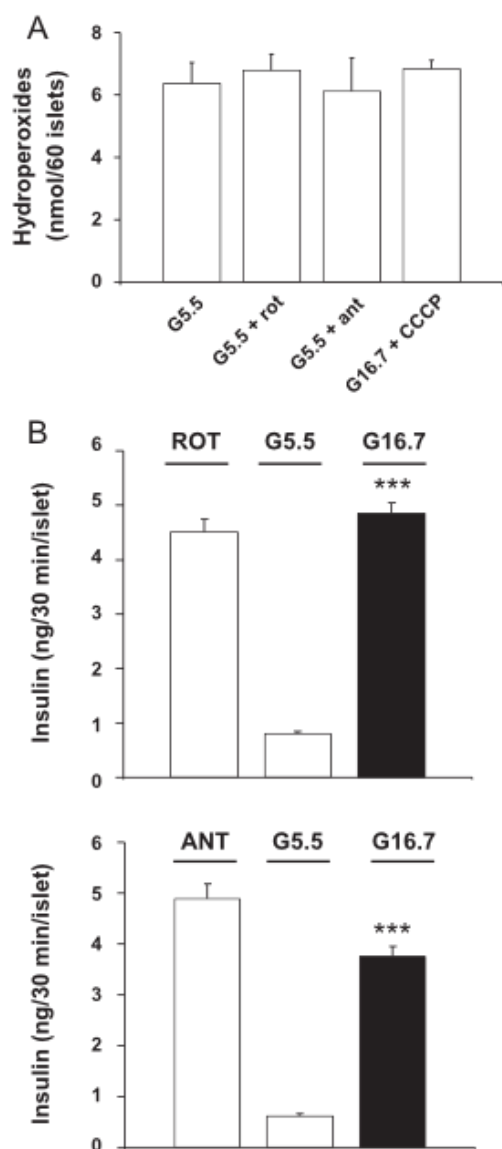


FIG. 6. Islet preservation under the different mitochondrial treatments. **A** To exclude a damaging and nonspecific oxidative stress, lipid peroxidation was evaluated. Hydroperoxides were evaluated on islets treated in static incubation for 30 min with 100 μ M rotenone, 1 μ M CCCP, or 20 μ M antimycin compared with basal conditions, 5.5 mmol/l glucose. No difference in these groups compared with glucose was observed. **B** Insulin resecretion after the 100 μ M rotenone or 20 μ M antimycin treatment consisted to expose islets to GSIS after they were stimulated with the mitochondrial blockers for 30 min and insulin was measured in the milieu. They were replaced in basal glucose (5.5 mmol/l) for 30 min further, and insulin was reevaluated before a GSIS was done. In these conditions, insulin release was absent in the milieu in basal conditions, and the ability of glucose to restimulate insulin secretion was totally maintained after the pharmacological treatments. Three independent experiments, $n = 6$; *** $P < 0.001$, glucose 16.7 vs. 5.5 mmol/l. Bars represent SE in all figures. They were not represented for perfused-islet experiments. Ant, antimycin; rot, rotenone.

beginning to be considered in the literature since we highlighted their requirement in hypothalamic glucose and lipid sensing (5,6). Here, we expand the question to the

gold standard, and the main glucose-sensitive cell type, the pancreatic β -cells. The present results undoubtedly demonstrate that glucose-induced mitochondrial ROS production is an obligatory stimulus for insulin secretion.

In cells, mitochondria are the main source of oxidants. Transient accelerated electron transport on glucose stimulation generates an H_2O_2 burst in many cell types, including the β -cells (13). Metabolism of substrates leads to reduced formation of equivalents (NADH and $FADH_2$) that predispose to increased mROS through a direct effect on the electron-transfer chain (14). Preceding studies point to the crucial role of H_2O_2 , which either acts as a transduction signal, normally coupling glucose metabolism to insulin secretion, or interrupts it depending on its concentration (7,15–17).

In this study, the pharmacological approach was highly justified because transient, moderate, and reversible mROS production was required (11). Currently, no genetic construction, even through a conditional control, permits this fine regulation. In this study, we not only found that insulin is released in a mROS dose-dependent fashion but also that mROS are absolutely required for the secretion, using different and complementary pharmacological manipulations. Our results are coherent and convergent, they moreover are consistent with those of Collins and colleagues (7), who demonstrated that glucose increases intracellular accumulation of H_2O_2 , stimulating insulin secretion in both isolated mouse islets and INS-1(832/13) cells. These results enhance the emerging view that glucose induces a transient and moderate H_2O_2 production in β -cells. This light production is made possible because a fine adapted system makes it possible to regulate the process (antioxidant defenses) (7). The discrepancies observed in the levels of ROS (either increase or decrease) in β -cells exposed to glucose reported in numerous studies (15,18,19) might be explained by the different exposure times and glucose-culture conditions; it now appears clearly that cyclic ROS production occurs in a time-dependent manner (7). One of the regulating systems operates through the nucleotide nicotinamide transhydrogenase, rapidly and actively regenerating redox balance through the supply of NADPH, which simultaneously dissipates the proton gradient (20). The light and necessary production of ROS for insulin secretion during glucose exposure might rapidly become inadequate when time exposure is no longer controlled, due to the imbalance of the redox-status regeneration, a process that is exacerbated in culture conditions.

The present data clearly point out the importance of ROS from mitochondrial origin. First, mitochondrial ROS mimic the glucose effect. Using mitochondrial blockers that increase mROS at a level similar to that of glucose, insulin secretion was identical to that produced by glucose. Second, no extramitochondrial ROS was detected in glucose and CCCP-cotreated β -cells. This compound increases respiration and diminishes mROS generation. If glucose has the ability to induce ROS production independently of the mitochondria, it might be detected in a condition that only abolishes mitochondrial ROS production (CCCP). This means that ROS produced in the time course of glucose metabolism might be solely due to mitochondria in our detection conditions. It strongly suggests that mROS are robust stimulators of insulin secretion independently of other products linked to glucose metabolism, such as NADH or ATP. Thus, even in the presence of an NADH or ATP rise, GSIS was systematically

blunted when ROS production was abolished. Unfortunately, NADPH, which is a potential mediator of GSIS, was not detectable in our experimental conditions. We cannot exclude its level changed by the manipulations used here, maybe independently of ROS.

Mitochondrial blockers triggering insulin release in our study are in contradiction with the results of Collins and colleagues (7), who conclude that the ROS might not be of mitochondrial origin. The difference is the concentrations we used, and as a result, the sole difference is based on ATP levels that were unchanged in our model but downregulated in their study. The downregulation of ATP content suggests a strong inhibition of oxidative phosphorylation and might explain the discrepancies between the two studies. The additive experiments on $[Ca^{2+}]_i$ suggest mROS production being of importance, because the addition of the antioxidant trolox to either glucose or rotenone completely abolished the Ca^{2+} mobilization. The results of Fig. 5C and D suggest mROS are important for the biphasic effect on $[Ca^{2+}]_i$ because they totally mimicked the Ca^{2+} mobilization profile seen with glucose. The exploration of the calcium origin suggests the first peak of Ca^{2+} might be of intracellular origin even through the second massive increase appears to be of extracellular one. These results are in concordance with part of the study of Krippeit-Dreus et al. (17) who had extensively studied the origin of Ca^{2+} under a concentrated H_2O_2 stimulus. Whether the Ca^{2+} influx might be due to ATP-sensitive K^+ channel (K_{ATP} channel)-induced depolarization was undertaken in this study. In this case, H_2O_2 caused the opening of the channel (the sulfonylurea tolbutamide was able to reverse the effect), and the sustained extracellular Ca^{2+} influx was shown to be due to a direct activation of L-type Ca^{2+} channels in mouse β -cells (21–23) and recently in dopamine neurons (24). These results are not in favor of the participation of the K_{ATP} channels in the second sustained increase of $[Ca^{2+}]_i$. Moreover, even if ATP levels were critical in these studies, here, the pharmacological doses of rotenone or antimycin A used were without effect on ATP levels when compared with glucose controls (5.5 mmol/l).

The β -cell depolarization is a crucial event to activate the insulin exocytotic machinery in the early phase of GSIS, and that is the reason why the ROS dependence of depolarization-stimulated Ca^{2+} mobilization was investigated. Our results indicate that mROS-stimulated insulin secretion is an extracellular Ca^{2+} -dependent process, suggesting that mROS may be involved in Ca^{2+} influx. In contrast, the evidence that the exogenous antioxidant trolox does not inhibit KCl-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase suggests that the voltage pathway works independently of the mROS pathway. These last results are in perfect concordance with those of Collins and colleagues, who did not detect an inhibition of the antioxidants on KCl-induced insulin release. Our results, combined with those of Collins and colleagues, reinforce the idea that mROS belong to the essential coupling factors for stimulating insulin secretion.

Moreover, in our experiments, putative toxic effects can be ruled out; both results of lipid peroxidation and functional tests (GSIS) were in keeping with intact islet preservation. These data support that mROS signaling is of prime importance, although the underlying mechanism(s) leading to insulin secretion is(are) far from being identified.

Strikingly, one is led to think that the classical ATP

elevation-induced K_{ATP} closure is not as determinant as has been suggested. Different putative targets might be involved, linking mROS to insulin production. First, the mitochondria itself: mitochondrial Ca^{2+} rise is in part H_2O_2 sensitive and absolutely required for insulin secretion (16,17). Second, the channels, which are involved in membrane depolarization (25). For example, transient receptor potential channels may also be potential targets because many of them are H_2O_2 sensitive (26–31).

Altogether, these data point to the complex involvement of mitochondrial metabolism in GSIS. Moreover, the consensual model of ATP as a coupling factor of nutrient-induced insulin secretion is no longer as evident as previously accepted. Finally, our findings support the idea that mROS are obligatory signaling pathways of GSIS. The mROS appear as the necessary balanced signal between NADH supply on one hand and the ATP production on the other hand. The understanding of this signaling might be of prime importance in nutritional care of energy balance and health.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, by the Agence Nationale pour la Recherche (grant 05-PNRA 004-01), and by the Programme National de Recherche sur le Diabète (grant 0602).

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

We thank Michael Healey for careful manuscript reading.

REFERENCES

- Maechler P, Wollheim CB: Role of mitochondria in metabolism-secretion coupling of insulin release in the pancreatic β -cell. *Biofactors* 8:255–262, 1998
- Turrens JF: Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552:335–344, 2003
- Dröge W: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47–95, 2002
- Rhee SG: H_2O_2 , a necessary evil for cell signalling. *Science* 312:187–188, 2006
- Benani A, Troy S, Carmona MC, Fioramonti X, Lorisignol A, Leloup C, Casteilla L, Penicaud L: Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: redox regulation of food intake. *Diabetes* 56:152–160, 2007
- Leloup C, Magnan C, Benani A, Bonnet E, Alquier T, Offer G, Carriere A, Periquet A, Fernandez Y, Ktorza A, Casteilla L, Penicaud L: Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing. *Diabetes* 55:2084–2090, 2006
- Pi J, Bai Y, Zhang Q, Wong V, Floering LM, Daniel K, Reece JM, Deeney JT, Andersen ME, Corkey BE, Collins S: Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 56:1783–1791, 2007
- Pralong WF, Bartley C, Wollheim CB: Single islet beta-cell stimulation by nutrients: relationship between pyridine nucleotides, cytosolic Ca^{2+} and secretion. *EMBO J* 9:53–60, 1990
- Marie JC, Bailbé D, Gylfe E, Portha B: Defective glucose-dependent cytosolic Ca^{2+} handling in islets of GK and nSTZ rat models of type 2 diabetes. *J Endocrinol* 169:169–176, 2001
- Dachicourt N, Serradas P, Giroix MH, Gangneveau MN, Portha B: Decreased glucose-induced cAMP and insulin release in islets of diabetic rats: reversal by IRMX, glucagon, GIP. *Am J Physiol* 271:E725–E732, 1996
- Carriere A, Carmona MC, Fernandez Y, Rigoulet M, Wenger RH, Penicaud L, Casteilla L: Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 279:40462–40469, 2004
- Casteilla L, Rigoulet M, Penicaud L: Mitochondrial ROS metabolism: Modulation by uncoupling proteins. *IUBMB Life* 52:181–188, 2001
- Bindokas VP, Kuznetsov A, Sreenan S, Polonsky KS, Roe MW, Philipson LH: Visualizing superoxide production in normal and diabetic rat islets of Langerhans. *J Biol Chem* 278:9796–9801, 2003

14. Fridlyand LE, Philipson LH: Does the glucose-dependent insulin secretion mechanism itself cause oxidative stress in pancreatic β -cells? *Diabetes* 53:1942–1948, 2004
15. Sakai K, Matsumoto K, Nishikawa T, Suefuji M, Nakamaru K, Hirashima Y, Kawashima J, Shirotani T, Ichinose K, Brownlee M, Araki E: Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic β -cells. *Biochem Biophys Res Com* 300:216–222, 2003
16. Maechler P, Jörnöt L, Wollheim CB: Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 274:27905–27913, 1999
17. Krippeit-Drews P, Kramer C, Welker S, Lang F, Ammon HP, Drews G: Interference of H_2O_2 with stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic beta-cells. *J Physiol* 514:471–481, 1999
18. Produit-Zengaffinen N, Davis-Lameloise N, Perreten H, Bécard D, Gjinovci A, Keller PA, Wollheim CB, Herrera P, Muzzin P, Assimakopoulos-Jeannet F: Increasing uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells does not alter glucose-induced insulin secretion but decreases production of reactive oxygen species. *Diabetologia* 50:84–93, 2007
19. Martens GA, Cai Y, Hinke S, Stange G, Van de Casteele M, Pipeleers D: Glucose suppresses superoxide generation in metabolically responsive pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 280:20389–20396, 2005
20. Freeman H, Shimomura K, Horner E, Cox RD, Ashcroft FM: Nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a key role in insulin secretion. *Cell Motab* 3:35–45, 2006
21. Krippeit-Drews P, Britsch S, Lang F, Drews G: Effects of SH-groups reagents on Ca^{2+} and K^+ channels currents of pancreatic B-cells. *Biochem Biophys Res Com* 200:860–866, 1994
22. Krippeit-Drews P, Lang F, Häußinger D, Drews G: H_2O_2 induced hyperpolarization of pancreatic B-cells. *Pflügers Arch* 426:552–554, 1994
23. Nagasaki M, Kakei M, Koriyama N, Tanaka H: Involvement of ATP sensitive K^+ channels in free radical-mediated inhibition of insulin secretion in rat pancreatic β -cells. *Diabetes* 44:878–883, 1995
24. Avshalomov MV, Rice ME: Activation of ATP-sensitive K_2 (KATP) channels by H_2O_2 underlies glutamate-dependent inhibition of striatal dopamine release. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11729–11734, 2003
25. Kourie JF: Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am J Physiol* 275:C1–C24, 1998
26. Miki T, Nagashima K, Tashiro F, Kotake K, Yoshitomi H, Tamamoto A, Gono T, Iwanaga T, Miyazaki J, Seino S: Defective insulin secretion and enhanced insulin action in K_{ATP} -channel-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10402–10406, 1998
27. Jacobson DA, Philipson LH: TRP channels of the pancreatic beta cell. *Handb Exp Pharmacol* 179:409–424, 2007
28. Togashi K, Hara Y, Tominaga T, Higashi T, Konishi Y, Mori Y, Tominaga M: TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J* 25:1804–1815, 2006
29. Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, Okada Y, Imoto K, Mori Y: LTRPC2 Ca^{2+} -permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell* 9:163–173, 2002
30. Qian F, Huang P, Ma L, Kutznetsov A, Tamarina N, Philipson LH: TRP genes: candidates for non-selective cation channels and store-operated channels in insulin-secreting cells. *Diabetes* 51 (Suppl. 1):S183–S189, 2002
31. Kolisek M, Beck A, Fleig A, Penner R: Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol Cell* 18:61–69, 2005

PUBLICATION 3

La publication 3, dans Journal of Neuroscience methods en 2009, a visé a mettre au point une technique de mesure de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale dans le tissu cérébral. Dans cette étude, différents modèles animaux ont été testé, (Zucker, Hyperglycémique 48h). J'ai contribué à ce travail par la mise en place du modèle de rat hyperglycémique 48h nécessitant l'implantation chirurgicale d'un cathéter dans la veine jugulaire permettant la perfusion de glucose durant 48h.



Method for functional study of mitochondria in rat hypothalamus

Alexandre Benani^{a,*}, Valentin Barquissau^a, Lionel Carneiro^a, Bénédicte Salin^b,
Anne-Laure Colombani^a, Corinne Leloup^a, Louis Casteilla^a, Michel Rigoulet^b, Luc Pénicaud^a

^a Université Paul Sabatier de Toulouse, CNRS, UMR 5241 "Métabolisme, Plasticité, Mitochondrie", BP 84 225, F-31432 Toulouse, France

^b Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, UMR 5095 CNRS/Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, France

article info

Article history:

Received 1 July 2008

Received in revised form 2 December 2008

Accepted 18 December 2008

Keywords:

Brain

Hypothalamus

Mitochondria

Respiration

Metabolism

Oxidative phosphorylation

abstract

Different roles of mitochondria in brain function according to brain area are now clearly emerging. Unfortunately, no technique is yet described to investigate mitochondria function in specific brain area. In this article, we provide a complete description of a procedure to analyze the mitochondrial function in rat brain biopsies. Our two-step method consists in a saponin permeabilization of fresh brain tissues in combination with high-resolution respirometry to acquire the integrated respiratory rate of the biopsy. In the first part, we carefully checked the mitochondria integrity after permeabilization, defined experimental conditions to determine the respiratory control ratio (RCR), and tested the reproducibility of this technique. In the second part, we applied our method to test its sensitivity. As a result, this method was sensitive enough to reveal region specificity of mitochondrial respiration within the brain. Moreover, we detected physiopathological modulation of the mitochondrial function in the hypothalamus. Thus this new technique that takes all cell types into account, and does not discard or select any mitochondria sub-population is very suitable to analyze the integrated mitochondrial respiration of brain biopsies.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Over the last decade, research on mitochondrial function has been greatly enlarged, supported by availability of new specific tools, including mitochondrial tracers, or targeted mitochondrial pharmaceuticals (Foster et al., 2006), and by development of original techniques, such as mitochondrial proteomics (Mathy and Suse, 2008). As a result, mitochondria is currently no more viewed only as an ubiquitous energy supplier of cell, but rather as a receiver/integrator organelle involved in numerous cell signaling pathways such as apoptosis, cell-cycle control, development, antiviral responses, and metabolism (Goldenthal and Marin-García, 2004; McBride et al., 2006). Moreover, mitochondria can achieve different tissue-specific functions, according to its composition (Scarpulla, 2008).

In the brain, recent findings have established original roles of mitochondria in physiological process such as neuronal maturation (Schuchmann et al., 2005), neuronal plasticity (Vaynman et al., 2006; Mattson, 2007), glutamate metabolism (Nicholls et al., 2007), and nutrient sensing (Leloup et al., 2006; Benani et al., 2007). Moreover, analysis of brain mitochondrial function has brought novel molecular basis in some neurodegenerative processes. Specifically, chronic dysfunction of complex I or II is being considered

as potential cause of Parkinson's disease and Huntington's disease, respectively (Beal, 2000). Furthermore, increased ROS levels from stressed mitochondria could be involved in the development of Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, and could enhance hypoxia/ischemia-mediated neuronal injury (Moro et al., 2005; Lin and Beal, 2006).

Quantitative analytical methods of the oxidative phosphorylation of mitochondria can provide a better understanding of physiological process and development of pathologies. Up to now, functional analyses of oxidative phosphorylation and other bioenergetic properties of mitochondria were based on respiratory responses to conventional substrate-inhibitor titrations (Sperl et al., 1997). This requires that pharmacological compounds can efficiently reach the mitochondria. As a result, such investigations in brain have been conducted on neural cell homogenates (Atlante et al., 1998) or on preparation of isolated mitochondria either from primary cell culture (Almeida and Medina, 1997; Kristján et al., 2006), or from freshly dissected brain explants (Moreira et al., 2006). However, several flaws may possibly be generated during the course of the mitochondria isolation procedure from brain as it occurs with others tissues (Rustin et al., 1994). Above all, sub-cellular fractionation can discard sub-population of mitochondria (Riva et al., 2005), and the respirometry analysis might be then not representative for the total pool of mitochondria. Moreover, isolation of a sufficient working amount of mitochondria requires large tissue/cell samples because of the limited yield of purification methods (Rasmussen et al., 1997; Lobão-Soares et al., 2005; Kristján et al., 2006). This can become technically challenging in

* Corresponding author. Tel.: +33 5 62 17 08 91; fax: +33 5 62 17 09 05.
E-mail address: benania@toulouse.inserm.fr (A. Benani).

attempt to study small specific brain area or nucleus in rodents. In this regard, permeabilization protocols have been developed to directly assess mitochondrial function within tissues without steps of homogenization, centrifugation, and extraction. This has been widely used in muscle studies (Sperl et al., 1997; Kuznetsov et al., 2008), and it was recently applied to primary culture of cortical neurons (Safulina et al., 2004).

Here, we propose a method that directly assesses the mitochondrial function in freshly dissected brain tissues using a permeabilization protocol in combination with high-resolution respirometry. We first verified structural and functional integrity of mitochondria within the permeabilized brain biopsy. We focused on the hypothalamus nucleus because recent data obtained by our laboratory and others pointed out the role of mitochondria located in this specific area in brain nutrient sensing (Leloup et al., 2006; Benani et al., 2007; Coppola et al., 2007; Parton et al., 2007). We then completed pharmacological settings in order to characterize specific state 3, state 4 (as defined by Chance and Williams, 1955), and respiratory control ratio (RCR) of this tissue. We also tested reproducibility of our method and compared RCR of different brain areas. Finally, an additional study revealed that this method was sensitive enough to detect physiopathological modulation of the mitochondrial function within the hypothalamus depending on the whole body energy state.

2. Materials and methods

2.1. Mediums

Mediums were prepared according to the guide provided by Oroboros Instruments (Innsbruck, Austria), the respirometer manufacturer. Technical sheets are available as pdf files on the web site at <http://www.orooboros.at/>. Briefly, solution A contained 250 mM sucrose, 1 g/L BSA, 0.5 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4. Solution B (also named "Biops medium") contained 20 mM taurine, 15 mM phosphocreatine, 20 mM imidazole, 0.5 mM DTT, 10 mM CaEGTA, 0.1 M free Ca, 5.77 mM ATP, 6.56 mM MgCl₂, 50 mM K-MES, pH 7.1. Solution C (also named "Mitomed R05") contained 0.5 mM EGTA, 60 mM K-lactobionate, 20 mM taurine, 10 mM KH₂PO₄, 3 mM MgCl₂, 110 mM sucrose, 1 g/L fatty acid free BSA, 20 mM hepes, pH 7.1.

2.2. Animals

All procedures involving rats were in strict accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC), and were reviewed by our local committee for care and use of laboratory animals. The study was performed on male Wistar Han rats (275–300 g) purchased from Harlan Laboratories. An additional experiment was performed on lean (Fa/?; 290 g) and obese non-diabetic (fa/fa; 360 g) male Zucker rats. They were housed under a 12 h/12 h light/dark cycle (light on at 7 h) on an average ambient temperature of 22 °C. They had free access to standard laboratory chow (cat. number 2016, Harlan) and tap water. When required, rats were subjected to an 18 h-fasting overnight.

2.3. Hyperglycemia induction

Unrestrained rats were subjected to a long-term infusion of glucose in the right carotid, as previously described (Laury et al., 1991). The infusion period started on day 2 after surgery and lasted 2 days. Infusion of 30% glucose (Sigma), at rate of 50 μL/min, induced hyperglycemia (around 20 mM) for 48 h. Control rats received saline (NaCl 0.9%).

2.4. Tissue permeabilization

The brain tissues permeabilization protocol was adapted from that of muscle fibers, available on the web site of orooboros ([link: http://www.orooboros.at/index.php?id=protocols#c854](http://www.orooboros.at/index.php?id=protocols#c854)). For tissue collection, rats were killed by cervical dislocation. Brains were quickly removed and placed in 15 mL of cold solution A. After dissection, brain tissues were weighted and transferred into Petri dishes containing 1 mL of cold solution B. The whole dissected brain structure, i.e. hypothalamus, olfactory bulb, or cortex, was cut into small longitudinal pieces (1 mm × 1 mm × 2 mm). Medium was replaced by 2 mL of cold solution B complemented with 20 μL of a freshly prepared 5 mg/mL saponin solution. After 30 min at 4 °C under gentle agitation, samples were rinsed in cold solution C (3 × 2 min), and further incubated 2 h at 4 °C under gentle agitation.

2.5. O₂ consumption measurement

Oxygen consumption was measured using a respirometer equipped with a Peltier thermostat, Clark type electrodes, and integrated electromagnetic stirrers (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments). Measurements were performed with continuous stirring (750 rpm) in 2 mL of solution C at 30 °C. The medium was equilibrated with air for 30 min, and permeabilized brain tissues were transferred into the respirometer glass chambers. After stabilization of the initial oxygen consumption, mitochondrial respiration was stimulated by successive addition of substrates (10–30 mM glutamate, 2–4 mM malate), and 0.01–3 mM ADP (apparent state 3 respiration). 2–6 μg/ml oligomycin, an ATP synthase inhibitor, and 2.5–7.5 μM antimycin A, a complex III inhibitor, were further added to block ATP synthesis (apparent state 4 respiration) and the mitochondrial respiration, respectively. Oxygen consumption was calculated using DataGraph software (Oroboros Instruments).

2.6. Electron microscopy

Samples were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2 at 4 °C for 4 h, and postfixed overnight with 1% osmic acid in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2. Samples were then dehydrated in acetone, stained with 2% uranyl acetate in acetone for 2 h at 4 °C in a dark room, and embedded in epoxy resin (Araldite, Fluka). Ultrathin sections were contrasted with 2% lead citrate in water for 1 min, and were observed with a Hitachi 7650 transmission electron microscope.

2.7. Statistical analysis

Datas are reported as the mean ± S.E.M. Comparisons of groups were made using a non-paired Student's t-test or a Mann-Whitney U-test, as appropriate after analysis of variance, and differences among groups were considered as significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Integrity of mitochondrial morphology and function in saponin permeabilized hypothalamus

Electronic microscopy was used to compare the mitochondrial ultrastructure of fresh and permeabilized brain tissues. We observed that the usual "two membranes plus inside cristae" organization was conserved after permeabilization of biopsies (Fig. 1A). Moreover size of mitochondria did not appreciably differ. We performed three pharmacological tests to further evaluate integrity of mitochondrial membranes. Upon injury of the outer mitochondrial membrane, dissociation of cytochrome c from the inner mitochondrial membrane is favored by high concentration of salts, reducing

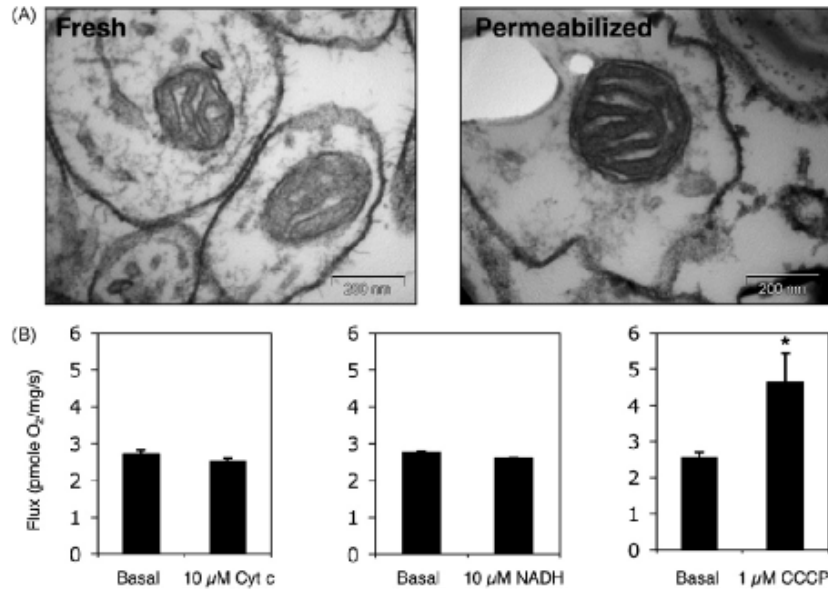


Fig. 1. Mitochondrial morphology and function in saponin permeabilized hypothalamus. (A) Images of mitochondrial ultrastructure by electron microscopy on fresh and permeabilized hypothalamus. (B) Respiratory rates of permeabilized hypothalamus after 10 μM cytochrome c, 10 μM NADH, 1 μM CCCP addition. Values are mean ± S.E.M. (n=6). *Significant difference from basal (p<0.05).

consequently the respiratory flux. Addition of 10 μM cytochrome c did not modify the respiratory rate of biopsies (Fig. 1B), indicating that tissue permeabilization did not induce depletion of cytochrome c, and thus did not affect outer mitochondrial membrane. In physiological conditions, NADH cannot diffuse from cytosol toward the mitochondrial matrix unless injury of the inner mitochondrial membrane. As expected, addition of 10 μM NADH did not increase the respiratory rate of biopsies (Fig. 1B), indicating that the inner mitochondrial membrane was also preserved. By contrast, 1 μM CCCP, a chemical uncoupler, was sufficient to accelerate the respiratory rate of biopsies (Fig. 1B), suggesting the functional coupling of the oxidative phosphorylation system in permeabilized brain biopsies.

3.2. Pharmacological setup for respirometry analysis on permeabilized hypothalamus

In the first set of experiments, we tested whether the intensity of the O₂ flux was proportional to the quantity of the brain tissue. We observed a good linearity of signal between the detected basal respiration and the mass of tissue (Fig. 2A). The range of linearity was comprised between 8 and 65 mg of tissue ($r^2=0.87$). In the second set of experiments, we defined pharmacological conditions to assess the mitochondrial respiratory capacity. This requires saturating concentrations of substrates to supply the respiratory chain, and of adenylates to supply the coupled phosphorylation complex. Therefore, we performed titrations with the usual combination of glutamate plus malate, and ADP on half-hypothalamus weighting around 28–30 mg to determine the specific non-phosphorylating (substrate-driven) respiration and the state 3 (substrates/ADP-stimulated) respiration, respectively. In hypothalamus, non-phosphorylating respiration was reached after addition of 20 mM glutamate (Fig. 2B), whereas malate failed to further increase the O₂ consumption even at high concentration, i.e. 4 mM (Fig. 2C). Apparent state 3 was obtained after supplementary addition of 1 mM ADP (Fig. 2D). We then added oligomycin, an ATP synthase inhibitor, in order to obtain the ADP-independent

apparent state 4 while respiration is only driven by substrates. Maximal inhibition of ATP synthase was achieved with the conventional 2 μg/mL dose (Fig. 2E). This apparent state 4 was similar to the respiration flux measured after substrate addition indicating that endogenous adenylates were all washed out after permeabilization. Finally antimycin A, a complex III inhibitor, was added as a control to ensure that the measured O₂ consumption corresponded to the mitochondrial respiration. Addition of 2.5 μM antimycin A was sufficient to procure full inhibition of the mitochondrial respiration (Fig. 2E). As a result, we propose the following sequence: 20 mM glutamate + 1 mM ADP + 2 μg/ml oligomycin + 2.5 μM antimycin A, to determine specific respiratory control ratio (RCR) of permeabilized brain tissues, defined as the state 3/state 4 ratio. As significant O₂ consumption still persisted after antimycin treatment, subtraction of the non-mitochondrial O₂ consumption from apparent states 3 and 4 was done in order to acquire specific respiratory chain-related states 3 and 4, and deduced RCR.

3.3. Region-specific mitochondrial function in the brain

We carried out the above pharmacological protocol on several half-hypothalamic biopsies and obtained similar respiratory profile (Fig. 3A). We found satisfactory reproducibility of this method, as standard deviations of each pharmacological step did not exceed more than 16% for six animals. Results are summarized in the Fig. 3B. We deduced the specific RCR of hypothalamus at 2.37 ± 0.35 . We then conducted the same pharmacological analysis on other brain areas, such as olfactory bulbs and cerebral cortex (Fig. 3C). This method pointed out significant difference in the mitochondrial respiratory function among distinct brain structures since the olfactory bulbs displayed a higher RCR (4.46 ± 0.45) than the hypothalamic one. RCR of the cerebral cortex (2.08 ± 0.18) was not different from the hypothalamic RCR. To further characterize the hypothalamic mitochondrial respiration, titration with ADP was performed (Fig. 3D) and the apparent affinity of respiration for ADP was deduced as $K_m = 0.05 \pm 0.01$.

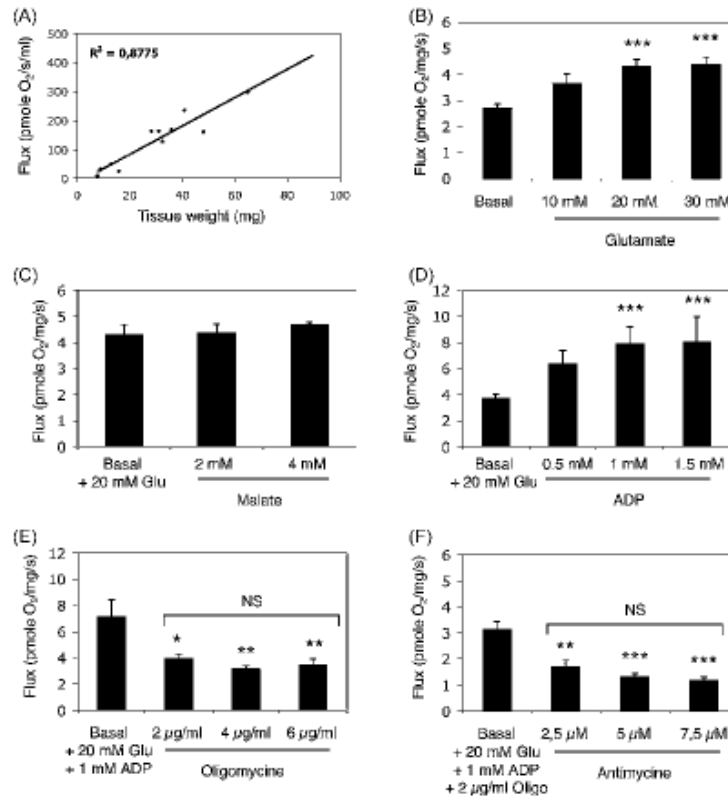


Fig. 2. Pharmacological settings to define hypothalamic respiratory control ratio. (A) Linear relation between detected O₂ consumption and tissue weight. (B) Saturating glutamate concentration to achieve the non-phosphorylating respiration. (C) Effect of malate addition on the hypothalamic respiration. (D) Saturating ADP concentration to achieve state 3 respiration. (E) Full inhibition of ATP synthase by oligomycine gives state 4 respiration. (F) Inhibition of total mitochondrial respiration by the complex III blocker, antimycine. Values are mean \pm S.E.M. (n = 6). *, ** and *** Significant difference from control rats (p < 0.05; p < 0.01; p < 0.001 respectively); NS, no significant.

3.4. Modulation of the hypothalamic mitochondrial function by the metabolic status

We finally carried out the pharmacological analysis of the hypothalamic respiration under fasting, hyperglycemia, and genetic obesity. These three distinct conditions represent experimental models of physiological and pathological changes in the whole body energy metabolism. We calculated hypothalamic RCR in each condition (Fig. 4). During fasting, the hypothalamic RCR was significantly increased by 1.6-fold reaching 3.85 ± 0.25 . Hyperglycemia induced a dramatic increase of the RCR by 2.4-fold, corresponding to 5.73 ± 0.61 . Hypothalamic RCR in lean and obese Zucker was similar (2.87 ± 0.21 vs. 2.97 ± 0.18 , respectively), and not significantly different of that of the Wistar strain.

4. Discussion

Functional analyses of the bioenergetic properties of brain mitochondria can provide a better understanding of the biological mechanisms that occur during normal brain function as well as during neuropathology. In this regard we adapted to brain biopsies a standard procedure that allows the quantitative study of the oxidative phosphorylation. This procedure is based on a permeabilization and washing preparative step of tissue coupled with a substrate-inhibitor titration using high-resolution respirometry. In this article we describe the procedure and attest that the method can be successfully applied to the brain with respect to the mitochondria

integrity. More interesting, this method is sensitive enough to reveal specific modulation of brain mitochondria function under both physiological and pathological conditions.

The adaptation of the permeabilization protocol first required to carefully check the integrity of the mitochondria. Ultramicroscopic images revealed that both outer and inner mitochondrial membranes were clearly identifiable and intact, and the mitochondrial matrix displayed no signs of osmotic swelling or damage. This is consistent with the complementary pharmacological tests, which demonstrate the functional integrity of the organelle. Other tests (not shown) were conducted to define experimental conditions to ensure the reproducibility and the stability of the oxygen flux detected by respirometry. A 2 h-incubation in cold medium before oxygen measurement was necessary to obtain the complete wash out of endogenous substrates and nucleotides, giving invariable basal oxygen consumption. A shorter incubation, i.e. 15 min as already used for muscle biopsies (Sperl et al., 1997), produced too high variability in the basal oxygen consumption. In contrast, a longer incubation (18 h) led to an invariable but reduced basal oxygen consumption. All respirometry experiments were performed at 30 °C. This allowed long lasting analysis of the oxygen flux superior to 1 h. Oxygen flux measured at 37 °C was higher but displayed a significant decline over the time. Finally pharmacological titrations of the respiratory chain with substrates and inhibitors were adapted to brain biopsies, in respect to the specific enzymatic equipment of this tissue. Concentrations of glutamate required to saturate the mitochondrial respiratory capacity were higher than that of muscle

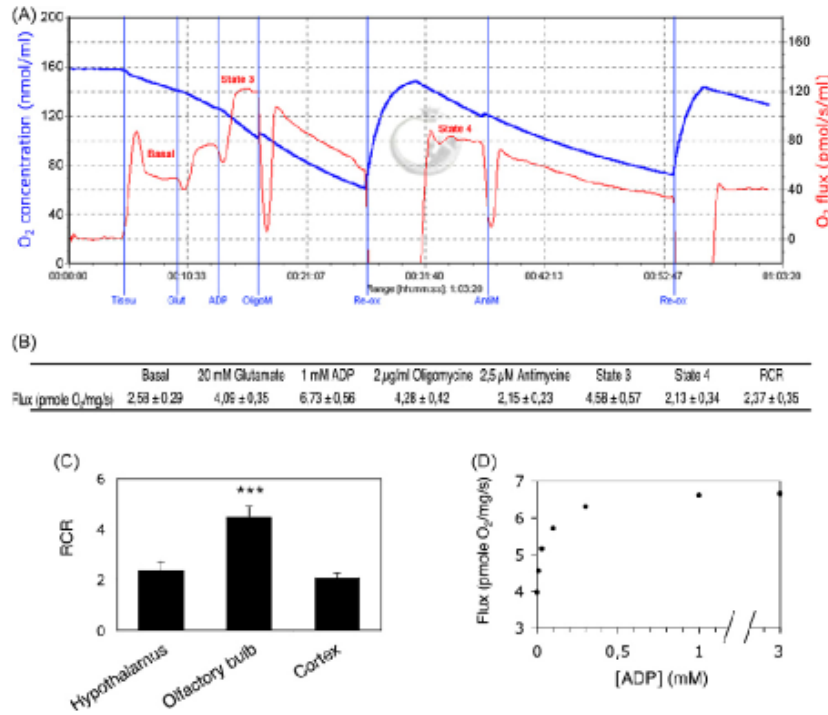


Fig. 3. Determination of respiratory control ratio from distinct brain biopsies. (A) Oxygraphic trace of mitochondrial respiration in permeabilized rat hypothalamic biopsies. Investigation of mitochondrial function by multiple substrate-inhibitor titration (Glut, 20 mM glutamate; ADP, 1 mM ADP; OligoM, 2 μg/ml oligomycin; Re-ox, re-oxygenation; AntIM, 2.5 μM antimycin). Left axis, O₂ concentration in the chamber; right axis, rate of respiration (time derivative of the signal). (B) Mean respiratory rates in six permeabilized hypothalamic biopsies in presence of glutamate, ADP, oligomycin, or antimycin. (C) Respiratory control ratio from hypothalamus, olfactory bulbs, and cortex. Values are mean ± S.E.M. (n = 6). ***Significant difference (p < 0.001). (D) Titration with ADP increasing O₂ consumption (n = 3 experiments).

(Saks et al., 1998), confirming the well-established physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation (Benard et al., 2006). Our particular observations are probably related to specific brain metabolic properties. For instance, mitochondrial glutamate dehydrogenase is particularly active in astrocytes, preventing glutamate-induced neurotoxicity (Zaganas et al., 2001; Duchen, 2004). In brain biopsies, malate failed to stimulate the respiratory flux. Previous studies have shown that brain mitochondria efficiently utilize glutamate by oxidative deamination without addition of malate, which is only required for oxidation of pyruvate

(Ozawa et al., 1966; Katyare et al., 1977). In our study, the saturating dose of ADP required for reaching state 3 was 1 mM. It was similar to that previously defined for primary cultures of rat cerebellar and cortical neurons, and astrocytes, i.e. between 0.5 and 2 mM (Atlante et al., 1998; Safiulina et al., 2004; Kristián et al., 2006), but also for muscle (Sperl et al., 1997; Saks et al., 1998; Kuznetsov et al., 2008). Moreover, 100 μM AP5A, an adenylate kinase inhibitor, produced a non-significant 4.2 ± 1.4% decrease in the state 3 respiration (n = 3 experiments), suggesting that adenylate kinases cannot greatly account for the ADP consumption. Therefore, we did not over-estimate the required ADP concentration in regard to adenylate kinases activities. Finally, the apparent affinity of respiration for ADP, which was Km = 0.05 ± 0.01, was also comparable to that of muscle even if it could vary from 0.02 to 0.3 mM according to fibers and species (Saks et al., 1998; Birkedal and Gesser, 2003). Conventional dose of oligomycin (2 μg/ml) and antimycin A (2.5 μM) was sufficient to achieve their full inhibitory effect. Using this adapted pharmacological sequence we have defined RCR of brain biopsies between 2.37 and 4.46 in physiological conditions, according to brain areas. A distinct pharmacological strategy was carried out using 5 μM carboxy-atractylate (CAtr) to acquire the state 4 respiration and the consecutive RCR. CAtr is a highly selective inhibitor of cytosolic side-specific mitochondrial ADP/ATP carrier, i.e. adenine nucleotide translocase (ANT), which prevents the transfer of adenosine nucleotides into the mitochondrial matrix. Similar RCR value was obtained using either CAtr or oligomycin confirming our methodology. Others previous studies focused on brain metabolism showed higher RCR (Almeida and Medina, 1998; Atlante et al., 1998; Kristián et al., 2006). However, we noticed that the RCR value could be technically challenged depending on the temperature of the

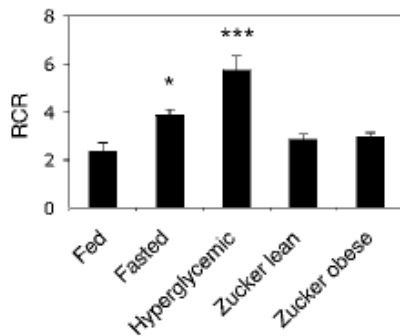


Fig. 4. Modulation of hypothalamic respiratory control ratio by the nutritional status. Hypothalamic RCRs were calculated in fed, fasted or hyperglycemic Wistar rats, and compared with those of lean or obese Zucker rats. Values are mean ± S.E.M. (n = 6). * and ***Significant difference from fed rats (p < 0.05 and p < 0.001, respectively).

assay. Under a 37 °C-controlled experimental condition as set in these earlier studies, state 4 is lower due to a rapid inherent decline of the basal respiration, increasing the RCR. Above all, we show that distinct brain areas displayed specific RCR, which can explain the discrepancy among studies. The apparent heterogeneity in the mitochondrial function within brain areas should be certainly correlated to the intrinsic cell diversity and composition of each area. In this way earlier studies have shown difference in oxidative phosphorylation between astrocytes and neurons (Almeida and Medina, 1997; Waagepetersen et al., 1999). Even more, morphology of mitochondria and composition of the respiratory chain of these two cell types are singular (Bolaños et al., 1995; Kristián et al., 2006). Recent data indicates also that mitochondria size and mass are not the same for all neurons, which can enhance the region specificity of the brain mitochondrial function (Liang et al., 2007). Therefore, our new technique that takes all cell type into account, and does not discard or select any mitochondria sub-population is very suitable to analyze the integrated mitochondrial respiration of brain biopsies.

By using such protocol, we demonstrated that the hypothalamic mitochondrial function could be affected in some conditions in which the whole body energy status is altered. Relevance of such findings remains to be elucidated. However, this is consistent with recent observations showing that some mitochondrial-triggered hypothalamic tasks could be modulated or altered by the nutritional status. During fasting, brain lipid sensing is abolished by an increase in the hypothalamic mitochondrial uncoupling (Benani et al., 2007). Moreover, fasting-induced UCP2 activation in NPY neurons is critical for increased excitability of these orexigenic neurons and consequent rebound feeding following food deprivation (Coppola et al., 2007). Fasting-induced uncoupling is probably due to the persistent and massive increase in circulating non-esterified fatty acids during lipolysis, which act as mitochondrial uncouplers and enhance UCPs activity (Sluse et al., 2006; Andrews et al., 2005). In the present study, the complete wash out of brain biopsies in BSA-containing medium limits interference with extrinsic regulatory molecules such as fatty acids. Accordingly, the constitutive increase in RCR value in hypothalamus after fasting revealed in this study could compensate the fatty acid-stimulated UCP2 activity to avoid a noxious drop in ATP synthesis. Besides, chronic UCP2-mediated loss of glucose sensing in glucose-excited neurons might have a pathogenic role in the development of type 2 diabetes (Parton et al., 2007). Finally, efficient coupling within hypothalamic cells seems to be crucial to the regulation of the energy homeostasis. Our technique that allows direct pharmacological analysis of the respiratory chain could bring more details to strengthen this concept.

Acknowledgments

This work was supported by the grant numbers ANR-05-PNRA-004 and ANR-05-BLAN-0339 from the Agence Nationale de la Recherche. We wish to thank the Zootechnique Department, especially Christine Fourreau and Xavier Sudre for their special care for animals.

References

- Almeida A, Medina JM. Isolation and characterization of tightly coupled mitochondria from neurons and astrocytes in primary culture. *Brain Res* 1997;764(1–2):167–72.
- Almeida A, Medina JM. A rapid method for the isolation of metabolically active mitochondria from rat neurons and astrocytes in primary culture. *Brain Res Brain Res Protoc* 1998;2(3):209–14.
- Andrews ZB, Diano S, Horvath TL. Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: in support of function and survival. *Nat Rev Neurosci* 2005;6(11):829–40.
- Atlante A, Gagliardi S, Marra E, Calissano P. Neuronal apoptosis in rats is accompanied by rapid impairment of cellular respiration and is prevented by scavengers of reactive oxygen species. *Neurosci Lett* 1998;245(3):127–30.
- Beal MF. Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 2000;23(7):298–304.
- Benani A, Troy S, Carmona MC, Fioramonti X, Lorisignol A, Leloup C, et al. Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: redox regulation of food intake. *Diabetes* 2007;56(1):152–60.
- Benard G, Faustin B, Passerieux E, Galinier A, Rocher C, Bellance N, et al. Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *J Physiol Cell Physiol* 2006;291(6):C1172–82.
- Birkedal R, Gesser H. Creatine kinase and mitochondrial respiration in hearts of trout, cod and freshwater turtle. *J Comp Physiol* 2003;173(6):493–9.
- Bolaños JP, Heales SJ, Land JM, Clark JB. Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurons and astrocytes in primary culture. *J Neurochem* 1995;64(5):1965–72.
- Chance B, Williams GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J Biol Chem* 1955;217(1):383–93.
- Coppola A, Liu ZW, Andrews ZB, Paradis E, Roy MC, Friedman JM, et al. A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell Metab* 2007;5(1):21–33.
- Duchen MR. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med* 2004;25(4):365–451.
- Foster KA, Geleff F, Gerich FJ, Turner DA, Müller M. Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria during oxidative stress and neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 2006;79(3):136–71.
- Goldenthal MJ, Marin-García J. Mitochondrial signaling pathways: a receiver/integrator organelle. *Mol Cell Biochem* 2004;262(1–2):1–16.
- Katyare SS, Joshi MV, Fatterpaker P, Sreenivasan A. Effect of thyroid deficiency on oxidative phosphorylation in rat liver, kidney, and brain mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1977;182(1):155–63.
- Kristián T, Hopkins IB, McKenna MC, Fiskum G. Isolation of mitochondria with high respiratory control from primary cultures of neurons and astrocytes using nitrogen cavitation. *J Neurosci Methods* 2006;152(1–2):136–43.
- Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 2008;3(6):965–76.
- Laury MC, Takao F, Bailbe D, Penicaud L, Portha B, Picon L, et al. Differential effects of prolonged hyperglycemia in vivo and in vitro insulin secretion in rats. *Endocrinology* 1991;128(5):2526–33.
- Leloup C, Magnan C, Benani A, Bonnet E, Alquier T, Offer G, et al. Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing. *Diabetes* 2006;55(7):2084–90.
- Liang CL, Wang TT, Luby-Phelps K, German DC. Mitochondria mass is low in mouse substantia nigra dopamine neurons: implications for Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2007;203(2):370–80.
- Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 2006;443(7113):787–95.
- Lobbo-Saeres B, Bianchin MM, Linhares MN, Carqueja CL, Tasca CI, Souza M, et al. Normal brain mitochondrial respiration in adult mice lacking cellular prion protein. *Neurosci Lett* 2005;375(3):203–6.
- Mathy G, Suse FE. Mitochondrial comparative proteomics: strengths and pitfalls. *Biochim Biophys Acta* 2008;1777(7–8):1072–7.
- Mattson MP. Mitochondrial regulation of neuronal plasticity. *Neurochem Res* 2007;32(4–5):707–15.
- McBride HM, Neuspil M, Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol* 2006;16(14):551–60.
- Moreira PI, Rolo AP, Sena C, Seica R, Oliveira CR, Santos MS. Insulin attenuates diabetes-related mitochondrial alterations: a comparative study. *Med Chem* 2006;2(3):299–308.
- Moro MA, Almeida A, Bolaños JP, Lizasoain I. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. *Free Radic Biol Med* 2005;39(10):1291–304.
- Nicholls DG, Johnson-Cadwell L, Vesce S, Jakabsons M, Yadava N. Bioenergetics of mitochondria in cultured neurons and their role in glutamate excitotoxicity. *J Neurosci Res* 2007;85(15):3206–12.
- Ozawa K, Seta K, Takeda H, Ando K, Handa H, Araki C. On the isolation of mitochondria with high respiratory control from rat brain. *J Biochem* 1966;59(5):501–10.
- Parton LE, Ye CP, Coppari R, Enrietti PJ, Choi B, Zhang CY, et al. Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 2007;449(7159):228–32.
- Rasmussen HN, Andersen AJ, Rasmussen UF. Optimization of preparation of mitochondria from 25–100 mg skeletal muscle. *Anal Biochem* 1997;252(1):153–9.
- Riva A, Tandler B, Loffredo F, Vazquez E, Hoppel C. Structural differences in two biochemically defined populations of cardiac mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289(2):H868–72.
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gérard B, Rötig B, Saudubray JM, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 1994;228(1):35–51.
- Safilina D, Kaasik A, Seppet E, Peet N, Zharkovsky A, Seppet E. Method for in situ detection of the mitochondrial function in neurons. *J Neurosci Methods* 2004;137(1):87–95.
- Saks VA, Veksler VI, Kuznetsov AV, Kay L, Sikk P, Tiivel T, et al. Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo. *Mol Cell Biochem* 1998;184(1–2):81–100.
- Scarpulla RC. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev* 2008;88(2):611–38.
- Schuchmann S, Buchheim K, Heinemann U, Hosten N, Buttgerief F. Oxygen consumption and mitochondrial membrane potential indicate developmental adaptation in energy metabolism of rat cortical neurons. *Eur J Neurosci* 2005;21(10):2721–32.

- Suse FE, Jarmuszkiewicz W, Navet R, Douette P, Mathy G, Suse-Goffart CM. Mitochondrial UCPs: new insights into regulation and impact. *Biochim Biophys Acta* 2006;1757(5–6):480–5.
- Sperl W, Skladal D, Gnaiger E, Wyss M, Mayr U, Hager J, et al. High resolution respirometry of permeabilized skeletal muscle fibers in the diagnosis of neuromuscular disorders. *Mol Cell Biochem* 1997;174(1–2):71–8.
- Vaynman S, Ying Z, Wu A, Gomez-Pinilla F. Coupling energy metabolism with a mechanism to support brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity. *Neuroscience* 2006;139(4):1221–34.
- Waagepetersen HS, Sonnewald U, Qu H, Schousboe A. Mitochondrial compartmentation at the cellular level: astrocytes and neurons. *Ann NY Acad Sci* 1999;893:421–5.
- Zaganas I, Waagepetersen HS, Georgopoulos P, Sonnewald U, Pliatakis A, Schousboe A. Differential expression of glutamate dehydrogenase in cultured neurons and astrocytes from mouse cerebellum and cerebral cortex. *J Neurosci Res* 2001;66(5):909–13.

PUBLICATION 4

Dans la publication 3, j'ai contribué au travail d'Anne Laure Colombani publié en 2009 dans *Diabetes*, en participant aux tests fonctionnels utilisés dans l'étude : injection carotidienne de glucose pour la détection hypothalamique du glucose, ainsi qu'aux dosages d'EAOs. Ce travail a permis de montrer un défaut de la signalisation par les EAOs au niveau hypothalamique, responsable d'une altération de la détection hypothalamique du glucose dans le rat obèse Zucker.

Enhanced Hypothalamic Glucose Sensing in Obesity: Alteration of Redox Signaling

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

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

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

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

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

From the ¹Métabolisme, Plasticité et Mitochondrie, Unité Mixte de Recherche 5241, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paul Sabatier, Toulouse, France; and the ²Physiopathologie de la Nutrition, Unité Mixte de Recherche 7059, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Denis Diderot, Paris, France.

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

Received 25 January 2009 and accepted 22 June 2009.

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

DOI: 10.2337/db09-0110.

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

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

diabetes.diabetesjournals.org

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

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

RESEARCH DESIGN AND METHODS

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

DIABETES, VOL. 58, OCTOBER 2009 2189

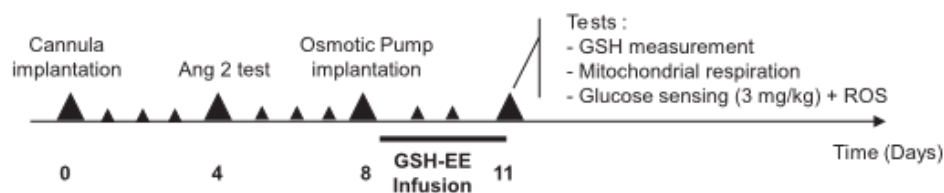


FIG. 1. Schematic representation of experimental procedure for reduced glutathione infusion (GSH-EE, reduced glutathione ethyl ester).

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

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

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

Mitochondrial extraction. Animals were killed by cervical dislocation. Brains were removed and immediately immersed in ice-cold PBS-HEPES (5 mmol/l). Dissected tissues were immersed for 15 min in a buffer A (10 mmol/l HEPES, 10 mmol/l KCl, 240 mmol/l sucrose, protease inhibitor cocktail tablet [complete Mini; Roche, Meylan, France]) and homogenized with a dounce homogenizer (7.5 μ l/10 mg tissues of buffer A). The homogenate was resuspended in 125 μ l/10 mg tissues of buffer A and centrifuged (1,000 \times g, 10 min, 4°C). The supernatant was centrifuged (12,000 \times g, 10 min, 4°C). The remaining mitochondrial pellet was resuspended either in 8.2 μ l/10 mg tissues of buffer B (10 mmol/l HEPES, 420 mmol/l NaCl, 0.5 mmol/l Dithiothreitol, and protease inhibitor cocktail tablet) for Western blot analysis or in 16.5 μ l/10 mg tissues of Mitomed R05 solution (0.5 mmol/l EGTA, 60 mmol/l K-Lactobionate, 20 mmol/l Taurine, 10 mmol/l KH₂PO₄, 3 mmol/l MgCl₂, 110 mmol/l sucrose, 1 g/l free fatty acid BSA, 20 mmol/l HEPES, and pH 6.7.1) for O₂ consumption measurement.

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

O₂ consumption measurement on mitochondria. Oxygen consumption was measured using a respirometer (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) as previously described (22). Measurements were taken with stirring (750 rpm) in 2 ml of Mitomed R05 at 30°C. The medium was equilibrated with air for 30 min, and mitochondria (200 μ g) were transferred into the respirometer's glass chambers. Mitochondrial respiration was stimulated by the successive addition of substrates 1, 5, and 20 mmol/l glutamate to

achieve the apparent state 2. Then, 0.1 mmol/l ADP was added to achieve the apparent state 3 respirations. Next, 5 μ mol/l carboxyatractylate (CAtr) was added to block ATP synthesis and achieve the apparent state 4 respiration. Finally, 1 μ mol/l potassium cyanide (KCN) was added to obtain the nonmitochondrial O₂ consumption. Mitochondrial states 2, 3, and 4 were calculated by subtracting the nonmitochondrial O₂ consumption from apparent states. The respiratory control ratio (RCR) was the state 3-to-state 4 ratio. Uncoupled respiration was assessed using glutamate (20 mmol/l), CAtr (5 μ mol/l), and palmitate (300 μ mol/l) stimulation. Carbonyl cyanide *m*-trichlorophenylhydrazone (CCCP, 0.4 μ mol/l), a chemical uncoupler, was used to measure the maximal respiration. Oxygen consumption was calculated using DataGraph software. Media were prepared according to the guide provided by Oroboros Instruments. Technical sheets are available on the company Web site at <http://www.orooboros.at/>.

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

Aconitase activity measurement. Maximum aconitase activity measurement was performed using a protocol already described (24). The photochrome was measured at 525 nm using the UVIKON Spectrophotometer 922. **Enzymatic and nonenzymatic antioxidant.** Tissue pieces were homogenized in a lysis saline solution (3 mmol/l EDTA, 150 mmol/l KCl, and pH 6.7.4). Homogenates (50 μ l) mixed with 450 μ l of 5% metaphosphoric acid were then centrifuged (1,500 \times g, 10 min, 4°C). Final supernatant was used for glutathione and antioxidant enzyme assays. Glutathione assay was performed by reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) as previously described (25). Total glutathione (GSx) was the sum of reduced glutathione (GSH) and twofold oxidized glutathione (GSSG) concentrations ([GSx] = [2 \times GSSG] + [GSH]). We then calculated the redox state of glutathione as (GSSG/GSx) \times 100. Superoxide dismutase (SOD) activity (manganese superoxide dismutase [MnSOD] and Cu/Zn SOD) was assayed using the inhibition of pyrogallol autoxidation (26). One enzymatic unit of SOD activity was defined as the amount of enzyme that inhibited pyrogallol autoxidation by 50%. Glutathione peroxidase (GPx) activity was measured using t-butylhydroperoxide as substrate (27). One enzymatic unit of GPx activity corresponds to the oxidation of 1 mmol of NADPH/min.

Mitochondrial quantification. Citrate synthase assay was measured according to the procedure of Seere (28): one enzymatic unit of citrate synthase was equal to the reduction of 1 mmol of 5-5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid per min. **Cytochrome oxidase activity.** Fresh hypothalami were homogenized in cold buffer (0.25 mol/l sucrose, 5 mmol/l TES, and pH 6.7.2) and cyclooxygenase activity measured as previously described (29).

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

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

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

TABLE 1
Characteristics of Zucker rats

	Body (g)	Insulinemia (U/ml)	Glycemia (mM)
Lean	221.50 ± 5.64	26.05 ± 3.26	5.75 ± 0.15
Obese	258.17 ± 7.23***	142.70 ± 2.68	5.96 ± 0.07

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

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

RESULTS

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

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

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

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

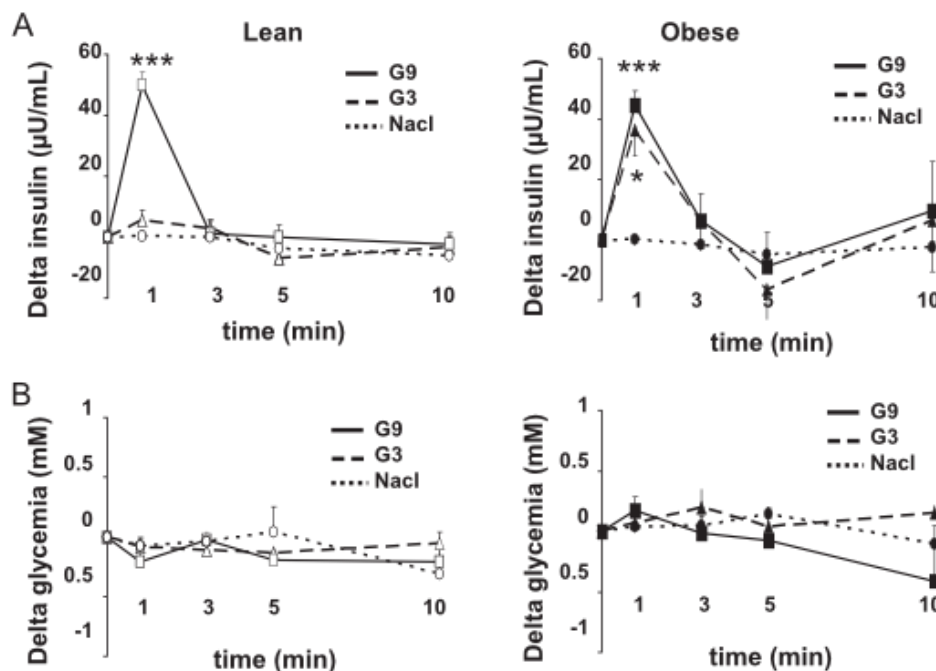


FIG. 2. Hypothalamic hypersensitivity to glucose in the obese Zucker rat. *A*: Insulin secretion in response to glucose. Plasma insulin in obese and lean rats in response to saline (dotted line) or 3 mg/kg (G3, dash line) or 9 mg/kg (G9, black line) glucose injection toward the brain. Results are expressed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

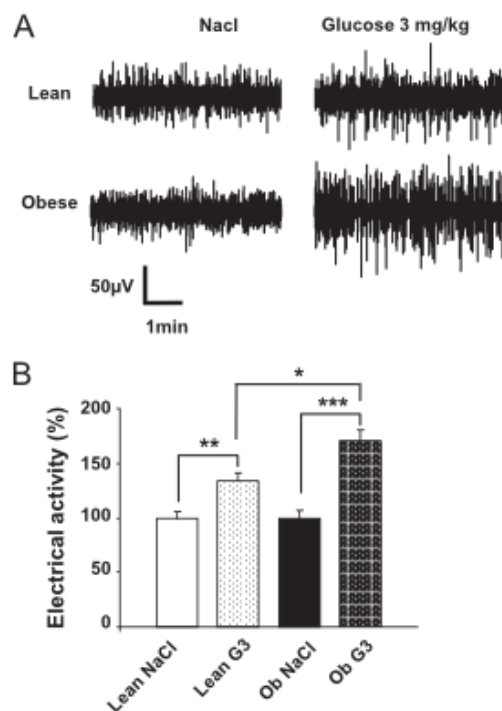


FIG. 3. Increased hypothalamic electrical activity in response to the low glucose dose. *A*: Multiunit sample recordings of arcuate nucleus neuronal activity in lean and obese Zucker rats after the carotid injection of saline (NaCl) or 3 mg/kg glucose (G3). *B*: Quantification of multiunit activity recorded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

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

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

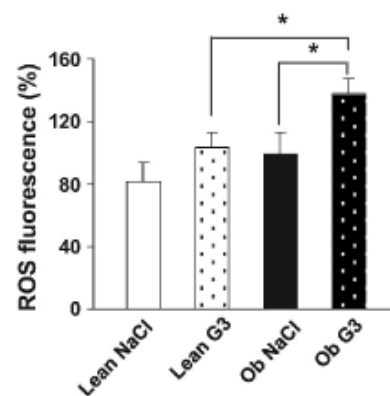


FIG. 4. Hypothalamic ROS production of obese rats in response to the low glucose load. ROS production in the hypothalamus in response to saline (NaCl) or to 3 mg/kg glucose (G3) injection toward the brain measured in lean (white bar) and in obese (Ob) rats (black bar). ROS level assessed in hypothalamic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

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

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

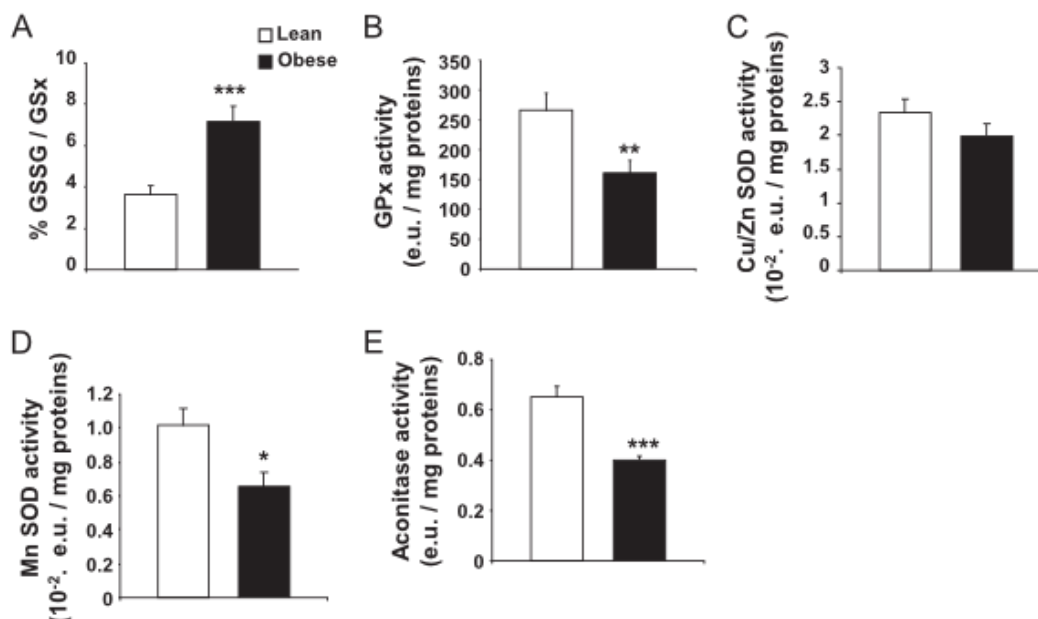


FIG. 5. Increased ROS production is linked to abnormal hypothalamic redox state. *A*: Obese rats display an abnormal hypothalamic glutathione redox state. GSH and GSSG levels measured by HPLC in hypothalamic homogenates of lean (white bar) and obese rats (black bar). The redox state of glutathione was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

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

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

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

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

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

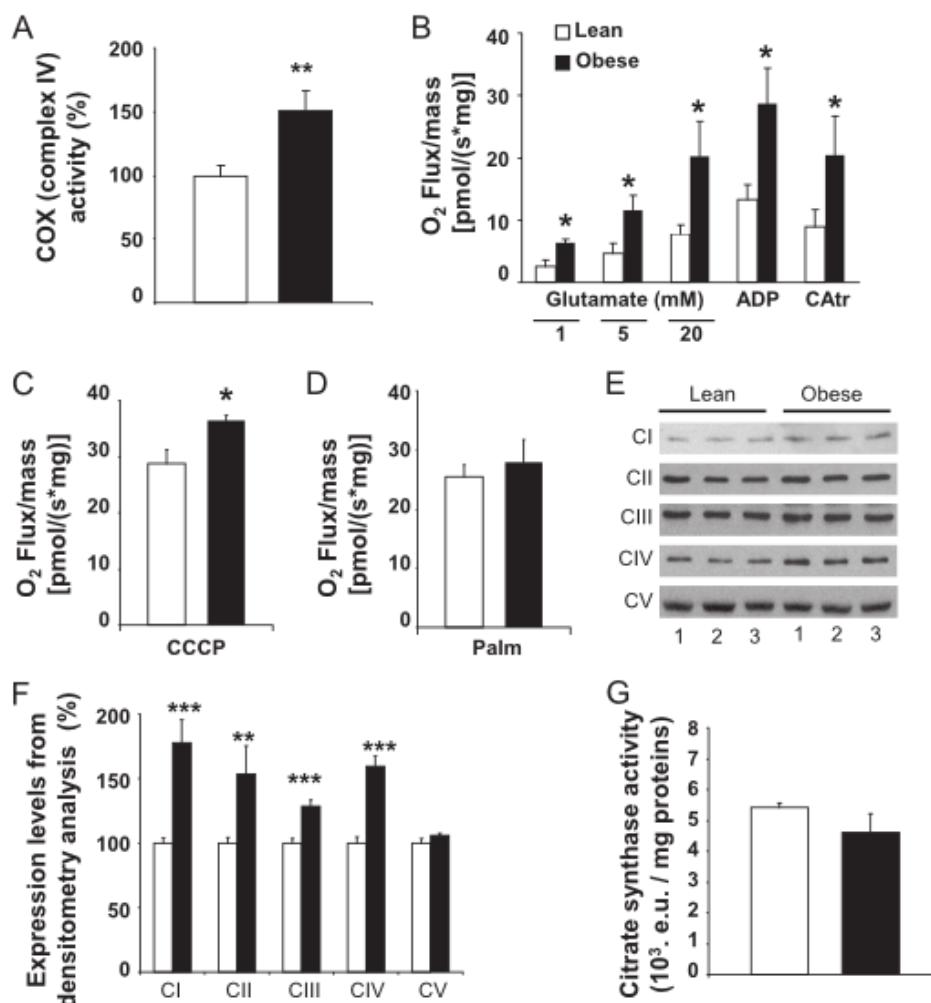


FIG. 6. Functional study of hypothalamic mitochondria. *A*: Obese rats exhibit an increased oxidative potential of the respiratory chain. Maximal cytochrome c oxidase activity in hypothalamic homogenates in basal conditions was significantly increased in obese rats. Data are expressed as means \pm SE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

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

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

DISCUSSION

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

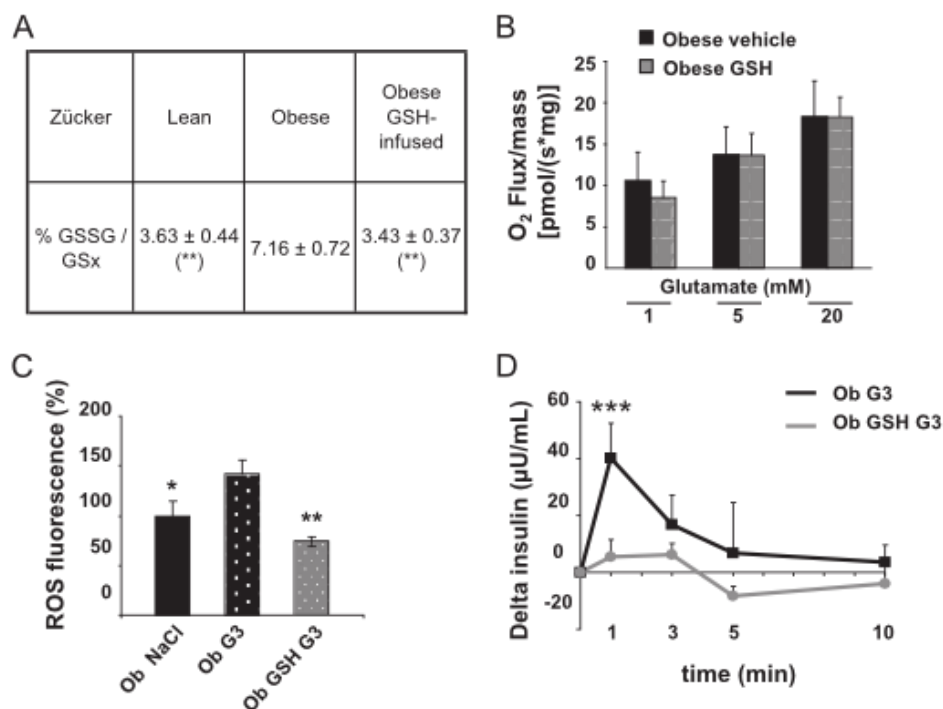


FIG. 7. Hypothalamic redox state after 3 days of intracerebroventricular GSH infusion in obese rats normalizes the response to the low glucose load. **A**: Normalization of the hypothalamic redox state. GSH and GSSG levels measured by HPLC in hypothalamic homogenates. The redox state of glutathione was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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ACKNOWLEDGMENTS

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

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

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

REFERENCES

- Levin BE. Metabolic sensing neurons and the control of energy homeostasis. *Physiol Behav* 2006;89:486–489
- Sandoval D, Cota D, Seeley RJ. The integrative role of CNS fuel-sensing mechanisms in energy balance and glucose regulation. *Annu Rev Physiol* 2008;70:513–535
- Goldstone AP. The hypothalamus, hormones, and hunger: alterations in human obesity and illness. *Prog Brain Res* 2006;153:57–73
- Schwartz MW, Porte D, Jr. Diabetes, obesity, and the brain. *Science* 2005;307:375–379
- Penicaud L, Leloup C, Fioramonti X, Lorsignol A, Benani A. Brain glucose sensing: a subtle mechanism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006;9:458–462
- Parton LE, Ye CP, Coppari R, Enriori PJ, Choi B, Zhang CY, Xu C, Vianna CR, Balthasar N, Lee CE, Elmquist JK, Cowley MA, Lowell BB. Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 2007;449:228–232
- Yang XJ, Kow LM, Funabashi T, Mobbs CV. Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic β -cell mechanisms. *Diabetes* 1999;48:1763–1772
- Kang L, Routh VH, Kuzhikandathil EV, Gaspers LD, Levin BE. Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons. *Diabetes* 2004;53:549–559
- Leloup C, Arluison M, Lepetit N, Cartier N, Marfaing-Jallat P, Ferre P, Penicaud L. Glucose transporter 2 (GLUT2): expression in specific brain nuclei. *Brain Res* 1994;638:221–226
- Leloup C, Orosco M, Serradas P, Nicolaidis S, Penicaud L. Specific inhibition of GLUT2 in arcuate nucleus by antisense oligonucleotides suppresses nervous control of insulin secretion. *Brain Res Mol Brain Res* 1998;57:275–280
- Pi J, Bai Y, Zhang Q, Wong V, Floering LM, Daniel K, Reece JM, Deeney JT, Andersen ME, Corkey BE, Collins S. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 2007;56:1783–1791
- Leloup C, Magnan C, Benani A, Bonnet E, Alquier T, Offer G, Carriere A, Periquet A, Fernandez Y, Ktorza A, Casteilla L, Penicaud L. Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing. *Diabetes* 2006;55:2084–2090
- Leloup C, Tourrel-Cuzin C, Magnan C, Karaca M, Castel J, Carneiro L, Colombani AL, Ktorza A, Casteilla L, Penicaud L. Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 2009;58:673–681
- Levin BE, Magnan C, Migrenne S, Chua SC, Jr, Dunn-Meynell AA. F-DIO obesity-prone rat is insulin resistant before obesity onset. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;289:R704–R711
- Andrews ZB, Liu ZW, Wallingford N, Erion DM, Borok E, Friedman JM, Tschop MH, Shanabrough M, Cline G, Shulman GI, Coppola A, Gao XB, Horvath TL, Diano S. UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* 2008;454:846–851
- York DA, Marchington D, Holt SJ, Allans J. Regulation of sympathetic activity in lean and obese Zucker (*fa/fa*) rats. *Am J Physiol* 1985;249:E299–E305
- Penicaud L, Cousin B, Leloup C, Atef N, Casteilla L, Ktorza A. Changes in autonomic nervous system activity and consecutive hyperinsulinaemia: respective roles in the development of obesity in rodents. *Diabetes Metab* 1996;22:15–24
- Alquier T, Leloup C, Atef N, Fioramonti X, Lorsignol A, Penicaud L. Cerebral insulin increases brain response to glucose. *J Neuroendocrinol* 2003;15:75–79
- Atef N, Ktorza A, Penicaud L. CNS involvement in the glucose induced increase of islet blood flow in obese Zucker rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995;19:103–107
- Wang R, Cruciani-Guglielmacci C, Migrenne S, Magnan C, Cotero VE, Routh VH. Effects of oleic acid on distinct populations of neurons in the hypothalamic arcuate nucleus are dependent on extracellular glucose levels. *J Neurophysiol* 2006;95:1491–1498
- Anderson MF, Nilsson M, Eriksson PS, Sims NR. Glutathione monoethyl ester provides neuroprotection in a rat model of stroke. *Neurosci Lett* 2004;354:163–165
- Benani A, Barquissau V, Carneiro L, Salin B, Colombani AL, Leloup C, Casteilla L, Rigoulet M, Penicaud L. Method for functional study of mitochondria in rat hypothalamus. *J Neurosci Methods* 2009;178:301–307
- Szabados E, Fischer GM, Toth K, Cséte B, Nemeti B, Trombitas K, Habon T, Endrei D, Sumegi B. Role of reactive oxygen species and poly-ADP-ribose polymerase in the development of AZT-induced cardiomyopathy in rat. *Free Radic Biol Med* 1999;26:309–317
- Zheng W, Ren S, Graziano JH. Manganese inhibits mitochondrial aconitase: a mechanism of manganese neurotoxicity. *Brain Res* 1998;799:334–342
- Galinié A, Carrière A, Fernandez Y, Caspar-Bauguil S, Periquet B, Periquet A, Penicaud L, Casteilla L. Site specific changes of redox metabolism in adipose tissue of obese Zucker rats. *FEBS Lett* 2006;580:6391–6398
- Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 1974;47:469–474
- Gunzler WA, Kremers H, Flohe L. An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase (EC 1-11-1-9) in blood. *Z Klin Chem Klin Biochem* 1974;12:444–448
- Faloua GR, Srere PA. Escherichia coli citrate synthase. Purification and the effect of potassium on some properties. *Biochemistry* 1968;8:4497–4503
- Prunet-Marcassus B, Moulin K, Carmona MC, Villarroya F, Penicaud L, Casteilla L. Inverse distribution of uncoupling proteins expression and oxidative capacity in mature adipocytes and stromal-vascular fractions of rat white and brown adipose tissues. *FEBS Lett* 1999;464:184–188
- Guilloid-Maximin E, Lorsignol A, Alquier T, Penicaud L. Acute intracarotid glucose injection towards the brain induces specific c-fos activation in hypothalamic nuclei: involvement of astrocytes in cerebral glucose-sensing in rats. *J Neuroendocrinol* 2004;16:464–471
- Tretter L, Adam-Vizi V. β -ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005;360:2335–2345
- Kitahara S, Yamashita M, Ikemoto Y. Effects of pentobarbital on purinergic P2X receptors of rat dorsal root ganglion neurons. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81:1085–1091
- Fioramonti X, Lorsignol A, Taupignon A, Penicaud L. A new ATP-sensitive K^+ channel-independent mechanism is involved in glucose-excited neurons of mouse arcuate nucleus. *Diabetes* 2004;53:2767–2775
- Rohner-Jeanrenaud F, Hochstrasser AC, Jeanrenaud B. Hyperinsulinemia of preobese and obese *fa/fa* rats is partly vagus nerve mediated. *Am J Physiol* 1983;244:E317–E322
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:44–84
- Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1287–1312
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 2004;134:489–492
- Soltys K, Dikdan G, Koneru B. Oxidative stress in fatty livers of obese Zucker rats: rapid amelioration and improved tolerance to warm ischemia with tocopherol. *Hepatology* 2001;34:13–18
- Poirier B, Lannaud-Bournoville M, Conti M, Bazin R, Michel O, Bariety J, Chevalier J, Myara I. Oxidative stress occurs in absence of hyperglycaemia and inflammation in the onset of kidney lesions in normotensive obese rats. *Nephrol Dial Transplant* 2006;15:467–476
- Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005;54:1615–1625
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000;404:787–790
- Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Brownlee M. Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes* 2001;50:1491–1494
- Turner N, Bruce CR, Beale SM, Hoehn KI, So T, Rolph MS, Cooney GJ. Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents. *Diabetes* 2007;56:2085–2092
- Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseume E, Chauvin MA, Morio B, Vidal H, Rieusset J. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J Clin Invest* 2008;118:789–800
- Adam-Vizi V, Chinopoulos C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:639–645
- Benani A, Troy S, Carmona MC, Fioramonti X, Lorsignol A, Leloup C, Casteilla L, Penicaud L. Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: redox regulation of food intake. *Diabetes* 2007;56:152–160
- Hudasek K, Brown ST, Fearon IM. H_2O_2 regulates recombinant Ca^{2+} channel β -1C subunits but does not mediate their sensitivity to acute hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:135–141
- Avshalomov MV, Chen BT, Koos T, Tepper JM, Rice ME. Endogenous hydrogen peroxide regulates the excitability of midbrain dopamine neurons via ATP-sensitive potassium channels. *J Neurosci* 2005;25:4222–4231

PUBLICATION 5

La publication 5 est une revue publiée dans Antioxydant and Redox signaling en 2011 et écrite par Corinne Leloup. Cette revue décrit les connaissances actuelles sur le rôle des EAOs comme molécule signal dans la détection du glucose aussi bien au niveau hypothalamique que pancréatique, ainsi que dans le tissu adipeux. Dans cette revue, l'ensemble des travaux récents de l'équipe dans ce domaine, dont ceux auxquels j'ai pu participer, sont ainsi résumés.

Balancing Mitochondrial Redox Signaling: A Key Point in Metabolic Regulation

Corinne Leloup,¹ Louis Casteilla,^{2,3} Audrey Carrière,^{2,3} Anne Galinier,^{2,3}
Alexandre Benani,¹ Lionel Carneiro,¹ and Luc Pénicaud¹

Abstract

Mitochondrial reactive oxygen species (mROS) have emerged as signaling molecules in physiology primarily as a result of studies of uncoupling mechanisms in mitochondrial respiration. The discovery that this mechanism negatively regulates mROS generation in many cell types has drawn the attention of the scientific community to the pathological consequences of excess mROS production. From reports of the energetic fluxes in cells grown under normal conditions, the hypothesis that mROS are an integrated physiological signal of the metabolic status of the cell has emerged. Here, we consider recent studies that support this point of view in two key nutrient sensors of the body, beta cells and the hypothalamus, which are the main coordinators of endocrine and nervous controls of energy metabolism and adipose tissue, which is of paramount importance in controlling body weight and, therefore, the development of obesity and type 2 diabetes. In this context, finely balanced 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. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 519–530.

Brief Overview of Mitochondrial Reactive Oxygen Species

Beside other important sources such as NADPH oxidases or the endoplasmic reticulum, for instance (45, 90), the mitochondria respiratory chain and dehydrogenases represent one of the main sources of reactive oxygen species (ROS) in cells. Here we only deal with this mitochondrial compartment as ROS producing organelles in regard to energy sensing within the cell. Estimates from isolated mitochondria suggest that 1% or less of the O₂ consumed is incompletely metabolized and leads to superoxide generation when it accepts an electron from the chain (16, 95, 104). The current view is that mitochondrial superoxide anions are an obligatory by-product of respiratory chain function and that their generation is intimately linked with energetic and oxidative phosphorylation in cells. Several sites of superoxide anion production have been described in mammalian mitochondria, and these have recently been reviewed (16). Among the sites that produce ROS, complex I and III have been shown to possess high productive capacities (10, 25). They contain large amounts of ubiquinone (18) that permits the univalent reduction of a small part of molecular oxygen to superoxide (complex I produces superoxide in the matrix,

whereas complex III produces it in the matrix and intermembrane space) (47, 104). For signaling, the superoxide can itself be the signal in the matrix, or it can be dismutated by manganese superoxide dismutase (SOD) and converted into hydrogen peroxide (H₂O₂). This latter compound becomes diffusible and/or is transported by channel proteins, such as aquaporins, as recently suggested (13, 73). It can therefore act in both mitochondrial and cytosolic compartments. Part of the H₂O₂ released can also be converted to H₂O through catalase and/or be inactivated by a variety of other enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems acting directly or indirectly, such as glutathione peroxidases, peroxiredoxins, thioredoxins, glutathione reductases, glucose-6-phosphate dehydrogenase (NADPH regeneration), and vitamins (67). Apart from these secondary scavenging systems, the respiratory chain itself modulates mitochondrial ROS (mROS) production through specific proteins. The uncoupling proteins (UCP1–5) have been classically viewed as channels that dissipate the proton electrochemical gradient, thereby uncoupling respiration from ATP synthesis and producing heat in the cell. Although this is true for UCP1 in thermogenic tissues, this mechanism is still controversial, and many other functions have been observed or suggested (8, 15, 35, 69, 76). Of particular interest for mROS production is the UCP2

¹Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 6265–Institut National de Recherche Agronomique 1324, Université de Bourgogne, Dijon, France.

²Laboratoire Métabolisme, Plasticité et Mitochondrie, Université de Toulouse, Université Paul Sabatier and ³Unité Mixte de Recherche 5241 and Centre National de la Recherche Scientifique, Toulouse, France.

homolog, which does not normally catalyze the basal proton flux but does so to a moderate extent (mild uncoupling) when activated, as it is the case by superoxide, ensuring an antioxidant effect (22, 34, 35, 69, 76). The role of this protein and its physiological and pathological consequences will be further discussed in the text. Another important factor in regulating mROS levels is the nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt), a protein located in the inner membrane of eukaryotes (52). It functions as a redox-driven proton pump, catalyzing the reduction of NADPp by NADH. Nnt has been proposed to indirectly detoxify H_2O_2 from the matrix through its conversion into water by the glutathione cycle; this latter step consumes NADPH for the regeneration of reduced glutathione (GSH) (6, 38, 82). Wherever they are present, mROS, and particularly H_2O_2 , can act on potential redox-sensitive targets (33, 37). mROS signaling is often mediated by proteins that have a cysteine with thiol(ate) groups in their active sites, which might react in a reversible manner with H_2O_2 (37, 56, 67). These data support the existence of specific responses through reversible oxidation-reduction reactions.

Figure 1 summarizes the main steps in mitochondrial superoxide formation originating from the respiratory chain and its derivative H_2O_2 production.

In the context of normal nutrient supply and thereby the transient rise of metabolite fluxes, a short-lived and moderate increase of mROS originating from the respiratory chain (superoxide anion and secondarily H_2O_2) has been identified in some cells and tissues both *in vitro* and *in vivo* (11, 14, 27, 53, 61, 62, 77). This transient production occurs under physiological conditions with no identified damage (11, 61, 62). One of the most elegant demonstrations of transient mROS production was achieved in rat islets, using time-lapse imaging of hydroethidine (HET), which specifically reacts with $O_2^{\cdot -}$ (14). In that study, normal islets exhibited a rapid increase in ROS levels, as shown by HET oxidation when the glucose concentration rose from 2 to 10 mM. The images in which the fluorescence of the HET probe was merged with that of a mitochondrial marker showed the mitochondrial origin of the superoxide anion. Further, the suppression of this glucose-increased mROS production (e.g., through the use of mitochondrial drugs targeting the electron chain transfer, antioxidants, or the overexpression of UCP2) systematically disturbs the normal function of the cell (53, 61, 62, 77), providing evidence that these mitochondrial oxidants also function physiologically as fuel-sensing signaling molecules that regulate metabolism. These points will be discussed in the following paragraphs with regard to two key nutrient sensors of the body, beta cells and the hypothalamus, in which the role of mROS has been recently described, and adipose tissue, which appears to intimately depend on mROS signaling.

mROS as an Integrated Signal for Nutrient Sensing in the Hypothalamus

The brain control of energy status is particularly important in energy maintenance because it is strongly involved in controlling food intake and energy expenditure as well as, through sympathetic (splanchnic) and parasympathetic (vagal) outputs, and glucose and lipid metabolism (17, 99, 109). This control predominantly involves the hypothalamus, which has been suggested to have a central role in the pathogenesis of type 2 diabetes (T2D) (74, 96, 97). The hypothal-

amus integrates peripheral signals delivered by neural inputs from various organs and by the blood, including metabolites (mainly glucose and fatty acids) and hormones (mainly leptin, insulin, and ghrelin) (1), and it generates the appropriate integrative responses. In particular, specialized cells, such as glucosensing neurons, whose firing rates vary in response to changes in extracellular glucose concentration, have been described (3, 75, 83). Two populations of glucosensing neurons can be defined as local glucose levels rise: excited ones (in which the electrical activity is increased, gluco-excited (GE) neurons) and inhibited ones (which exhibit decreased activity, gluco-inhibited neurons) (3, 36). Such neurons have mainly been characterized in the ventromedial hypothalamus (ventro-medial nucleus) and arcuate nuclei. GE neurons share similarities with beta cells, such as the consensual ATP production and the mechanism by which their K_{ATP} channels operate, but studies highlighting this mechanism are not sufficient to explain the response of GE neurons, and some studies show that ATP-independent mechanisms might operate (3, 36). Pioneering studies have identified the necessary redox signaling through mROS production when nutrient fluxes vary in many cells (77). These data lead us to propose that mROS is particularly important in nutrient-sensing mechanisms.

In the hypothalamus where GE neurons are present (the ventral part, especially in the arcuate nucleus), we have shown that a transient increase in glucose concentration can very rapidly trigger an increase in mROS production. This increase occurs both *in vivo* hypothalamic slices (61) and *in vivo* in the ventral part of the hypothalamus 1 min after a glucose load (27), which coincides with the timing of the physiological response, that is, neuronal activation and a subsequent peak of insulin. This mROS production is reversed by various antioxidants or a mitochondrial uncoupler; the effect of the latter compound indicates the respiratory chain origin of the mROS (61). In these conditions, both the increase in the firing rate in the arcuate nucleus and the subsequent insulin secretion are abolished, showing that the responses are dependent on mROS. Moreover, direct hypothalamic mROS generation by the respiratory chain inhibitors antimycin and rotenone mimics the effect of glucose. A possible explanation for this finding is that an increase in mROS levels, rather than just the ATP=ADP ratio, constitutes a signal that mediates the stimulatory effect of glucose on hypothalamic neurons. Brain complex I has been suggested as a main source of mROS from the respiratory chain (2), and the production of mROS increases as reduced NADH increases, which predominantly occurs when glucose levels rise. Therefore, the mROS signaling in this context is consistent with the NADH mechanism in mediating glucose signaling, as suggested earlier (111). In this case, mROSelevation can be considered as a signal integrating increases in both reduced NADH (when glucose rises) and the electrochemical proton gradient, the latter reflecting both the phosphate potential (ATP=ADP, Pi ratio) and the uncoupling status of the mitochondria. This proposal is consistent with previous studies that describe expression of UCP2 in cortex and recently in many hypothalamic areas (the suprachiasmatic, paraventricular, dorsomedial, ventromedial, and arcuate nuclei) (28, 91). An increase in brain UCP2 expression correlates with the survival of cortical neurons in conditions of oxygen and glucose deprivation, a situation that exacerbates pathological

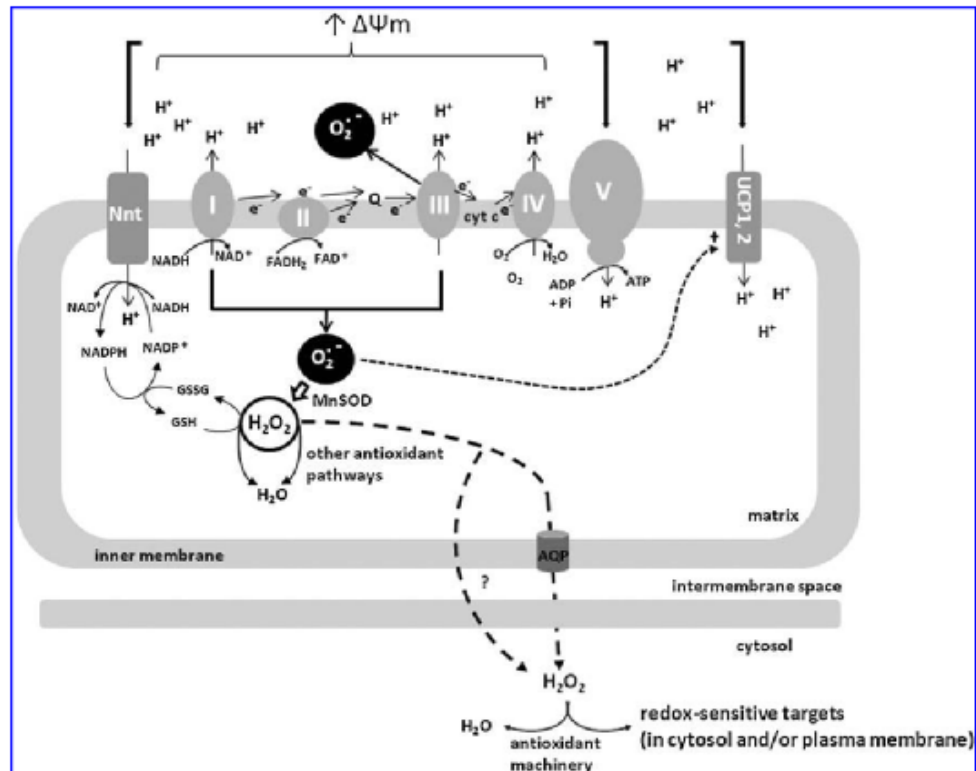


FIG. 1. Schematic illustrations of mitochondrial events promoting mitochondrial reactive oxygen species signaling. Energetic substrates are transported in the matrix and generate reduced molecules (NADH and FADH₂) after their oxidation. Electrons are generated from NADH (complex I) and FADH₂ (complex II) and pass through the mitochondrial electron transport chain (four complexes, I to IV; Coenzyme Q (Q) and cytochrome c, electron carriers), where they finally reduce O₂ to H₂O. This is associated with the pumping of protons across the inner membrane that establishes an electrochemical gradient (DCm). This gradient drives the synthesis of ATP from ADP and inorganic phosphate by complex V, protons being transported back to the matrix. UCPs also consume the proton gradient and lower ATP synthesis (proton leak). In brown adipocytes, UCP1 actively dissipates the proton gradient that leads to heat. The UCP2 homolog is only considered as a mild uncoupler. Increased oxidation of the reduced equivalents NADH and FADH₂ accelerates respiration and electron transport. In the respiratory chain, mainly complexes I and III can also leak electron to oxygen, leading to superoxide anions generation (O₂^{•-}). The O₂^{•-} generates H₂O₂ after dismutation by manganese-dependent superoxide dismutase. H₂O₂ might be quenched in the matrix or in the cytosol by several antioxidant systems, including both enzymes (catalase, glutathione peroxidase, peroxiredoxin, and thioredoxin, for instance) and scavengers (glutathione and vitamins). The nicotinamide nucleotide transhydrogenase participates indirectly to the reduction of H₂O₂ to H₂O: it functions as a redox-driven proton pump, catalyzing the reduction of NADP⁺ by NADH. The regeneration of glutathione consumes the NADPH. For signaling, H₂O₂ might react in a reversible manner with specific targets (mostly proteins handling a cysteine residue) both in the matrix and/or in the cytosol, maybe crossing the inner membrane through aquaporin protein. cyt c, cytochrome c; H₂O₂, hydrogen peroxide; MnSOD, manganese-dependent superoxide dismutase; Nnt, nicotinamide nucleotide transhydrogenase; Pi, inorganic phosphate; UCPs, uncoupling proteins.

mROS formation in neurons (69). In this study, UCP2 has been shown to lower the level of mROS, a function that has been attributed to a mild mitochondrial uncoupling, which has been verified by measurement of the mitochondrial membrane potential. Low doses of the mitochondrial uncoupler DNP (2,4-dinitrophenol) are also protective. Overexpression of UCP2 *per se* does not alter the membrane potential. The net mROS formation in suspended mitochondria is not different in transgenic UCP2-overexpressing mice versus the wild type, indicating that there is no net change in mROS generation due to UCP2 overexpression in the absence of UCP2 activators.

Oxygraphic study has shown an increased respiration only after the addition of palmitic acid, indicating an increase in the leakage of protons across the membrane after activation of UCP2, although mitochondrial membrane depolarization is limited. This study, largely confirmed by the ischemic condition of the brain (30, 71), has indicated a protective role for UCP2 through a mild mitochondrial uncoupling activation, mitigated ROS production, and activation of cellular redox signaling.

Other results on pro-opiomelanocortin (POMC) neurons, a particular type of hypothalamic GE neurons, support the

importance of mROS signaling in conjunction with UCP2 activity (81). Thus, the mechanism for obesity-induced loss of glucose sensing in arcuate POMC neurons (an anorexigenic population) involves UCP2, which negatively regulates glucose sensing in POMC neurons. In particular, genetic deletion of UCP2 or treatment with genipin, a UCP2 inhibitor, prevents obesity-induced loss of glucose sensing. In this case, UCP2 scavenging of mROS impairs glucose sensing in glucose-excited neurons and has a pathogenic role in the development of T2D. This mROS signaling might be extended to other fuel nutrients, at least lipids because acute hypertriglyceridemia in normal rats has been shown to trigger a rapid increase in the mitochondrial respiration in the ventral hypothalamus, together with a transient production of ROS (11). Inhibition of fatty acid-CoA mitochondrial uptake (by etomoxir) prevents the hypertriglyceridemia-induced ROS production, indicating the mitochondrial origin of the ROS. The hypothalamic inhibition of this hypertriglyceridemia-induced mROS production by antioxidants fully abolishes the satiety effect of lipids, showing that mROS production is required to restrain food intake during hypertriglyceridemia (11). Moreover, the fasting state was shown, using mitochondrial respiratory studies, to be associated with both high uncoupling in the hypothalamus and an increase in UCP2 protein levels (11). As a consequence, this mitochondrial uncoupling status disrupts the hypertriglyceridemia-induced mROS production, indicating that brain nutrient sensing is modulated according to the energy status (11). Altogether, these findings expand the role of mROS as a real gauge of energy status.

Recently, hypothalamic mROS signaling has been shown to be modulated by hormones. In the arcuate neuropeptide Y (NPY)=agouti-related peptide (AgRP) orexigenic neurons, the orexigenic gut-derived hormone ghrelin exerts its effects through the modulation of mitochondrial respiration and mROS production (5). In this study, ghrelin decreased the mitochondrial membrane potential in normal mice and increased neuronal activation, as assessed by c-fos expression, and the firing rate of NPY neurons, effects that are completely abolished in UCP2^{A-A} mice, in which mROS is still produced (5). Moreover in this mechanism, it was proposed that ghrelin activates AMPK signaling, which requires UCP2 activation to promote feeding in NPY neurons. This mechanism suggests possible causal links between AMPK signaling and mROS production in this population of neurons. Currently, only indirect links have been reported, and no specific thiol residue of AMPK that is redox sensitive has been identified. AMPK is known to be activated by stimuli that increase the cellular AMP=ATP ratio (low glucose and high ghrelin, as occur in the fasting state). H₂O₂-caused activation and phosphorylation of AMPK have recently been discussed, and studies suggest that the target for ROS may not be AMPK itself but one or more components of the respiratory chain, leading to a secondary effect on AMPK via increases in the AMP:ATP ratio (49). Whatever the link with AMPK, these results highlight that mitochondria of orexigenic NPY=AgRP neurons need an uncoupled status to promote a normal response. Conversely, WT POMC neurons show a higher mROS production with saline than with ghrelin and need coupled mitochondria for their activation. In the fasting state, ghrelin indirectly hyperpolarizes POMC neurons by activating inhibitory NPY=AgRP (GABAergic) inputs. The hyperpolarization leaves POMC

neurons less active, leading to a drop in the respiration rate and mROS production. Finally, mROS scavenging by antioxidant treatment reverses these results in neurons from UCP2^{A-A} mice. Thus, the anorexigenic POMC neurons have been proposed to function inversely to the NPY=AgRP neurons. They can respond to a rise in glucose levels through an mROS increase only under fed conditions, with low ghrelin and well-coupled mitochondria. Although the mechanisms underlying the different mROS production responses in NPY and POMC neurons are clear regarding ghrelin (the POMC population has only 8% of ghrelin receptors), a comprehensive view of the differential effects of nutrient fluxes (lipids vs. glucose) according to negative or positive energy balance on these two neuronal populations remains hypothetical (53).

Together, these data from gene invalidation as well as pharmacological approaches demonstrate the master role of brain mROS signaling with regard to the control of both food intake and metabolism. This master component of brain energy sensing would be crucial in the development of both obesity and T2D. Indeed, in the obese and insulin-resistant Zucker rat, a prediabetic model, mROS signaling is altered (27). This model exhibits a hypothalamic hypersensitivity to glucose represented by an enhanced electrical activity in the arcuate nucleus and insulin secretion at low glucose levels (4, 27). These abnormal responses were associated with increased hypothalamic ROS levels at low glucose concentrations, a constitutive oxidized environment at both the cellular and mitochondrial levels, and an overexpression of several subunits of the respiratory chain, together with a dysfunction in mitochondrial respiration (27). In this study, no difference in the number of mitochondria or in uncoupling respiration was observed between the hypothalamus of obese versus control rats. Thus, a mechanism other than UCP2 decrease might explain excess ROS production. Recovery of the redox status through glutathione intracerebroventricular infusion fully reverses the hypothalamic hypersensitivity to glucose. Excessive mROS production might be a primary and causal link with the overoxidation of the redox environment, but further experiments are needed to test the order of emergency of these disorders. Nevertheless, hypersensitivity to glucose partially explains the elevated parasympathetic tone generally present in the obese and insulin-resistant state that consequently contributes to the development of hyperinsulinemia in the obese Zucker rat, and subsequently, to T2D onset.

mROS as an Integrated Signal for Glucose Sensing in Pancreatic β -Cells

Blood glucose homeostasis is primarily maintained by the adequate release of insulin by the pancreatic β cell, which operates as a glucosensor. Most of the glucose-derived pyruvate enters the mitochondrial metabolism, and one of the consensus signaling pathways identified is that ATP generation promotes the closure of the K_{ATP} channel, which depolarizes the membrane and then triggers Ca²⁺ influx by opening voltage-gated Ca²⁺ channels (92). Numerous amplifying signals have been identified, notably those coming from mitochondrial metabolism (50, 65). mROS production under glucose fluxes has mostly been studied in hyperglycemic diabetics, and the normal signaling process has not received much study. One of the first studies to highlight the dynamic production of mROS in isolated islets in response to

glucose stimulation was performed by Bindokas et al. (14). Using time-lapse imaging of HET oxidation for superoxide recognition, they demonstrated the obligatory increased production of ROS due to mitochondrial metabolism under glucose stimulation in normal rats without demonstrating a causal link between mROS generation and glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). Collins et al. demonstrated in mouse isolated islets and in a b-cell line that insulin secretion could be stimulated by elevated H_2O_2 levels and that scavenging this H_2O_2 production, which occurs when glucose rises, blunted GSIS (85). Only oxidative stressors (4-hydroxy nonenal, methylglyoxal) can decrease GSIS in association with an increase in a battery of endogenous antioxidant enzymes (85). Previous studies have investigated the role of H_2O_2 in insulin secretion, and most have concluded that it alters mitochondrial activation and insulin secretion (58, 66, 94). One of the main differences that might explain this discrepancy is the concentration of H_2O_2 used, which was 50 nM or more in these latest studies, rather than the 1–4 nM range used by Collins et al. By analogy with the requirement for mROS in the brain's nutrient sensing, we have recently studied and demonstrated that mROS are also required for GSIS (62). In freshly isolated rat islets, GSIS was blocked by antioxidants in a dose-dependent manner, which highly correlated with mROS levels. Further, insulin release was mimicked by mitochondrial complex blockers (rotenone and antimycin). Both phenomena were observed independently of changes in ATP and NADH levels. No extra-mROS were detected in islets co-treated with glucose and carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (an uncoupling compound that increases respiration and diminishes mROS generation). Therefore, the ROS production during the time course of glucose metabolism is solely due to mitochondria. Finally, we showed that this mROS signaling acted on the mobilization of calcium of extracellular origin (62). Altogether, these results strongly suggest that mROS are robust stimulators of insulin secretion. However, other works that investigated the effects of glucose on mROS formation in primary rat b cells (68) or the MIN6 cell line (54), which display higher metabolic responsiveness to glucose (68), did not reveal an increased ROS production in response to a glucose rise. Rather ROS levels were suppressed, especially at lower glucose concentrations (0–5 mM). However, with 10 mM glucose a small subset of b cells has a 10-fold higher HET-fluorescence intensities (for superoxide anion detection), indicating heterogeneity in the population of cells. The authors propose this heterogeneity of the b-cell population, in which both glycolytic and mitochondrial glucose metabolism differ, would explain the difference in ROS production (68). Apart from the differences in models (fresh isolated islets [including all endocrine cells], FACS-sorted primary b cells, b-cell lines, or cultured islets), these discrepancies regarding mROS production could also be related to the different basal glucose concentrations used (0 or 2.5 vs. 5.5 mM). The basal glucose concentration certainly greatly modifies the basal levels of NADH, NADPH, and riboflavin as well as the redox environment and possibly UCP2 activity that alter the subsequent mitochondrial responses. Moreover, the fact that ROS suppression is predominantly observed at low glucose concentrations (below physiological concentrations) might reflect a recovery of the cells from a glucoprivic condition, which has been shown to increase mROS formation, at least in the brain and in neurons (79, 98).

In a study by Bindokas (14), a major difference in superoxide islet regulation was present between control lean animals and Zucker diabetic fatty (ZDF) rats because glucose stimulation triggered a large increase in superoxides in islets of control rats but not in the islets of ZDF rats (their basal mROS production being abnormally elevated), associated with a decreased secretion. This result suggests that one of the defects would be in the mechanism regulating the increase in ROS when the glucose level is raised; this increase is too small in ZDF islets. The amplitude of balanced mROS signaling is then diminished in ZDF rats, which leads to the decreased secretion of insulin. Although antioxidant defenses were not estimated in this work, it is consistent to think that their increase could prevent the necessary reduced-oxidized amplitude required for the activation of targets involved in insulin secretion. One interesting feature of b cells is their reportedly low levels of expression of antioxidant defenses, such as SOD (59), catalase, and glutathione peroxidases (only 1% of the levels in the liver) (63, 100). This feature supports the view that a low- H_2O_2 -inactivating enzyme apparatus (but one that is still sufficient to quench a small and transient mROS increase) allows for the proper balance of mROS production necessary to trigger the signaling for insulin secretion. The existence of such an enzyme apparatus is consistent with the fact that overexpression of antioxidant defenses ameliorates the progression of hyperglycemia in established diabetes (110). In most studies, the antioxidant machinery appears to be one of the key components in regulating mROS signals, which clearly needs to be properly balanced to produce its physiological effects. An important factor implied in GSH regeneration and in regulation of mROS levels is the nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt). Nnt knockdown and mutations have been shown to impair insulin secretion in response to glucose; this dysfunction is linked to a great enhancement of superoxide production and a decrease in the ATP=ADP ratio, although glucose utilization was higher, suggesting that the uncoupling mechanism is more efficient (38). However, UCP2 does not appear to be the cause of these disorders (80) and the mechanisms involved remain unidentified. Recently, the Goto-Kakizaki=Paris rat model of T2D has highlighted the intricate pathways between the antioxidant machinery and the final mROS signal needed for proper insulin secretion (60). This model of spontaneous T2D is characterized by hyperglycemia and defective GSIS. After the onset of diabetes, although peri-islets exhibit an oxidative environment, the islets themselves appear protected against oxidative damage. They maintain a basal ROS level similar or even lower than that of control islets (60). This protection against oxidative damage appears to be due to both elevated glutathione content (reduced form) and overexpression of a large set of antioxidant proteins. In this model, the most likely mechanism by which ROS production is blunted in diabetic islets is via their raised antioxidant defenses and UCP2 expression. Both phenomena might directly decrease the Goto-Kakizaki=Paris b-cell function when exposed to high glucose through insufficient mROS and ATP generation.

Likewise, the role of UCP2 as a negative regulator of insulin secretion, suggested to be a mild uncoupler mostly involved in lowering ATP production (23, 112), can also be considered as a pathway allowing the termination of the mROS signaling after a glucose load in normal conditions through feedback regulation. A recent study found that overexpression of UCP2

both in a transgenic mouse line and in β cells did not alter GSI, the elevated ATP=ADP ratio, glucose oxidation, mitochondrial membrane potential, or oxygen consumption (87). In this study, only increased UCP2 levels decreased cytokine-induced ROS production, supporting UCP2 as an antioxidant; however, how this works remains unclear. However, another recent study reveals apparently paradoxical roles for UCP2 in β -cell function: according to their genetic background (either UCP2^{A-A} mice of congenic B6 lines or 129=B6 mixed background), GSI was either diminished, as already described and largely accepted, or increased in isolated β cells, respectively (84). In the 129=UCP2^{A-A} lines, decreased glucose-stimulated H₂O₂ production was observed compared with 129=UCP2^{+/+} islets. The blood levels of GSH and oxidized glutathione, which are fine markers of redox metabolism, differed markedly between the two genetic backgrounds as did the GSH=oxidized glutathione ratio. In this context, previous results on physiological ROS production or pathological oxidative stress in such models are difficult to interpret (84). Therefore, UCP2 function clearly needs to be reexamined for its role in pancreatic β cells and GSI and in the pathogenesis of diabetes. Acute manipulation of its activity and comparison of various models would help our understanding of its exact function.

Regarding K_{A,TP} channel signaling, it should be underlined that sulfonylurea (glibendamide), like glucose-level elevation, has been shown to stimulate NADPH oxidase and ROS production in β cells through PKC-dependent activation (103). One of the therapeutic effects of sulfonylurea occurs through the enhanced production of ROS (although of non-mitochondrial origin) it enables, only when the β -cell defect is still moderate. Recently, the genetic deletion of K_{A,TP} channel activity (Sur1^{A-A} β cells) was shown to protect islets against oxidative stress, rendering them less prone to apoptosis induced by high H₂O₂ levels than wild-type β cells (42). This protective effect was attributed to upregulation of the antioxidant enzymes, and the reduced sensitivity of Sur1^{A-A} cells was mimicked by treatment with the sulfonylureas tolbutamide and glibenclamide. These results, although under oxidative stress conditions, suggest a putative role of mROS in regulating K_{A,TP} channel activity under physiological conditions. Brain H₂O₂-sensitive K_{A,TP} channels are well characterized and promote a H₂O₂-dependent modulation of neurotransmitter release, and the H₂O₂ production has been recently shown to be of mitochondrial origin (7, 9). This mechanism implicates sulfonylurea receptor 1 (SUR1), which is an isoform operating in pancreatic β cells. However, Krippeit-Drews and colleagues (58) have shown that exogenous H₂O₂ (using a 1 mM concentration, a 100-fold that used in Collins' study) can lead to the opening of K_{A,TP} channels in β cells and thereby inhibit insulin release. This result appears in contradiction with the findings showing that exogenous H₂O₂ (only 1–4 nM) or H₂O₂ derived from glucose metabolism stimulates insulin secretion (62, 85). However, even if the different concentrations explain the opposite results, this finding suggests that K_{A,TP} would not be the target of mROS for insulin release under physiological conditions. Other channels (for instance, transient receptor potential or some L-type Ca channels) could be potential targets of mROS under physiological conditions, as we previously discussed and as suggested by others studies (48, 55, 57, 88, 101). Although further experiments will be needed to clarify the mROS

sensitive mechanisms involved in GSI, these recent studies strongly support a role for mROS as a key integrative component of the mitochondrial energy status for monitoring the physiological response.

mROS as an Integrated Signal to Control Adipogenesis?

Long considered only to be the main energy store of the body, white adipose tissue now appears to be an endocrine organ able to interconnect all physiological functions to this energy store (105). Representing around 10% of total body weight in adults, it can reach > 50% in obese people. For these reasons, its quantitative and qualitative relevance is considerable, regardless of the individual. Another evolving view on this tissue corresponds to its cell heterogeneity. Indeed, up until now, most groups have focused their research on white adipocytes, the specialized cells of adipose tissue. The white adipocyte displays a unique structure with a single, large droplet associated with low proportional cytoplasm content and very few mitochondria, especially when compared with its counterpart in brown adipose tissue, the brown adipocyte. In fact, reports increasingly describe the great heterogeneity of the cell population of white adipose tissue. Indeed, adipocytes represent < 50% of the cells present in adipose tissue. The other cell fraction corresponds to the stromal fraction that contains endothelial, hematopoietic, and progenitor cells, such as adipose-derived stromal cells (ASCs), which were recently described as multipotent (43). These ASC can give rise to new differentiated adipocytes all throughout life, including in humans, and can participate in the enlargement associated with obesity.

The debate about the effects of ROS on adipocytes was largely concentrated on H₂O₂ mimicking the effect of insulin and being associated with insulin action on glucose transport, suggesting that cellular H₂O₂ generation was integral to insulin signaling (44). Insulin-stimulated H₂O₂ triggers insulin signaling, at least in part through the oxidative inhibition of protein tyrosine phosphatases that negatively regulate the insulin action pathway via the de-phosphorylation of various tyrosine residues of the insulin receptor and its substrate proteins (44). The resulting activation of insulin signaling promotes the release of insulin-stimulated H₂O₂ that corresponds to a positive retro-control that enhances insulin's effect. It was proposed that Nox4, a member of the NADPH oxidase family, largely mediates this insulin-stimulated generation of H₂O₂ (44).

In contrast to the insulin-stimulated generation of H₂O₂, and because white adipocytes display a low mitochondrial content, the physiological importance of mROS as a respiratory-chain byproduct was long neglected. In 2003, Wilson-Fritch and colleagues demonstrated that mitochondrial biogenesis is inherent to adipose differentiation *per se* and is influenced by the actions of adipogenic factors, including insulin and thiazolidinediones, *in vitro* as well as *in vivo* (106, 107). This view is currently evolving (31), but building upon this seminal study and using different respiratory chain inhibitors in the presence or absence of antioxidants, we demonstrated that moderate mROS generation inhibits the proliferation of adipocyte progenitors (21). Moreover, we illustrated that adipocyte differentiation is very sensitive to mROS because transient exposure to such stimuli at confluence influences the yield of adipocyte differentiation as

assessed 7 days later. The inhibition of adipogenesis would be mediated via the increase in the protein CHOP10, a member of CCAAT-enhancer-binding proteins family that can have a dominant-negative effect on all other members of the family (19). When investigating the putative physiological relevance of our *in vitro* data, we also demonstrated that adipose tissue in obese animals is associated with an increase in GSH as well as many other antioxidant defenses (39). *In vitro*, when these changes were mimicked by the treatment of preadipocytes with an antioxidant, they strongly promoted adipogenesis consistently with our previous *in vitro* data. Altogether, these results led us to speculate that obesity is associated with an increase in antioxidant defenses that could, in turn, promote cell proliferation and differentiation through the modulation of redox-sensitive transcription factors. This supplementary adipogenesis further increases the antioxidant defenses that promote and amplify the onset of obesity. Thus, a proadipogenic loop corresponding to a deleterious cycle is established (Fig. 2). This management of redox metabolism is site specific (39) and more adaptive in subcutaneous fat than in internal fat. This pattern is consistent with the protective role of subcutaneous fat (102). Another indirect argument can be found to support the idea that mROS can, as a cell metabolism sensor, control the insulin sensitivity of adipocytes and their endocrine functions. Indeed, inhibition of UCP2 by genipin reduces the insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes (113). This finding is also consistent with the effects of hyperglycemia on adipocytes, which are associated with a decrease in insulin sensitivity and the stimulation of inflammatory cytokines (64). Indeed, the effects of hyperglycemia can be mimicked by stimulating mROS generation or, in

contrast, blunted by any manipulations that decrease mROS generation. However, the downregulation of glutathione-S-transferase in adipose tissue leads to increased protein carbonylation, ROS production, and mitochondrial dysfunction and contribute to the development of insulin resistance and T2D (29). More spectacularly, Villarroya's group demonstrated that the modulation of mROS levels by mitochondrial activity, specifically as a consequence of the action of UCP2, controls adiponectin gene expression (26). This control provides a key physiological mechanism by which the energetic status of adipose tissue conditions systemic insulin sensitivity via mROS signaling and its effect on the balance of insulin-sensitizing or inflammatory cytokines (26, 64). These conclusions are very consistent with a recent report showing that mitochondrial superoxide anion levels are increased in four models of insulin resistance, and that either pharmacologic or genetic strategies that override or increase mitochondrial superoxide anion levels reverse or trigger, respectively, the onset of insulin-resistance both *in vivo* and *in vitro* (51). Once again, this implicates mitochondrial superoxide as a metabolic sensor that links excess energy and the intracellular metabolism of muscles with the control of insulin action. In the context of hyperglycemia or dyslipidemia, this impairment could be enhanced by mitochondrial dysfunction (40).

More recently, another mitochondrial source of superoxide anion, the p66Shc protein, was documented in the insulin signaling pathway. It is noteworthy that such generation depends on the electron transfer of the respiratory chain but is not intimately linked to mROS generation from complexes I and III. p66Shc was the first mammalian gene whose mutation was demonstrated to increase resistance to oxidative stress and to prolong lifespan (72). It appears that p66Shc translocates to the mitochondria of stress-challenged cells where it catalyzes the formation of H_2O_2 in the mitochondrial intermembrane space through an inherent ROS-producing activity and decreases expression of manganese-dependent SOD (78). This ROS formation might trigger the initiation of the mitochondrial apoptosis pathway (41). This pathway is activated by insulin specifically in adipocytes and regulates insulin signaling through multiple mechanisms. In contrast, the deletion of p66 (Shc) resulted in reduced triglyceride accumulation in adipocytes and decreased *in vivo* fat mass (12). These findings suggest that p66(Shc)-generated ROS regulates the effect of insulin on energy metabolism in mice and that such intracellular oxidative stress accelerates aging by favoring fat deposition and fat-related disorders. However, a recent report described that p66 deficiency in *ob=ob* mice increased inhibitory phosphorylation of IRS-1 and enhanced the activity of S6K, resulting in the improvement of insulin resistance in obese mice (89). The authors propose an explanation for the discrepancy featuring a pro- or antiadipogenic role for this enzyme according to the insulinemia and nutrient availability corresponding to a normal or diabetic context. They also emphasized that when p66shc KO mice are fed a high-fat diet, they display better glucose control, in spite of lower plasma insulin levels, than wild-type mice.

At the intracellular level, it was demonstrated that mild oxidative conditions enhance the activation of the insulin receptor subunit, suggesting that optimal insulin responsiveness involves a "redox priming" of the subunit (44). Thus, the cross-talk between insulin and ROS signaling could be initiated by the insulin-mediated generation of low levels of

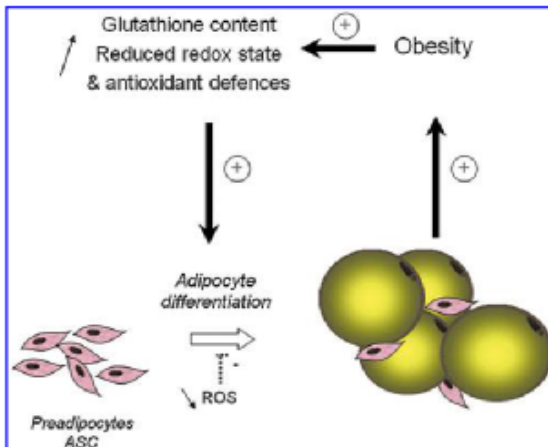


FIG. 2. Deleterious redox cycle in obesity. The adipocyte differentiation and hypertrophy lead to obesity and are associated with an increase in antioxidant defenses and an increase of the glutathione content and its reduced form. These elements promote in turn adipocyte differentiation and hypertrophy by preventing the antiadipogenic mitochondrial reactive oxygen species signal. This in turn promotes further obesity, and a deleterious cycle takes place. ASC, adipose-derived stromal cell; ROS, reactive oxygen species. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article at www.liebertonline.com=ars).

endogenous H₂O₂. This conclusion, consistent with the pro-insulin effect induced by H₂O₂, is quite different from the previous conclusion that oxidative stress from the mitochondrial respiratory chain inhibits adipogenesis. One explanation for these different results is that mitochondrial dysfunctions are not systematically linked to the inhibition of adipogenesis (31) and that triglyceride storage is not only dependent on lipogenesis and free fatty acid uptake but also on lipid oxidation. We can propose that, according to the alteration of electron transfer through the different complexes of the respiratory chain, the oxidation processes could be impaired enough to result in lipid accumulation as a dominant element.

In addition to the role of respiratory-chain-generated mROS on adipocyte function, we questioned whether mROS production may change ASC plasticity because these cells can behave as endothelial-like cells (86). Indeed, ROS have been shown to play major and positive roles in blood vessel growth as well as in vivo preconditioning protection (70). We showed that transient and moderate stimulation of mROS generation in ASC before their injection into ischemic hind limbs strongly improved revascularization and the number of ASC-derived CD31-positive cells in the ischemic area (19). mROS generation increased the secretion of the pro-angiogenic and antiapoptotic factors VEGF and HGF and greatly protected ASCs against oxidative-stress-induced cell death (20). These data lead us to propose a provocative scheme for adipose tissue development, similar to tumor growth. When adipocytes become hypertrophic, hypoxia occurs and superoxide anions are generated by the respiratory chain (19, 24, 46, 108). This signal inhibits the adipogenic differentiation of ASCs and promotes their angiogenic potential. This, in turn, triggers neoangiogenesis, which provides nutrients and oxygen to the enlarging tissue, increasing oxygen tension, decreasing hypoxia, and promoting adipogenesis. In this way, adipose tissue can enlarge through successive waves of adipogenesis and angiogenesis.

Moreover, all these phenomena, in vitro as well as in vivo, could participate in the site-specific adverse effects (lipodystrophy) of drugs able to interact with mitochondria, such as nucleotide reverse transcriptase inhibitors used in HIV-treatment (32, 93).

Altogether, these data provide significant clues to consider mROS a basic fundamental and physiological signal for adipocyte functioning, including its endocrine function and development that are closely linked to its own energetic status. According to the importance of such a link, it is reasonable to propose that it could also participate in any of the dysfunctions associated with impaired mitochondria in adipose tissue that are regularly described in diabetic or obese patients (31). Conversely, any improvement in mitochondrial function and electron transfer would be associated with an improvement in the disease via, at least in part, the recovery of physiological mROS signaling (107).

Conclusion

Mitochondria are important energetic organelles that have been shown in recent studies to generate ROS according to nutrient, hormonal, and/or O₂ fluxes and to mediate normal responses. They represent a central crossroads of metabolic pathways, and the genesis of mROS signals, occurring in the respiratory chain, provides the cell with precise information because mROS production reflects both the input and need of

energy. Signaling through mROS has now been identified in numerous metabolic studies and in many cell types, shedding light on the overall importance of mROS throughout the body and their crucial role in the control of energy status. The delineation of the physiological signaling that mROS enable versus the deleterious effects that they trigger remains blurred and merits further investigation. Much remains to be explored in terms of the physiological mechanism of the signal, its novel targets, and the primary events leading to the progression and establishment of metabolic disorders in which general oxidative stress plays a major role.

Acknowledgments

This work was supported by National Research Program on Cardiovascular Diseases (no. PNC0402), Cell and Gene Therapy Program from Région Midi-Pyrénées (no. 03011999), Interreg IIIA (no. 13 13A- A-7-85-O) and by Agence Nationale pour la Recherche sur le SIDA (Grant 05003-06003) and the Agence Nationale pour la Recherche (ANR, NT05-2_42268), and by Programme National de la Recherche sur le Diabète (PNRD hypoglucos), Agence Nationale de la Recherche (ANR-06-PHY-SIO-Oox), Alfediam (Prize Merck-Lipha 2009).

References

1. Abizaid A and Horvath TL. Brain circuits regulating energy homeostasis. *Regul Pept* 149: 3–10, 2008.
2. Adam-Vizi V. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal* 7: 1140–1149, 2005.
3. Ainscow EK, Mirshamsi S, Tang T, Ashford ML, and Rutter GA. Dynamic imaging of free cytosolic ATP concentration during fuel sensing by rat hypothalamic neurons: evidence for ATP-independent control of ATP-sensitive K_v channels. *J Physiol* 544: 429–445, 2002.
4. Alquier T, Leloup C, Atef N, Fioramonti X, Lorsignol A, and Pénicaud L. Cerebral insulin increases brain response to glucose. *J Neuroendocrinol* 15: 75–79, 2003.
5. Andrews ZB, Liu ZW, Wallingford N, Erion DM, Borok E, Friedman JM, Tschöp MH, Shanabrough M, Cline G, Shulman GI, Coppola A, Gao XB, Horvath TL, and Diano S. UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* 454: 846–851, 2008.
6. Arkblad EL, Tuck S, Pestov NB, Dmitriev RI, Kostina MB, Senvall J, Tranberg M, and Rydström J A *Caenorhabditis elegans* mutant lacking functional nicotinamide nucleotide transhydrogenase displays increased sensitivity to oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 38: 1518–1525, 2005.
7. Avshalumov MV and Rice ME. Activation of ATP-sensitive K_v (K(ATP)) channels by H₂O₂ underlies glutamate-dependent inhibition of striatal dopamine release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11729–11734, 2003.
8. Azzu V and Brand MD. The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. *Trends Biochem Sci* 35: 298–307, 2010.
9. 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.
10. Barja G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr* 31: 347–366, 1999.

11. Benani A, Troy S, Carmona MC, Fioramonti X, Lorsignol A, Leloup C, Castella L, and Pénicaud L. Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: redox regulation of food intake. *Diabetes* 56: 152–160, 2007.
12. Berniakovich I, Trinei M, Stendardo M, Migliaccio E, Minucci S, Bernardi P, Pelicci PG, and Giorgio M. p66Shc-generated oxidative signal promotes fat accumulation. *J Biol Chem* 283: 34283–34293, 2008.
13. Bienert GP, Møller AL, Kristiansen KA, Schulz A, Møller IM, Schjoerring JK, and Jahn TP. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem* 282: 1183–1192, 2007.
14. Bindokas VP, Kuznetsov A, Sreenan S, Polonsky KS, Roe MW, and Philipson LH. Visualizing superoxide production in normal and diabetic rat islets of Langerhans. *J Biol Chem* 278: 9796–9801, 2003.
15. Bouillaud F. UCP2, not a physiologically relevant uncoupler but a glucose sparing switch impacting ROS production and glucose sensing. *Biochim Biophys Acta* 1787: 377–383, 2009.
16. Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol* 45: 466–472, 2010.
17. Bray GA. Afferent signals regulating food intake. *Proc Nutr Soc* 59: 373–384, 2000.
18. Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, and Stoppani AO. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 180: 248–257, 1977.
19. Carrière A, Carmona MC, Fernandez Y, Rigoulet M, Wenger RH, Pénicaud L, and Castella L. Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10=GADD153 and adipocyte differentiation: a mechanism for hypoxia-dependent effect. *J Biol Chem* 279: 40462–40469, 2004.
20. Carrière A, Ebrahimian TG, Dehez S, Augé N, Joffre C, André M, Arnal S, Duriez M, Barreau C, Arnaud E, Fernandez Y, Planat-Benard V, Lévy B, Pénicaud L, Silvestre JS, and Castella L. Preconditioning by mitochondrial reactive oxygen species improves the proangiogenic potential of adipose-derived cells-based therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 1093–1099, 2009.
21. Carrière A, Fernandez Y, Rigoulet M, Pénicaud L, and Castella L. Inhibition of preadipocyte proliferation by mitochondrial reactive oxygen species. *FEBS Lett* 550: 163–167, 2003.
22. Castella L, Rigoulet M, and Pénicaud L. Mitochondrial ROS metabolism: modulation by uncoupling proteins. *IUBMB Life* 52: 181–188, 2001.
23. Chan CB and Harper ME. Uncoupling proteins: role in insulin resistance and insulin insufficiency. *Curr Diabetes Rev* 2: 271–283, 2006.
24. Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Smon MC, and Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 11715–11720, 1998.
25. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, and Lesnfsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 278: 36027–36031, 2003.
26. Chevillotte E, Giralt M, Miroux B, Ricquier D, and Villarroya. Uncoupling protein-2 controls adiponectin gene expression in adipose tissue through the modulation of reactive oxygen species production. *Diabetes* 56: 1042–1050, 2007.
27. Colombani AL, Carneiro L, Benani A, Galinier A, Jaillard T, Duparc T, Offer G, Lorsignol A, Magnan C, Castella L, Pénicaud L, and Leloup C. Enhanced hypothalamic glucose sensing in obesity: alteration of redox signaling. *Diabetes* 58: 2189–2197, 2009.
28. Coppola A, Liu ZW, Andrews ZB, Paradis E, Roy MC, Friedman JM, Ricquier D, Richard D, Horvath TL, Gao XB, and Diano S. A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell Metab* 5: 21–33, 2007.
29. Curtis JM, Grimsrud PA, Wright WS, Xu X, Foncea RE, Graham DW, Brestoff JR, Wiczler BM, Ilkayeva O, Cianflone K, Mucio DE, Arriaga EA, and Bernlohr DA. Down regulation of adipose glutathione S-transferase leads to increased protein carbonylation, oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 59: 1132–1142, 2010.
30. De Pauw A, Tejerina S, Raes M, Keijer J, and Arnould T. Mitochondrial (dys)function in adipocyte (de)differentiation and systemic metabolic alterations. *Am J Pathol* 175: 927–939, 2009.
31. Deierborg T, Wieloch T, Diano S, Warden CH, Horvath TL, and Mattiasson G. Overexpression of UCP2 protects thalamic neurons following global ischemia in the mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 28: 1186–1195, 2008.
32. Deveaud C, Beauvoit B, Hagry S, Galinier A, Carrière A, Salin B, Schaeffer J, Caspar-Bauguil S, Fernandez Y, Gordien JB, Breilh D, Pénicaud L, Castella L, and Rigoulet M. Site specific alterations of adipose tissue mitochondria in 3rd azido-3rd-deoxythymidine (AZT)-treated rats: an early stage in lipodystrophy? *Biochem Pharmacol* 70: 90–101, 2005.
33. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47–95, 2002.
34. Echant KS, Murphy MP, Smith RA, Talbot DA, and Brand MD. Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. Studies using targeted antioxidants. *J Biol Chem* 277: 47129–47135, 2002.
35. Echant KS. Mitochondrial uncoupling proteins—what is their physiological role? *Free Radic Biol Med* 43: 1351–1371, 2007.
36. Fioramonti X, Lorsignol A, Taupignon A, and Pénicaud L. A new ATP-sensitive K_p channel-independent mechanism is involved in glucose-excited neurons of mouse arcuate nucleus. *Diabetes* 3: 2767–2775, 2004.
37. Forman HJ, Fukuto JM, and Torres M. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C246–C256, 2004.
38. Freeman H, Shimomura K, Horner E, Cox RD, and Ashcroft FM. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a key role in insulin secretion. *Cell Metab* 3: 35–45, 2006.
39. Galinier A, Carrière A, Fernandez Y, Carpené C, André M, Caspar-Bauguil S, Thouvenot JP, Périquet B, Pénicaud L, and Castella L. Adipose tissue proadipogenic redox changes in obesity. *J Biol Chem* 281: 12682–12687, 2006.
40. Gao CL, Zhu C, Zhao YP, Chen XH, J CB, Zhang CM, Zhu JG, Xia ZK, Tong ML, and Guo XR. Mitochondrial dysfunction is induced by high levels of glucose and free fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 320: 25–33, 2010.
41. Gertz M and Steegborn C. The lifespan-regulator p66Shc in mitochondria: redox enzyme or redox sensor? *Antioxid Redox Signal* 13: 1417–1428, 2010.
42. Gier B, Krippeit-Drews P, Sheiko T, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Düfer M, and Drews G. Suppression of KATP channel

- activity protects murine pancreatic beta cells against oxidative stress. *J Clin Invest* 119: 3246–3256, 2009.
43. Gimble JM, Katz AJ, and Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 100: 1249–1260, 2007.
 44. Goldstein BJ, Mahadev K, Wu X, Zhu L, and Motoshima H. Role of insulin-induced reactive oxygen species in the insulin signaling pathway. *Antioxid Redox Signal* 7: 1021–1031, 2005.
 45. Görlach A, Klappa P, and Kietzmann T. The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxid Redox Signal* 8: 1391–1420, 2006.
 46. Hamanaka RB and Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. *Curr Opin Cell Bio* 21: 894–899, 2009.
 47. Han D, Williams E, and Cadenas E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J* 353: 411–416, 2001.
 48. Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, Okada Y, Imoto K, and Mori Y. LTRPC2 Ca^{2+} -permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell* 9: 163–173, 2002.
 49. Hawley SA, Ross FA, Chevtzoff C, Green KA, Evans A, Fogarty S, Towler MC, Brown LJ, Ogunbayo OA, Evans AM, and Hardie DG. Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metab* 11: 554–565, 2010.
 50. Henquin JC. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49: 1751–1760, 2000.
 51. Hoehn KL, Salmon AB, Hohnen-Behrens C, Turner N, Hoy AJ, Maghazal GJ, Stocker R, Van Remmen H, Kraegen EW, Cooney GJ, Richardson AR, and James DE. Insulin resistance is a cellular antioxidant defense mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 17787–17792, 2009.
 52. Hoek JB and Rydström J. Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Biochem J* 254: 1–10, 1988.
 53. Horvath TL, Andrews ZB, and Diano S. Fuel utilization by hypothalamic neurons: roles for ROS. *Trends Endocrinol Metab* 20: 78–87, 2009.
 54. Hou N, Torii S, Saito N, Hosaka M, and Takeuchi T. Reactive oxygen species-mediated pancreatic b-cell death is regulated by interactions between stress-activated protein kinases, p38 and c-Jun N-terminal kinase, and mitogen-activated protein kinase phosphatases. *Endocrinology* 149: 1654–1665, 2009.
 55. Jacobson DA and Philipson LH. TRP channels of the pancreatic beta cell. *Handb Exp Pharmacol* 179: 409–424, 2007.
 56. Janssen-Heininger YM, Mossman BT, Heintz NH, Forman HJ, Kalyanaraman B, Finkel T, Stamler JS, Rhee SG, and van der Vliet A. Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radic Biol Med* 45: 1–17, 2008.
 57. Kolisek M, Beck A, Fleig A, and Penner R. Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels. *Mol Cell* 18: 61–69, 2005.
 58. Krippel-Drewe P, Kramer C, Welker S, Lang F, Ammon HP, and Drewe G. Interference of H₂O₂ with stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic beta-cells. *J Physiol* 514: 471–481, 1999.
 59. Kubisch HM, Wang J, Luche R, Carlson E, Bray TM, Epstein CJ, and Phillips JP. Transgenic copper= zinc superoxide dismutase modulates susceptibility to type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9956–9959, 1994.
 60. Lacraz G, Figeac F, Movassat J, Kassis N, Coulaud J, Galinier A, Leloup C, Bailbé D, Homo-Delarche F, and Portha B. Diabetic beta-cells can achieve self-protection against oxidative stress through an adaptive up-regulation of their antioxidant defenses. *PLoS One* 4: e6500, 2009.
 61. Leloup C, Magnan C, Benani A, Bonnet E, Alquier T, Offer G, Carriere A, Périquet A, Fernandez Y, Ktorza A, Castella L, and Pénicaud L. Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing. *Diabetes* 55: 2084–2090, 2006.
 62. Leloup C, Tourrel-Cuzin C, Magnan C, Karaca M, Castel J, Carneiro L, Colombani AL, Ktorza A, Castella L, and Pénicaud L. Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 58: 673–681, 2009.
 63. Lenzen S, Drinkgern J, and Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 20: 463–466, 1996.
 64. Lin Y, Berg AH, Iyengar P, Lam TK, Giacca A, Combs TP, Rajala MW, Du X, Rollman B, Li W, Hawkins M, Barzilai N, Rhodes CJ, Fantus IG, Brownlee M, and Scherer PE. The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 280: 4617–4626, 2005.
 65. Maechler P, Carobbio S, and Rubi B. In beta-cells, mitochondria integrate and generate metabolic signals controlling insulin secretion. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 696–709, 2006.
 66. Maechler P, Jornot L, and Wollheim CB. Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 274: 27905–27913, 1999.
 67. Malorni W, Campesi I, Straface E, Vella S, and Franconi F. Redox features of the cell: a gender perspective. *Antioxid Redox Signal* 9: 1779–1801, 2007.
 68. Martens GA, Cai Y, Hinke S, Stangé G, Van de Casteele M, and Pipeleers D. Glucose suppresses superoxide generation in metabolically responsive pancreatic b cells. *J Biol Chem* 280: 20389–20396, 2005.
 69. Mattiasson G, Shamloo M, Gido G, Mathi K, Tomasevic G, Yi S, Warden CH, Castilho RF, Melcher T, Gonzalez-Zulueta M, Nikolich K, and Wieloch T. Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nat Med* 9: 1062–1068, 2003.
 70. Maulik N. Redox signaling of angiogenesis. *Antioxid Redox Signal* 4: 805–815, 2002.
 71. Mehta SL and Li PA. Neuroprotective role of mitochondrial uncoupling protein 2 in cerebral stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 29: 1069–1078, 2009.
 72. Migliaccio E, Giorgio M, and Pelicci PG. Apoptosis and aging: role of p66Shc redox protein. *Antioxid Redox Signal* 8: 600–608, 2006.
 73. Miller EW, Dickinson BC, and Chang CJ. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 15681–15686, 2010.
 74. Mobbs CV, Isoda F, Makimura H, Mastaitis J, Mizuno T, Shu IW, Yen K, and Yang XJ. Impaired glucose signaling as a cause of obesity and the metabolic syndrome: the glucocorticoid hypothesis. *Physiol Behav* 85: 3–23, 2005.

75. Mountjoy PD and Rutter GA. Glucose sensing by hypothalamic neurones and pancreatic islet cells: ample evidence for common mechanisms? *Exp Physiol* 92: 311–319, 2007.
76. Nègre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, Cazenave R, Trolly M, Salvayre R, Pénicaud L, and Casteilla L. A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J* 11: 809–815, 1997.
77. Nemoto S, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, and Finkel T. Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism. *Mol Cell Biol* 20: 7311–7318, 2000.
78. Pani G, Koch OR, and Galeotti T. The p53-p66shc-Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) network: a mitochondrial intrigue to generate reactive oxygen species. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 1002–1005, 2009.
79. Páramo B, Hernández-Fonseca K, Estrada-Sánchez AM, Jiménez N, Hernández-Cruz A, and Massieu L. Pathways involved in the generation of reactive oxygen and nitrogen species during glucose deprivation and its role on the death of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 167: 1057–1069, 2010.
80. Parker N, Vidal-Puig AJ, Azzu V, and Brand MD. Dysregulation of glucose homeostasis in nicotinamide nucleotide transhydrogenase knockout mice is independent of uncoupling protein 2. *Biochim Biophys Acta* 1787: 1451–1457, 2009.
81. Parton LE, Ye CP, Coppari R, Enriori PJ, Choi B, Zhang CY, Xu C, Vianna CR, Balthasar N, Lee CE, Elmquist JK, Cowley MA, and Lowell BB. Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 449: 228–232, 2007.
82. Pedersen A, Karlsson GB, and Rydström J. Proton-translocating transhydrogenase: an update of unsolved and controversial issues. *J Bioenerg Biomembr* 40: 463–473, 2008.
83. Pénicaud L, Leloup C, Fioramonti X, Lorsignol A, and Benani A. Brain glucose sensing: a subtle mechanism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9: 458–62, 2006.
84. Pi J, Bai Y, Daniel KW, Liu D, Lyght O, Edelstein D, Brownlee M, Corkey BE, and Collins S. Persistent oxidative stress due to absence of uncoupling protein 2 associated with impaired pancreatic b-cell function. *Endocrinology* 150: 3040–3048, 2009.
85. Pi J, Bai Y, Zhang Q, Wong V, Floering LM, Daniel K, Reece JM, Deeney JT, Andersen ME, Corkey BE, and Collins S. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 56: 1783–1791, 2007.
86. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Pénicaud L, and Casteilla L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 109: 656–663, 2004.
87. Produit-Zengaffinen N, Davis-Lameloise N, Perreten H, Bécard D, Gjinovci A, Keller PA, Wollheim CB, Herrera P, Muzzin P, and Assimakopoulos-Jaannet F. Increasing uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells does not alter glucose-induced insulin secretion but decreases production of reactive oxygen species. *Diabetologia* 50: 84–93, 2007.
88. Qian F, Huang P, Ma L, Kutznetsov A, Tamarina N, and Philipson LH. TRP genes: candidates for non-selective cation channels and store-operated channels in insulin-secreting cells. *Diabetes* 51: S183–S189, 2002.
89. Ranieri SC, Fusco S, Panieri E, Labate V, Mele M, Tesori V, Ferrara AM, Maulucci G, De Spirito M, Martorana GE, Galeotti T, and Pani G. Mammalian life-span determinant p66shcA mediates obesity-induced insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 13420–13425, 2010.
90. Rhee SG. H₂O₂, a necessary evil for cell. *Science* 312: 1882–3, 2006.
91. Richard D, Clavel S, Huang Q, Sanchis D, and Ricquier D. Uncoupling protein 2 in the brain: distribution and function. *Biochem Soc Trans* 29: 812–817, 2001.
92. Rorsman P. The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia* 40: 487–495, 1997.
93. Saillan-Barreau C, Tabbakh O, Chavoïn JP, Casteilla L, and Pénicaud L. Site specific alterations of adipose tissue mitochondria in 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT)-treated rats: an early stage in lipodystrophy? Drug-specific effect of nelfinavir and stavudine on primary culture of human preadipocytes. *J Acquir Immune Defic Syndr* 48: 20–25, 2008.
94. Sakai K, Matsumoto K, Nishikawa T, Suefujii M, Nakamaru K, Hirashima Y, Kawashima J, Shirohani T, Ichinose K, Brownlee M, and Araki E. Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic b-cells. *Biochem Biophys Res Com* 300: 216–222, 2003.
95. St. Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, and Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277: 44784–44790, 2002.
96. Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr., Seeley RJ, and Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404: 661–671, 2000.
97. Seeley RJ and York DA. Fuel sensing and the central nervous system (CNS): implications for the regulation of energy balance and the treatment for obesity. *Obes Rev* 6: 259–265, 2005.
98. Singh P, Jain A, and Kaur G. Impact of hypoglycemia and diabetes on CNS: correlation of mitochondrial oxidative stress with DNA damage. *Mol Cell Biochem* 260: 153–159, 2004.
99. Thorens B. Glucose sensing and the pathogenesis of obesity and type 2 diabetes. *Int J Obes (Lond)* 32: S62–S71, 2008.
100. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, and Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and anti-oxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46: 1733–1742, 1997.
101. Togashi K, Hara Y, Tominaga T, Higashi T, Konishi Y, Mori Y, and Tominaga M. TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J* 25: 1804–1815, 2006.
102. Tran TT, Yamamoto Y, Gesta S, and Kahn CR. Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab* 7: 410–420, 2008.
103. Tsubouchi H, Inoguchi T, Inuo M, Kakimoto M, Sonta T, Sonoda N, Sasaki S, Kobayashi K, Sumimoto H, and Nawata H. Sulfonylurea as well as elevated glucose levels stimulate reactive oxygen species production in the pancreatic beta-cell line, MIN6—a role of NAD(P)H oxidase in beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 326: 60–65, 2005.
104. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552: 335–344, 2003.
105. Wang P, Mariman E, Renes J, and Keijer J. The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. *J Cell Physiol* 216: 3–13, 2008.
106. Wilson-Fritch L, Burkart A, Bell G, Mendelson K, Leszyk J, Nicoloso S, Czech M, and Corvera S. Mitochondrial

- biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. *Mol Cell Biol* 23: 1085–1094, 2003.
107. Willson-Fritch L, Nicoloso S, Chouinard M, Lazar MA, Chui PC, Leszyk J, Straubhaar J, Czech MP, and Corvera S. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest* 114: 1281–1289, 2004.
 108. Wood IS, de Heredia FP, Wang B, and Trayhurn P. Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. *Proc Nutr Soc* 68: 370–377, 2009.
 109. Woods SC, Schwartz MW, Baskin DG, and Seeley RJ. Food intake and the regulation of body weight. *Annu Rev Psychol* 51: 255–277, 2000.
 110. Yamamoto M, Yamato E, Toyoda S, Tashiro F, Ikegami H, Yodoi J, and Miyazaki J. Transgenic expression of antioxidant protein thioredoxin in pancreatic beta cells prevents progression of type 2 diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal* 10: 43–49, 2008.
 111. Yang XJ, Kow LM, Funabashi T, and Mobbs CV. Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms. *Diabetes* 48: 1763–1772, 1999.
 112. Zhang CY, Parton LE, Ye CP, Krauss S, Shen R, Lin CT, Porco JA Jr., and Lowell BB. Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced beta cell dysfunction in isolated pancreatic islets. *Cell Metab* 3: 417–427, 2006.
 113. Zhou H, Zhao J, and Zhang X. Inhibition of uncoupling protein 2 by genipin reduces insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Arch Biochem Biophys* 486: 88–93, 2009.

Address correspondence to:

Prof. Corinne Leloup
 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation
 Centre National de la Recherche Scientifique
 Unité Mixte de Recherche 6265–Institut National de
 Recherche Agronomique 1324
 Université de Bourgogne
 15 rue Hugues Picardet, 21000 Dijon
 France

E-mail: leloup@ict.fr

Date of first submission to ARS Central, June 25, 2010; date of final revised submission, October 25, 2010; date of acceptance, October 26, 2010.

Abbreviations Used

AgRP ¼ agouti-related peptide
 ASCs ¼ adipose-derived stromal cells
 GE neurons ¼ gluco-excited neurons
 GSH ¼ reduced glutathione
 GSIS ¼ glucose-stimulated insulin secretion
 H₂O₂ ¼ hydrogen peroxide
 HET ¼ hydroethidine
 mROS ¼ mitochondrial reactive oxygen species
 NPY ¼ neuropeptide Y
 POMC ¼ pro-opiomelanocortin
 SOD ¼ superoxide dismutase
 T2D ¼ type 2 diabetes
 UCP2 ¼ uncoupling protein 2
 ZDF ¼ Zucker diabetic fatty

BIBLIOGRAPHIE

Abbott, C.R., Kennedy, A.R., Wren, A.M., Rossi, M., Murphy, K.G., Seal, L.J., Todd, J.F., Ghatei, M.A., Small, C.J., and Bloom, S.R. (2003). Identification of hypothalamic nuclei involved in the orexigenic effect of melanin-concentrating hormone. *Endocrinology* *144*, 3943-3949.

Allen, R.G., and Tresini, M. (2000). Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* *28*, 463-499.

Alquier, T., Leloup, C., Atef, N., Fioramonti, X., Lorsignol, A., and Penicaud, L. (2003). Cerebral insulin increases brain response to glucose. *J Neuroendocrinol* *15*, 75-79.

Anand, B.K., Chhina, G.S., Sharma, K.N., Dua, S., and Singh, B. (1964). Activity of Single Neurons in the Hypothalamic Feeding Centers: Effect of Glucose. *Am J Physiol* *207*, 1146-1154.

Andrews, Z.B., Diano, S., and Horvath, T.L. (2005). Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: in support of function and survival. *Nat Rev Neurosci* *6*, 829-840.

Andrews, Z.B., Liu, Z.W., Wallingford, N., Erion, D.M., Borok, E., Friedman, J.M., Tschop, M.H., Shanabrough, M., Cline, G., Shulman, G.I., *et al.* (2008). UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* *454*, 846-851.

Aravich, P.F., and Sclafani, A. (1983). Paraventricular hypothalamic lesions and medial hypothalamic knife cuts produce similar hyperphagia syndromes. *Behav Neurosci* *97*, 970-983.

Arluison, M., Quignon, M., Nguyen, P., Thorens, B., Leloup, C., and Penicaud, L. (2004a). Distribution and anatomical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain--an immunohistochemical study. *J Chem Neuroanat* *28*, 117-136.

Arluison, M., Quignon, M., Thorens, B., Leloup, C., and Penicaud, L. (2004b). Immunocytochemical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain. II. Electron microscopic study. *J Chem Neuroanat* *28*, 137-146.

Arnoult, D., Rismanchi, N., Grodet, A., Roberts, R.G., Seeburg, D.P., Estaquier, J., Sheng, M., and Blackstone, C. (2005). Bax/Bak-dependent release of DDP/TIMM8a promotes Drp1-mediated mitochondrial fission and mitoptosis during programmed cell death. *Curr Biol* *15*, 2112-2118.

Arsenijevic, D., Onuma, H., Pecqueur, C., Raimbault, S., Manning, B.S., Miroux, B., Couplan, E., Alves-Guerra, M.C., Gubern, M., Surwit, R., *et al.* (2000). Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet* *26*, 435-439.

Ashcroft, S.J., and Ashcroft, F.M. (1990). Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal* *2*, 197-214.

Atef, N., Ktorza, A., and Penicaud, L. (1995). CNS involvement in the glucose induced increase of islet blood flow in obese Zucker rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* *19*, 103-107.

Bach, D., Naon, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Rieusset, J., Laville, M., Guillet, C., Boirie, Y., Wallberg-Henriksson, H., *et al.* (2005). Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Diabetes* *54*, 2685-2693.

Bach, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Dugaard, J.R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J.R., *et al.* (2003). Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem* *278*, 17190-17197.

Bady, I., Marty, N., Dallaporta, M., Emery, M., Gyger, J., Tarussio, D., Foretz, M., and Thorens, B. (2006). Evidence from glut2-null mice that glucose is a critical physiological regulator of feeding. *Diabetes* *55*, 988-995.

Bagnol, D., Lu, X.Y., Kaelin, C.B., Day, H.E., Ollmann, M., Gantz, I., Akil, H., Barsh, G.S., and Watson, S.J. (1999). Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *J Neurosci* *19*, RC26.

Baricault, L., Segui, B., Guegant, L., Olichon, A., Valette, A., Larminat, F., and Lenaers, G. (2007). OPA1 cleavage depends on decreased mitochondrial ATP level and bivalent metals. *Exp Cell Res* *313*, 3800-3808.

Barja, G. (1999). Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr* *31*, 347-366.

Barnstable, C.J., Li, M., Reddy, R., and Horvath, T.L. (2003). Mitochondrial uncoupling proteins: regulators of retinal cell death. *Adv Exp Med Biol* 533, 269-275.

Barrett, W.C., DeGnore, J.P., Keng, Y.F., Zhang, Z.Y., Yim, M.B., and Chock, P.B. (1999). Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem* 274, 34543-34546.

Barsoum, M.J., Yuan, H., Gerencser, A.A., Liot, G., Kushnareva, Y., Graber, S., Kovacs, I., Lee, W.D., Waggoner, J., Cui, J., *et al.* (2006). Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPases in neurons. *EMBO J* 25, 3900-3911.

Bartness, T.J., Vaughan, C.H., and Song, C.K. (2010). Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* 34 Suppl 1, S36-42.

Baskin, D.G., Figlewicz Lattemann, D., Seeley, R.J., Woods, S.C., Porte, D., Jr., and Schwartz, M.W. (1999). Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Res* 848, 114-123.

Baxter, R.V., Ben Othmane, K., Rochelle, J.M., Stajich, J.E., Hulette, C., Dew-Knight, S., Hentati, F., Ben Hamida, M., Bel, S., Stenger, J.E., *et al.* (2002). Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet* 30, 21-22.

Beck, B. (2006). Neuropeptide Y in normal eating and in genetic and dietary-induced obesity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361, 1159-1185.

Belgardt, B.F., and Bruning, J.C. (2010). CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Ann N Y Acad Sci* 1212, 97-113.

Beltowski, J., Wojcicka, G., Gorny, D., and Marciniak, A. (2000). The effect of dietary-induced obesity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and total plasma antioxidant capacity. *J Physiol Pharmacol* 51, 883-896.

Benani, A., Barquissau, V., Carneiro, L., Salin, B., Colombani, A.L., Leloup, C., Casteilla, L., Rigoulet, M., and Penicaud, L. (2009). Method for functional study of mitochondria in rat hypothalamus. *J Neurosci Methods* 178, 301-307.

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

Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T., and Rossignol, R. (2007). Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci* 120, 838-848.

Benard, G., and Rossignol, R. (2008). Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. *Antioxid Redox Signal* 10, 1313-1342.

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

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

Bergen, H.T., Mizuno, T.M., Taylor, J., and Mobbs, C.V. (1998). Hyperphagia and weight gain after gold-thioglucose: relation to hypothalamic neuropeptide Y and proopiomelanocortin. *Endocrinology* 139, 4483-4488.

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

Berthoud, H.R., Patterson, L.M., Sutton, G.M., Morrison, C., and Zheng, H. (2005). Orexin inputs to caudal raphe neurons involved in thermal, cardiovascular, and gastrointestinal regulation. *Histochem Cell Biol* 123, 147-156.

Berthoud, H.R., Sutton, G.M., Townsend, R.L., Patterson, L.M., and Zheng, H. (2006). Brainstem mechanisms integrating gut-derived satiety signals and descending forebrain information in the control of meal size. *Physiol Behav* 89, 517-524.

Biggers, D.W., Myers, S.R., Neal, D., Stinson, R., Cooper, N.B., Jaspan, J.B., Williams, P.E., Cherrington, A.D., and Frizzell, R.T. (1989). Role of brain in counterregulation of insulin-induced hypoglycemia in dogs. *Diabetes* 38, 7-16.

Billington, C.J., Briggs, J.E., Grace, M., and Levine, A.S. (1991). Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *Am J Physiol* 260, R321-327.

Bindokas, V.P., Kuznetsov, A., Sreenan, S., Polonsky, K.S., Roe, M.W., and Philipson, L.H. (2003). Visualizing superoxide production in normal and diabetic rat islets of Langerhans. *J Biol Chem* 278, 9796-9801.

Bingham, N.C., Anderson, K.K., Reuter, A.L., Stallings, N.R., and Parker, K.L. (2008). Selective loss of leptin receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus results in increased adiposity and a metabolic syndrome. *Endocrinology* 149, 2138-2148.

Bjorbaek, C., Elmquist, J.K., Frantz, J.D., Shoelson, S.E., and Flier, J.S. (1998). Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell* 1, 619-625.

Blevins, J.E., Eakin, T.J., Murphy, J.A., Schwartz, M.W., and Baskin, D.G. (2003). Oxytocin innervation of caudal brainstem nuclei activated by cholecystokinin. *Brain Res* 993, 30-41.

Blevins, J.E., Schwartz, M.W., and Baskin, D.G. (2004). Evidence that paraventricular nucleus oxytocin neurons link hypothalamic leptin action to caudal brain stem nuclei controlling meal size. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287, R87-96.

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

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

Borg, M.A., Sherwin, R.S., Borg, W.P., Tamborlane, W.V., and Shulman, G.I. (1997). Local ventromedial hypothalamus glucose perfusion blocks counterregulation during systemic hypoglycemia in awake rats. *J Clin Invest* 99, 361-365.

Borg, W.P., Doring, M.J., Sherwin, R.S., Borg, M.A., Brines, M.L., and Shulman, G.I. (1994). Ventromedial hypothalamic lesions in rats suppress counterregulatory responses to hypoglycemia. *J Clin Invest* 93, 1677-1682.

Bouzier-Sore, A.K., Merle, M., Magistretti, P.J., and Pellerin, L. (2002). Feeding active neurons: (re)emergence of a nursing role for astrocytes. *J Physiol Paris* 96, 273-282.

Boveris, A., and Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134, 707-716.

Brady, N.R., Elmore, S.P., van Beek, J.J., Krab, K., Courtoy, P.J., Hue, L., and Westerhoff, H.V. (2004). Coordinated behavior of mitochondria in both space and time: a reactive oxygen species-activated wave of mitochondrial depolarization. *Biophys J* 87, 2022-2034.

Brand, M.D. (2010). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol* 45, 466-472.

Braschi, E., Zunino, R., and McBride, H.M. (2009). MAPL is a new mitochondrial SUMO E3 ligase that regulates mitochondrial fission. *EMBO Rep* 10, 748-754.

Brookes, P.S., Yoon, Y., Robotham, J.L., Anders, M.W., and Sheu, S.S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C817-833.

Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813-820.

Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54, 1615-1625.

Burcelin, R. (2003). [Apollinaire Bouchardat prize 2003. Glycemic equilibrium and glucose detection]. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu*, 37-52.

Burcelin, R., Dolci, W., and Thorens, B. (2000a). Glucose sensing by the hepatoportal sensor is GLUT2-dependent: in vivo analysis in GLUT2-null mice. *Diabetes* 49, 1643-1648.

Burcelin, R., Dolci, W., and Thorens, B. (2000b). Portal glucose infusion in the mouse induces hypoglycemia: evidence that the hepatoportal glucose sensor stimulates glucose utilization. *Diabetes* 49, 1635-1642.

Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 102-110.

Cai, Q., and Sheng, Z.H. (2009). Mitochondrial transport and docking in axons. *Exp Neurol* 218, 257-267.

Cai, X.J., Evans, M.L., Lister, C.A., Leslie, R.A., Arch, J.R., Wilson, S., and Williams, G. (2001). Hypoglycemia activates orexin neurons and selectively increases hypothalamic orexin-B levels: responses inhibited by feeding and possibly mediated by the nucleus of the solitary tract. *Diabetes* 50, 105-112.

Calderon, P.B., and Roberfroid, M. (1988). [Free radicals and free radical-mediated toxicity]. *J Pharm Belg* 43, 390-400.

Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84, 277-359.

Canteras, N.S., Simerly, R.B., and Swanson, L.W. (1994). Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol* 348, 41-79.

Carling, D., Fryer, L.G., Woods, A., Daniel, T., Jarvie, S.L., and Whitrow, H. (2003). Bypassing the glucose/fatty acid cycle: AMP-activated protein kinase. *Biochem Soc Trans* 31, 1157-1160.

Carriere, A., Carmona, M.C., Fernandez, Y., Rigoulet, M., Wenger, R.H., Penicaud, L., and Casteilla, L. (2004). Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation: a mechanism for hypoxia-dependent effect. *J Biol Chem* 279, 40462-40469.

Cartoni, R., and Martinou, J.C. (2009). Role of mitofusin 2 mutations in the physiopathology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2A. *Exp Neurol* 218, 268-273.

Castanier, C., and Arnoult, D. (2010). [Mitochondrial dynamics during apoptosis]. *Med Sci (Paris)* 26, 830-835.

Chan, D.C. (2006). Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125, 1241-1252.

Chang, C.R., and Blackstone, C. (2007). Drp1 phosphorylation and mitochondrial regulation. *EMBO Rep* 8, 1088-1089; author reply 1089-1090.

Chang, D.T., and Reynolds, I.J. (2006). Differences in mitochondrial movement and morphology in young and mature primary cortical neurons in culture. *Neuroscience* 141, 727-736.

Chang, G.Q., Karatayev, O., Davydova, Z., and Leibowitz, S.F. (2004). Circulating triglycerides impact on orexigenic peptides and neuronal activity in hypothalamus. *Endocrinology* 145, 3904-3912.

Chen, H., and Chan, D.C. (2009). Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* 18, R169-176.

Chen, H., Vermulst, M., Wang, Y.E., Chomyn, A., Prolla, T.A., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2010). Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* 141, 280-289.

Chevrollier, A., Guillet, V., Loiseau, D., Gueguen, N., de Crescenzo, M.A., Verny, C., Ferre, M., Dollfus, H., Odent, S., Milea, D., *et al.* (2008). Hereditary optic neuropathies share a common mitochondrial coupling defect. *Ann Neurol* 63, 794-798.

Chiarugi, P., and Cirri, P. (2003). Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. *Trends Biochem Sci* 28, 509-514.

Cho, D.H., Nakamura, T., Fang, J., Cieplak, P., Godzik, A., Gu, Z., and Lipton, S.A. (2009). S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science* 324, 102-105.

Cho, D.H., Nakamura, T., and Lipton, S.A. (2010). Mitochondrial dynamics in cell death and neurodegeneration. *Cell Mol Life Sci* 67, 3435-3447.

Cho, S.H., Lee, C.H., Ahn, Y., Kim, H., Ahn, C.Y., Yang, K.S., and Lee, S.R. (2004). Redox regulation of PTEN and protein tyrosine phosphatases in H₂O₂ mediated cell signaling. *FEBS Lett* 560, 7-13.

Ciofi, P., Garret, M., Lapirot, O., Lafon, P., Loyens, A., Prevot, V., and Levine, J.E. (2009). Brain-endocrine interactions: a microvascular route in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 150, 5509-5519.

Cipolat, S., Rudka, T., Hartmann, D., Costa, V., Serneels, L., Craessaerts, K., Metzger, K., Frezza, C., Annaert, W., D'Adamio, L., *et al.* (2006). Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* *126*, 163-175.

Claramunt, R., Pedrola, L., Sevilla, T., Lopez de Munain, A., Berciano, J., Cuesta, A., Sanchez-Navarro, B., Millan, J.M., Saifi, G.M., Lupski, J.R., *et al.* (2005). Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect. *J Med Genet* *42*, 358-365.

Claret, M., Smith, M.A., Batterham, R.L., Selman, C., Choudhury, A.I., Fryer, L.G., Clements, M., Al-Qassab, H., Heffron, H., Xu, A.W., *et al.* (2007). AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *J Clin Invest* *117*, 2325-2336.

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

Collins, S., Yehuda-Shnaidman, E., and Wang, H. (2010). Positive and negative control of Ucp1 gene transcription and the role of beta-adrenergic signaling networks. *Int J Obes (Lond)* *34 Suppl 1*, S28-33.

Colombani, A.L., Carneiro, L., Benani, A., Galinier, A., Jaillard, T., Duparc, T., Offer, G., Lorsignol, A., Magnan, C., Casteilla, L., *et al.* (2009). Enhanced hypothalamic glucose sensing in obesity: alteration of redox signaling. *Diabetes* *58*, 2189-2197.

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

Cone, R.D., Cowley, M.A., Butler, A.A., Fan, W., Marks, D.L., and Low, M.J. (2001). The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord* *25 Suppl 5*, S63-67.

Coppola A, L.Z., Andrews ZB, Paradis E, Roy MC, Friedman JM, Ricquier D, Richard D, Horvath TL, Gao XB, Diano S (2007). A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell Metab* *5*, 21-33.

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

Cowley, M.A., Pronchuk, N., Fan, W., Dinulescu, D.M., Colmers, W.F., and Cone, R.D. (1999). Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron* *24*, 155-163.

Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdan, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., and Low, M.J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* *411*, 480-484.

Cowley, M.A., Smith, R.G., Diano, S., Tschop, M., Pronchuk, N., Grove, K.L., Strasburger, C.J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M.L., *et al.* (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* *37*, 649-661.

Cribbs, J.T., and Strack, S. (2007). Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep* *8*, 939-944.

Cross, A.R., and Jones, O.T. (1991). Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta* *1057*, 281-298.

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

Cruciani-Guglielmacci, C., Vincent-Lamon, M., Rouch, C., Orosco, M., Ktorza, A., and Magnan, C. (2005). Early changes in insulin secretion and action induced by high-fat diet are related to a decreased sympathetic tone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *288*, E148-154.

Cui, Y., Huang, L., Eleftheriou, F., Yang, G., Shelton, J.M., Giles, J.E., Oz, O.K., Pourbahrami, T., Lu, C.Y., Richardson, J.A., *et al.* (2004). Essential role of STAT3 in body weight and glucose homeostasis. *Mol Cell Biol* *24*, 258-269.

Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E., *et al.* (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 26, 207-210.

Deng, S., Vatamaniuk, M., Huang, X., Doliba, N., Lian, M.M., Frank, A., Velidedeoglu, E., Desai, N.M., Koeberlein, B., Wolf, B., *et al.* (2004). Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 53, 624-632.

Dennis, P.B., Jaeschke, A., Saitoh, M., Fowler, B., Kozma, S.C., and Thomas, G. (2001). Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* 294, 1102-1105.

Denu, J.M., and Tanner, K.G. (1998). Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* 37, 5633-5642.

Diamant, M. (2007). Brain insulin signalling in the regulation of energy balance and peripheral metabolism. *Ideggyogy Sz* 60, 97-108.

Diano, S., Matthews, R.T., Patrylo, P., Yang, L., Beal, M.F., Barnstable, C.J., and Horvath, T.L. (2003). Uncoupling protein 2 prevents neuronal death including that occurring during seizures: a mechanism for preconditioning. *Endocrinology* 144, 5014-5021.

Dlaskova, A., Spacek, T., Santorova, J., Plecita-Hlavata, L., Berkova, Z., Saudek, F., Lessard, M., Bewersdorf, J., and Jezek, P. (2010). 4Pi microscopy reveals an impaired three-dimensional mitochondrial network of pancreatic islet beta-cells, an experimental model of type-2 diabetes. *Biochim Biophys Acta* 1797, 1327-1341.

Donath, M.Y., and Halban, P.A. (2004). Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia* 47, 581-589.

Donovan, C.M., Hamilton-Wessler, M., Halter, J.B., and Bergman, R.N. (1994). Primacy of liver glucosensors in the sympathetic response to progressive hypoglycemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2863-2867.

Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47-95.

Dunlop, M.E., and Muggli, E.E. (2000). Small heat shock protein alteration provides a mechanism to reduce mesangial cell contractility in diabetes and oxidative stress. *Kidney Int* 57, 464-475.

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

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

Duval, C., Auge, N., Frisach, M.F., Casteilla, L., Salvayre, R., and Negre-Salvayre, A. (2002). Mitochondrial oxidative stress is modulated by oleic acid via an epidermal growth factor receptor-dependent activation of glutathione peroxidase. *Biochem J* 367, 889-894.

Echtay, K.S., Murphy, M.P., Smith, R.A., Talbot, D.A., and Brand, M.D. (2002a). Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. Studies using targeted antioxidants. *J Biol Chem* 277, 47129-47135.

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

Elias, C.F., Aschkenasi, C., Lee, C., Kelly, J., Ahima, R.S., Bjorbaek, C., Flier, J.S., Saper, C.B., and Elmquist, J.K. (1999). Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23, 775-786.

Elias, C.F., Saper, C.B., Maratos-Flier, E., Tritos, N.A., Lee, C., Kelly, J., Tatro, J.B., Hoffman, G.E., Ollmann, M.M., Barsh, G.S., *et al.* (1998). Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol* 402, 442-459.

Ellacott, K.L., Halatchev, I.G., and Cone, R.D. (2006). Interactions between gut peptides and the central melanocortin system in the regulation of energy homeostasis. *Peptides* 27, 340-349.

Erickson, J.C., Hollopeter, G., and Palmiter, R.D. (1996). Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science* 274, 1704-1707.

Esposito, L.A., Kokoszka, J.E., Waymire, K.G., Cottrell, B., MacGregor, G.R., and Wallace, D.C. (2000). Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene. *Free Radic Biol Med* 28, 754-766.

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

Fan, W., Boston, B.A., Kesterson, R.A., Hruby, V.J., and Cone, R.D. (1997). Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385, 165-168.

Fekete, C., Legradi, G., Mihaly, E., Huang, Q.H., Tatro, J.B., Rand, W.M., Emerson, C.H., and Lechan, R.M. (2000a). alpha-Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression. *J Neurosci* 20, 1550-1558.

Fekete, C., Legradi, G., Mihaly, E., Tatro, J.B., Rand, W.M., and Lechan, R.M. (2000b). 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.

Finkel, T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* 15, 247-254.

Fioramonti, X., Contie, S., Song, Z., Routh, V.H., Lorsignol, A., and 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.

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

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

Fox, E.A., and Powley, T.L. (1985). Longitudinal columnar organization within the dorsal motor nucleus represents separate branches of the abdominal vagus. *Brain Res* 341, 269-282.

Freake, H.C., and Oppenheimer, J.H. (1995). Thermogenesis and thyroid function. *Annu Rev Nutr* 15, 263-291.

Frey, T.G., and Mannella, C.A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 25, 319-324.

Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G.V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R.S., Danial, N.N., De Strooper, B., *et al.* (2006). OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 126, 177-189.

Fujimoto, K., Sakata, T., Arase, K., Kurata, K., Okabe, Y., and Shiraishi, T. (1985). Administration of D-glucosamine into the third cerebroventricle induced feeding accompanied by hyperglycemia in rats. *Life Sci* 37, 2475-2482.

Fujita, A., Sasaki, H., Ogawa, K., Okamoto, K., Matsuno, S., Matsumoto, E., Furuta, H., Nishi, M., Nakao, T., Tsuno, T., *et al.* (2005). Increased gene expression of antioxidant enzymes in KKAY diabetic mice but not in STZ diabetic mice. *Diabetes Res Clin Pract* 69, 113-119.

Ganong, W.F. (2000). Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27, 422-427.

Gao, C.L., Zhu, C., Zhao, Y.P., Chen, X.H., Ji, C.B., Zhang, C.M., Zhu, J.G., Xia, Z.K., Tong, M.L., and Guo, X.R. (2010). Mitochondrial dysfunction is induced by high levels of glucose and free fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 320, 25-33.

Garcia, M.A., Millan, C., Balmaceda-Aguilera, C., Castro, T., Pastor, P., Montecinos, H., Reinicke, K., Zuniga, F., Vera, J.C., Oate, S.A., *et al.* (2003). Hypothalamic ependymal-glia cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *J Neurochem* 86, 709-724.

Gardemann, A., Strulik, H., and Jungermann, K. (1986). A portal-arterial glucose concentration gradient as a signal for an insulin-dependent net glucose uptake in perfused rat liver. *FEBS Lett* 202, 255-259.

Genova, M.L., Pich, M.M., Biondi, A., Bernacchia, A., Falasca, A., Bovina, C., Formiggini, G., Parenti Castelli, G., and Lenaz, G. (2003). Mitochondrial production of oxygen radical species and the role of Coenzyme Q as an antioxidant. *Exp Biol Med (Maywood)* 228, 506-513.

Gerozissis, K. (2003). Brain insulin: regulation, mechanisms of action and functions. *Cell Mol Neurobiol* 23, 1-25.

Gerozissis, K. (2008). Brain insulin, energy and glucose homeostasis; genes, environment and metabolic pathologies. *Eur J Pharmacol* 585, 38-49.

Gilquin, B., Taillebourg, E., Cherradi, N., Hubstenberger, A., Gay, O., Merle, N., Assard, N., Fauvarque, M.O., Tomohiro, S., Kuge, O., *et al.* (2010). The AAA+ ATPase ATAD3A controls mitochondrial dynamics at the interface of the inner and outer membranes. *Mol Cell Biol* 30, 1984-1996.

Glowa, J.R., Barrett, J.E., Russell, J., and Gold, P.W. (1992). Effects of corticotropin releasing hormone on appetitive behaviors. *Peptides* 13, 609-621.

Grill, H.J., Ginsberg, A.B., Seeley, R.J., and Kaplan, J.M. (1998). Brainstem application of melanocortin receptor ligands produces long-lasting effects on feeding and body weight. *J Neurosci* 18, 10128-10135.

Grill, H.J., and Kaplan, J.M. (2002). The neuroanatomical axis for control of energy balance. *Front Neuroendocrinol* 23, 2-40.

Grossman, S.P. (1986). The role of glucose, insulin and glucagon in the regulation of food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev* 10, 295-315.

Guillery, O., Malka, F., Landes, T., Guillou, E., Blackstone, C., Lombes, A., Belenguer, P., Arnoult, D., and Rojo, M. (2008). Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biol Cell* 100, 315-325.

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

Gutteridge, J.M. (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact* 91, 133-140.

Hackenbrock, C.R. (1966). Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J Cell Biol* 30, 269-297.

Hahn, T.M., Breininger, J.F., Baskin, D.G., and Schwartz, M.W. (1998). Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* 1, 271-272.

Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J., and Aruoma, O.I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol* 33, 601-617.

Han, X.J., Lu, Y.F., Li, S.A., Kaitsuka, T., Sato, Y., Tomizawa, K., Nairn, A.C., Takei, K., Matsui, H., and Matsushita, M. (2008). CaM kinase I alpha-induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. *J Cell Biol* 182, 573-585.

Harder, Z., Zunino, R., and McBride, H. (2004). Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission. *Curr Biol* 14, 340-345.

Hardie, D.G., and Carling, D. (1997). The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem* 246, 259-273.

Hassouna, R., Zizzari, P., and Tolle, V. (2010). The ghrelin/obestatin balance in the physiological and pathological control of growth hormone secretion, body composition and food intake. *J Neuroendocrinol* 22, 793-804.

Hay, N., and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18, 1926-1945.

Henquin, J.C. (2000). Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49, 1751-1760.

Hillebrand, J.J., de Wied, D., and Adan, R.A. (2002). Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* 23, 2283-2306.

Himms-Hagen, J., Cui, J., and Lynn Sigurdson, S. (1990). Sympathetic and sensory nerves in control of growth of brown adipose tissue: Effects of denervation and of capsaicin. *Neurochem Int* 17, 271-279.

Ho, F.M., Liu, S.H., Liao, C.S., Huang, P.J., and Lin-Shiau, S.Y. (2000). High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH(2)-terminal kinase and caspase-3. *Circulation* 101, 2618-2624.

Ho, Y.S., Xiong, Y., Ma, W., Spector, A., and Ho, D.S. (2004). Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J Biol Chem* 279, 32804-32812.

Honen, B.N., Saint, D.A., and Laver, D.R. (2003). Suppression of calcium sparks in rat ventricular myocytes and direct inhibition of sheep cardiac RyR channels by EPA, DHA and oleic acid. *J Membr Biol* 196, 95-103.

Hoppins, S., Lackner, L., and Nunnari, J. (2007). The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76, 751-780.

Horvath, B., Spies, C., Warden, C.H., Diano, S., and Horvath, T.L. (2002). Uncoupling protein 2 in primary pain and temperature afferents of the spinal cord. *Brain Res* 955, 260-263.

Horvath, T.L., Andrews, Z.B., and Diano, S. (2009). Fuel utilization by hypothalamic neurons: roles for ROS. *Trends Endocrinol Metab* 20, 78-87.

Horvath, T.L., Diano, S., and Barnstable, C. (2003a). Mitochondrial uncoupling protein 2 in the central nervous system: neuromodulator and neuroprotector. *Biochem Pharmacol* 65, 1917-1921.

Horvath, T.L., Diano, S., Miyamoto, S., Barry, S., Gatti, S., Alberati, D., Livak, F., Lombardi, A., Moreno, M., Goglia, F., *et al.* (2003b). Uncoupling proteins-2 and 3 influence obesity and inflammation in transgenic mice. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27, 433-442.

Horvath, T.L., Diano, S., Sotonyi, P., Heiman, M., and Tschop, M. (2001). Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance--a hypothalamic perspective. *Endocrinology* 142, 4163-4169.

Huszar, D., Lynch, C.A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Berkemeier, L.R., Gu, W., Kesterson, R.A., Boston, B.A., Cone, R.D., *et al.* (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88, 131-141.

Ibrahim, N., Bosch, M.A., Smart, J.L., Qiu, J., Rubinstein, M., Ronnekleiv, O.K., Low, M.J., and Kelly, M.J. (2003). Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels. *Endocrinology* 144, 1331-1340.

Ishihara, N., Nomura, M., Jofuku, A., Kato, H., Suzuki, S.O., Masuda, K., Otera, H., Nakanishi, Y., Nonaka, I., Goto, Y., *et al.* (2009). Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat Cell Biol* 11, 958-966.

Iynedjian, P.B. (1993). Mammalian glucokinase and its gene. *Biochem J* 293 (Pt 1), 1-13.

James, D.I., Parone, P.A., Mattenberger, Y., and Martinou, J.C. (2003). hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* 278, 36373-36379.

Jansson, L., and Hellerstrom, C. (1986). Glucose-induced changes in pancreatic islet blood flow mediated by central nervous system. *Am J Physiol* 251, E644-647.

Jendrach, M., Mai, S., Pohl, S., Voth, M., and Bereiter-Hahn, J. (2008). Short- and long-term alterations of mitochondrial morphology, dynamics and mtDNA after transient oxidative stress. *Mitochondrion* 8, 293-304.

Jetton, T.L., Liang, Y., Pettepher, C.C., Zimmerman, E.C., Cox, F.G., Horvath, K., Matschinsky, F.M., and Magnuson, M.A. (1994). Analysis of upstream glucokinase promoter activity in transgenic mice and identification of glucokinase in rare neuroendocrine cells in the brain and gut. *J Biol Chem* 269, 3641-3654.

Johnstone, L.E., Fong, T.M., and Leng, G. (2006). Neuronal activation in the hypothalamus and brainstem during feeding in rats. *Cell Metab* 4, 313-321.

Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., and Hardie, D.G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1, 15-25.

Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H., and Wakabayashi, I. (2000). Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression. *Endocrinology* 141, 4797-4800.

Kang, L., Routh, V.H., Kuzhikandathil, E.V., Gaspers, L.D., and Levin, B.E. (2004). Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons. *Diabetes* 53, 549-559.

Karbowski, M., Arnoult, D., Chen, H., Chan, D.C., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2004). Quantitation of mitochondrial dynamics by photolabeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion is blocked during the Bax activation phase of apoptosis. *J Cell Biol* 164, 493-499.

Karnani, M., and Burdakov, D. (2011). Multiple hypothalamic circuits sense and regulate glucose levels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300, R47-55.

Kawano, H., and Masuko, S. (2000). Beta-endorphin-, adrenocorticotrophic hormone- and neuropeptide γ -containing projection fibers from the arcuate hypothalamic nucleus make synaptic contacts on to nucleus preopticus medianus neurons projecting to the paraventricular hypothalamic nucleus in the rat. *Neuroscience* 98, 555-565.

Kelley, D.E., He, J., Menshikova, E.V., and Ritov, V.B. (2002). Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51, 2944-2950.

Kengen, S.W., Tuininga, J.E., de Bok, F.A., Stams, A.J., and de Vos, W.M. (1995). Purification and characterization of a novel ADP-dependent glucokinase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem* 270, 30453-30457.

Kim, H., Jung, Y., Shin, B.S., Song, H., Bae, S.H., Rhee, S.G., and Jeong, W. (2010). Redox regulation of lipopolysaccharide-mediated sulfiredoxin induction, which depends on both AP-1 and Nrf2. *J Biol Chem* 285, 34419-34428.

Kim, J., Solis, R.S., Arias, E.B., and Cartee, G.D. (2004a). Postcontraction insulin sensitivity: relationship with contraction protocol, glycogen concentration, and 5' AMP-activated protein kinase phosphorylation. *J Appl Physiol* 96, 575-583.

Kim, K.W., Zhao, L., and Parker, K.L. (2009). Central nervous system-specific knockout of steroidogenic factor 1. *Mol Cell Endocrinol* 300, 132-136.

Kim, M.S., Park, J.Y., Namkoong, C., Jang, P.G., Ryu, J.W., Song, H.S., Yun, J.Y., Namgoong, I.S., Ha, J., Park, I.S., *et al.* (2004b). Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 10, 727-733.

Kokorovic, A., Cheung, G.W., Rossetti, L., and Lam, T.K. (2008). Hypothalamic sensing of circulating lactate regulates glucose production. *J Cell Mol Med*.

Kokoszka, J.E., Coskun, P., Esposito, L.A., and Wallace, D.C. (2001). Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2278-2283.

Kola, B., Hubina, E., Tucci, S.A., Kirkham, T.C., Garcia, E.A., Mitchell, S.E., Williams, L.M., Hawley, S.A., Hardie, D.G., Grossman, A.B., *et al.* (2005). Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 280, 25196-25201.

Kow, L.M., and Pfaff, D.W. (1991). The effects of the TRH metabolite cyclo(His-Pro) and its analogs on feeding. *Pharmacol Biochem Behav* 38, 359-364.

Koyama, Y., Coker, R.H., Denny, J.C., Lacy, D.B., Jabbour, K., Williams, P.E., and Wasserman, D.H. (2001). Role of carotid bodies in control of the neuroendocrine response to exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281, E742-748.

Koyama, Y., Coker, R.H., Stone, E.E., Lacy, D.B., Jabbour, K., Williams, P.E., and Wasserman, D.H. (2000). Evidence that carotid bodies play an important role in glucoregulation in vivo. *Diabetes* 49, 1434-1442.

Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K.N., Wulff, B.S., Clausen, J.T., Jensen, P.B., Madsen, O.D., Vrang, N., *et al.* (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393, 72-76.

Kublaoui, B.M., Gemelli, T., Tolson, K.P., Wang, Y., and Zinn, A.R. (2008). Oxytocin deficiency mediates hyperphagic obesity of Sim1 haploinsufficient mice. *Mol Endocrinol* 22, 1723-1734.

Kushi, A., Sasai, H., Koizumi, H., Takeda, N., Yokoyama, M., and 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.

Kwong, L.K., and Sohal, R.S. (1998). Substrate and site specificity of hydrogen peroxide generation in mouse mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 350, 118-126.

La Fleur, S.E., Kalsbeek, A., Wortel, J., and Buijs, R.M. (1999). A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. *J Neuroendocrinol* *11*, 643-652.

Lam, T.K., Gutierrez-Juarez, R., Pocai, A., and Rossetti, L. (2005a). Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. *Science* *309*, 943-947.

Lam, T.K., Pocai, A., Gutierrez-Juarez, R., Obici, S., Bryan, J., Aguilar-Bryan, L., Schwartz, G.J., and Rossetti, L. (2005b). Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis. *Nat Med* *11*, 320-327.

Lameloise, N., Muzzin, P., Prentki, M., and Assimakopoulos-Jeannet, F. (2001). Uncoupling protein 2: a possible link between fatty acid excess and impaired glucose-induced insulin secretion? *Diabetes* *50*, 803-809.

Landes, T., Leroy, I., Bertholet, A., Diot, A., Khosrobakhsh, F., Daloyau, M., Davezac, N., Miquel, M.C., Courilleau, D., Guillou, E., *et al.* (2010). OPA1 (dys)functions. *Semin Cell Dev Biol* *21*, 593-598.

Landgraf, R., Malkinson, T., Horn, T., Veale, W.L., Lederis, K., and Pittman, Q.J. (1990). Release of vasopressin and oxytocin by paraventricular stimulation in rats. *Am J Physiol* *258*, R155-159.

Landree, L.E., Hanlon, A.L., Strong, D.W., Rumbaugh, G., Miller, I.M., Thupari, J.N., Connolly, E.C., Haganir, R.L., Richardson, C., Witters, L.A., *et al.* (2004). C75, a fatty acid synthase inhibitor, modulates AMP-activated protein kinase to alter neuronal energy metabolism. *J Biol Chem* *279*, 3817-3827.

Le Magnen, J. (1973). [A development in behavioral neurophysiology: the mechanisms for feeding regulation of the energy profile]. *Arch Ital Biol* *111*, 591-607.

Le Magnen, J., Devos, M., Gaudilliere, J.P., Louis-Sylvestre, J., and Tallon, S. (1973). Role of a lipostatic mechanism in regulation by feeding of energy balance in rats. *J Comp Physiol Psychol* *84*, 1-23.

Leach, J.K., Van Tuyle, G., Lin, P.S., Schmidt-Ullrich, R., and Mikkelsen, R.B. (2001). Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Res* *61*, 3894-3901.

Legradi, G., and Lechan, R.M. (1998). The arcuate nucleus is the major source for neuropeptide Y-innervation of thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* *139*, 3262-3270.

Legradi, G., and Lechan, R.M. (1999). Agouti-related protein containing nerve terminals innervate thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* *140*, 3643-3652.

Legros, F., Lombes, A., Frachon, P., and 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.

Legros, F., Malka, F., Frachon, P., Lombes, A., and Rojo, M. (2004). Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J Cell Sci* *117*, 2653-2662.

Leibowitz, S.F., and Wortley, K.E. (2004). Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides* *25*, 473-504.

Leininger, G.M., Backus, C., Sastry, A.M., Yi, Y.B., Wang, C.W., and Feldman, E.L. (2006). Mitochondria in DRG neurons undergo hyperglycemic mediated injury through Bim, Bax and the fission protein Drp1. *Neurobiol Dis* *23*, 11-22.

Leloup, C., Arluison, M., Lepetit, N., Cartier, N., Marfaing-Jallat, P., Ferre, P., and Penicaud, L. (1994). Glucose transporter 2 (GLUT 2): expression in specific brain nuclei. *Brain Res* *638*, 221-226.

Leloup, C., Casteilla, L., Carriere, A., Galinier, A., Benani, A., Carneiro, L., and Penicaud, L. (2011). Balancing mitochondrial redox signaling: a key point in metabolic regulation. *Antioxid Redox Signal* *14*, 519-530.

Leloup, C., Magnan, C., Benani, A., Bonnet, E., Alquier, T., Offer, G., Carriere, A., Periquet, A., Fernandez, Y., Ktorza, A., *et al.* (2006). Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing. *Diabetes* *55*, 2084-2090.

Leloup, C., Orosco, M., Serradas, P., Nicolaidis, S., and 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.

Leloup, C., Tourrel-Cuzin, C., Magnan, C., Karaca, M., Castel, J., Carneiro, L., Colombani, A.L., Ktorza, A., Casteilla, L., and Penicaud, L. (2009). Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 58, 673-681.

Lemasters, J.J., Nieminen, A.L., Qian, T., Trost, L.C., Elmore, S.P., Nishimura, Y., Crowe, R.A., Cascio, W.E., Bradham, C.A., Brenner, D.A., *et al.* (1998). The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1366, 177-196.

Lenaers, G., Reynier, P., Elachouri, G., Soukkaie, C., Olichon, A., Belenguer, P., Baricault, L., Ducommun, B., Hamel, C., and Delettre, C. (2009). OPA1 functions in mitochondria and dysfunctions in optic nerve. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1866-1874.

Lenaz, G., Baracca, A., Barbero, G., Bergamini, C., Dalmonte, M.E., Del Sole, M., Faccioli, M., Falasca, A., Fato, R., Genova, M.L., *et al.* (2010). Mitochondrial respiratory chain super-complex I-III in physiology and pathology. *Biochim Biophys Acta* 1797, 633-640.

Lenaz, G., and Genova, M.L. (2010). Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. *Antioxid Redox Signal* 12, 961-1008.

Leon-Quinto T, M.C., Portha B. (1998). Altered activity of the autonomous nervous system as a determinant of the impaired beta-cell secretory response after protein-energy restriction in the rat. *Endocrinology* 139, 3382-3389.

Leverve, X.M., and Fontaine, E. (2001). Role of substrates in the regulation of mitochondrial function in situ. *IUBMB Life* 52, 221-229.

Levin, B.E., Routh, V.H., Kang, L., Sanders, N.M., and Dunn-Meynell, A.A. (2004). Neuronal glucosensing: what do we know after 50 years? *Diabetes* 53, 2521-2528.

Li, G., Zhang, Y., Wilsey, J.T., and Scarpace, P.J. (2004a). Unabated anorexic and enhanced thermogenic responses to melanotan II in diet-induced obese rats despite reduced melanocortin 3 and 4 receptor expression. *J Endocrinol* 182, 123-132.

Li, Y., Huang, T.T., Carlson, E.J., Melov, S., Ursell, P.C., Olson, J.L., Noble, L.J., Yoshimura, M.P., Berger, C., Chan, P.H., *et al.* (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 11, 376-381.

Li, Z., Okamoto, K., Hayashi, Y., and Sheng, M. (2004b). The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 119, 873-887.

Liesa, M., Palacin, M., and Zorzano, A. (2009). Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev* 89, 799-845.

Liot, G., Bossy, B., Lubitz, S., Kushnareva, Y., Sejbuk, N., and Bossy-Wetzel, E. (2009). Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. *Cell Death Differ* 16, 899-909.

Liu, M., Seino, S., and Kirchgessner, A.L. (1999). Identification and characterization of glucoresponsive neurons in the enteric nervous system. *J Neurosci* 19, 10305-10317.

Liu, X., Weaver, D., Shiriha, O., and Hajnoczky, G. (2009). Mitochondrial 'kiss-and-run': interplay between mitochondrial motility and fusion-fission dynamics. *EMBO J* 28, 3074-3089.

Liu, Y., Fiskum, G., and Schubert, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 80, 780-787.

Lo, Y.Y., Wong, J.M., and Cruz, T.F. (1996). Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases. *J Biol Chem* 271, 15703-15707.

Loftus, T.M., Jaworsky, D.E., Frehywot, G.L., Townsend, C.A., Ronnett, G.V., Lane, M.D., and Kuhajda, F.P. (2000). Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* 288, 2379-2381.

Loiseau, D., Chevrollier, A., Verny, C., Guillet, V., Gueguen, N., Pou de Crescenzo, M.A., Ferre, M., Malinge, M.C., Guichet, A., Nicolas, G., *et al.* (2007). Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Ann Neurol* 61, 315-323.

Lokrantz, C.M., Uvnas-Moberg, K., and Kaplan, J.M. (1997). Effects of central oxytocin administration on intraoral intake of glucose in deprived and nondeprived rats. *Physiol Behav* 62, 347-352.

Lopez-Barneo, J. (2003). Oxygen and glucose sensing by carotid body glomus cells. *Curr Opin Neurobiol* 13, 493-499.

Lopez-Barneo, J., Lopez-Lopez, J.R., Urena, J., and Gonzalez, C. (1988). Chemotransduction in the carotid body: K⁺ current modulated by PO₂ in type I chemoreceptor cells. *Science* 241, 580-582.

Lu, X.Y., Barsh, G.S., Akil, H., and Watson, S.J. (2003). Interaction between alpha-melanocyte-stimulating hormone and corticotropin-releasing hormone in the regulation of feeding and hypothalamo-pituitary-adrenal responses. *J Neurosci* 23, 7863-7872.

Luckman, S.M., and Lawrence, C.B. (2003). Anorectic brainstem peptides: more pieces to the puzzle. *Trends Endocrinol Metab* 14, 60-65.

Ludwig, D.S., Tritos, N.A., Mastaitis, J.W., Kulkarni, R., Kokkotou, E., Elmquist, J., Lowell, B., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2001). Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 107, 379-386.

Luiten, P.G., ter Horst, G.J., and Steffens, A.B. (1987). The hypothalamus, intrinsic connections and outflow pathways to the endocrine system in relation to the control of feeding and metabolism. *Prog Neurobiol* 28, 1-54.

Lynch, R.M., Tompkins, L.S., Brooks, H.L., Dunn-Meynell, A.A., and Levin, B.E. (2000). Localization of glucokinase gene expression in the rat brain. *Diabetes* 49, 693-700.

Lyons, W.E., Mamounas, L.A., Ricaurte, G.A., Coppola, V., Reid, S.W., Bora, S.H., Wihler, C., Koliatsos, V.E., and Tessarollo, L. (1999). Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15239-15244.

Ma, X., Zubcevic, L., Bruning, J.C., Ashcroft, F.M., and Burdakov, D. (2007). Electrical inhibition of identified anorexigenic POMC neurons by orexin/hypocretin. *J Neurosci* 27, 1529-1533.

MacDonald, P.E., Joseph, J.W., and Rorsman, P. (2005). Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360, 2211-2225.

Maddux, B.A., See, W., Lawrence, J.C., Jr., Goldfine, A.L., Goldfine, I.D., and Evans, J.L. (2001). Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. *Diabetes* 50, 404-410.

Maejima, Y., Sedbazar, U., Suyama, S., Kohno, D., Onaka, T., Takano, E., Yoshida, N., Koike, M., Uchiyama, Y., Fujiwara, K., *et al.* (2009). Nesfatin-1-regulated oxytocinergic signaling in the paraventricular nucleus causes anorexia through a leptin-independent melanocortin pathway. *Cell Metab* 10, 355-365.

Maekawa, F., Toyoda, Y., Torii, N., Miwa, I., Thompson, R.C., Foster, D.L., Tsukahara, S., Tsukamura, H., and Maeda, K. (2000). Localization of glucokinase-like immunoreactivity in the rat lower brain stem: for possible location of brain glucose-sensing mechanisms. *Endocrinology* 141, 375-384.

Majdic, G., Young, M., Gomez-Sanchez, E., Anderson, P., Szczepaniak, L.S., Dobbins, R.L., McGarry, J.D., and Parker, K.L. (2002). Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology* 143, 607-614.

Malka, F., Guillery, O., Cifuentes-Diaz, C., Guillou, E., Belenguer, P., Lombes, A., and Rojo, M. (2005). Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep* 6, 853-859.

Malorni, W., Campesi, I., Straface, E., Vella, S., and Franconi, F. (2007). Redox features of the cell: a gender perspective. *Antioxid Redox Signal* 9, 1779-1801.

Mannella, C.A. (2006). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys Acta* 1763, 542-548.

Marks, J.L., Porte, D., Jr., Stahl, W.L., and Baskin, D.G. (1990). Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* 127, 3234-3236.

Marty, N., Dallaporta, M., Foretz, M., Emery, M., Tarussio, D., Bady, I., Binnert, C., Beermann, F., and Thorens, B. (2005). Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors. *J Clin Invest* 115, 3545-3553.

Maslee, A.A., Gielkens, H.A., Lam, W.F., de Boer, S.Y., and Lamers, C.B. (1996). Effects of parenteral nutrients on gastrointestinal motility and secretion. *Scand J Gastroenterol Suppl* 218, 50-55.

Mates, J.M., and Sanchez-Jimenez, F. (1999). Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci* 4, D339-345.

Matschinsky, F.M. (1996). Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 45, 223-241.

Matsuhisa, M., Morishima, T., Nakahara, I., Tomita, T., Shiba, Y., Kubota, M., Wada, M., Kanda, T., Kawamori, R., and Yamasaki, Y. (1997). Augmentation of hepatic glucose uptake by a positive glucose gradient between hepatportal and central nervous systems. *Diabetes* 46, 1101-1105.

Maurin, A.C., Jousse, C., Averous, J., Parry, L., Bruhat, A., Cherasse, Y., Zeng, H., Zhang, Y., Harding, H.P., Ron, D., *et al.* (2005). The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores. *Cell Metab* 1, 273-277.

Mayer, J. (1953). Glucostatic mechanism of regulation of food intake. *N Engl J Med* 249, 13-16.

McClellan, K.M., Parker, K.L., and Tobet, S. (2006). Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Front Neuroendocrinol* 27, 193-209.

McClung, J.P., Roneker, C.A., Mu, W., Lisk, D.J., Langlais, P., Liu, F., and Lei, X.G. (2004). Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8852-8857.

McCord, J.M., and Fridovich, I. (1969). The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem* 244, 6056-6063.

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

McGowan, M.K., Andrews, K.M., and Grossman, S.P. (1992). Role of intrahypothalamic insulin in circadian patterns of food intake, activity, and body temperature. *Behav Neurosci* 106, 380-385.

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

Meister, B. (2000). Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus. *Vitam Horm* 59, 265-304.

Meister, B., Ceccatelli, S., Hokfelt, T., Anden, N.E., Anden, M., and Theodorsson, E. (1989). Neurotransmitters, neuropeptides and binding sites in the rat mediobasal hypothalamus: effects of monosodium glutamate (MSG) lesions. *Exp Brain Res* 76, 343-368.

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

Migrenne, S., Magnan, C., and Cruciani-Guglielmacci, C. (2007). Fatty acid sensing and nervous control of energy homeostasis. *Diabetes Metab* 33, 177-182.

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

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

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

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

Misko, A., Jiang, S., Wegorzewska, I., Milbrandt, J., and Baloh, R.H. (2010). Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. *J Neurosci* 30, 4232-4240.

Mithieux, G., Andreelli, F., and Magnan, C. (2009). Intestinal gluconeogenesis: key signal of central control of energy and glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 12, 419-423.

Molina, A.J., Wikstrom, J.D., Stiles, L., Las, G., Mohamed, H., Elorza, A., Walzer, G., Twig, G., Katz, S., Corkey, B.E., *et al.* (2009). Mitochondrial networking protects beta-cells from nutrient-induced apoptosis. *Diabetes* 58, 2303-2315.

Moran, T.H., Ladenheim, E.E., and Schwartz, G.J. (2001). Within-meal gut feedback signaling. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 *Suppl* 5, S39-41.

Morel, Y., and Barouki, R. (1999). Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J* 342 *Pt* 3, 481-496.

Morgan, K., Obici, S., and Rossetti, L. (2004). Hypothalamic responses to long-chain fatty acids are nutritionally regulated. *J Biol Chem* 279, 31139-31148.

Moriguchi, T., Sakurai, T., Nambu, T., Yanagisawa, M., and Goto, K. (1999). Neurons containing orexin in the lateral hypothalamic area of the adult rat brain are activated by insulin-induced acute hypoglycemia. *Neurosci Lett* 264, 101-104.

Morrison, C.D., Morton, G.J., Niswender, K.D., Gelling, R.W., and Schwartz, M.W. (2005). Leptin inhibits hypothalamic Npy and Agrp gene expression via a mechanism that requires phosphatidylinositol 3-OH-kinase signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E1051-1057.

Mounien, L., Bizet, P., Boutelet, I., Vaudry, H., and Jegou, S. (2005). Expression of melanocortin MC3 and MC4 receptor mRNAs by neuropeptide Y neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* 82, 164-170.

Mountjoy, K.G., Mortrud, M.T., Low, M.J., Simerly, R.B., and Cone, R.D. (1994). Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol* 8, 1298-1308.

Muroya, S., Funahashi, H., Yamanaka, A., Kohno, D., Uramura, K., Nambu, T., Shibahara, M., Kuramochi, M., Takigawa, M., Yanagisawa, M., *et al.* (2004). Orexins (hypocretins) directly interact with neuropeptide Y, POMC and glucose-responsive neurons to regulate Ca²⁺ signaling in a reciprocal manner to leptin: orexigenic neuronal pathways in the mediobasal hypothalamus. *Eur J Neurosci* 19, 1524-1534.

Nakamura, N., Kimura, Y., Tokuda, M., Honda, S., and Hirose, S. (2006). MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep* 7, 1019-1022.

Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K., and Matsukura, S. (2001). A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409, 194-198.

Nedergaard, J., Golozoubova, V., Matthias, A., Asadi, A., Jacobsson, A., and Cannon, B. (2001). UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim Biophys Acta* 1504, 82-106.

Negre-Salvayre, A., Hirtz, C., Carrera, G., Cazenave, R., Trolly, M., Salvayre, R., Penicaud, L., and Casteilla, L. (1997). A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J* 11, 809-815.

Nemoto, S., Takeda, K., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., and Finkel, T. (2000). Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism. *Mol Cell Biol* 20, 7311-7318.

Netchiporouk, L.I., Shram, N.F., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., and Cespuglio, R. (1996). In vivo brain glucose measurements: differential normal pulse voltammetry with enzyme-modified carbon fiber microelectrodes. *Anal Chem* 68, 4358-4364.

Ngarmukos, C., Baur, E.L., and Kumagai, A.K. (2001). Co-localization of GLUT1 and GLUT4 in the blood-brain barrier of the rat ventromedial hypothalamus. *Brain Res* 900, 1-8.

Nicholls, D.G., and Locke, R.M. (1984). Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* 64, 1-64.

Nicholls, D.G., and Rial, E. (1999). A history of the first uncoupling protein, UCP1. *J Bioenerg Biomembr* 31, 399-406.

Nichols, C.G. (2006). KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* 440, 470-476.

Niiijima, A. (1986). Neural control of blood glucose level. *Jpn J Physiol* 36, 827-841.

Niiijima, A. (1989). Neural mechanisms in the control of blood glucose concentration. *J Nutr* 119, 833-840.

Niijima, A., Kannan, H., and Yamashita, H. (1988). Neural control of blood glucose homeostasis; effect of microinjection of glucose into hypothalamic nuclei on efferent activity of pancreatic branch of vagus nerve in the rat. *Brain Res Bull* 20, 811-815.

Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M.A., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H.P., *et al.* (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404, 787-790.

Niswender, K.D., Morrison, C.D., Clegg, D.J., Olson, R., Baskin, D.G., Myers, M.G., Jr., Seeley, R.J., and Schwartz, M.W. (2003). Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes* 52, 227-231.

Nonogaki, K. (2000). New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia* 43, 533-549.

Norsted, E., Gomuc, B., and Meister, B. (2008). Protein components of the blood-brain barrier (BBB) in the mediobasal hypothalamus. *J Chem Neuroanat* 36, 107-121.

Noske, A.B., Costin, A.J., Morgan, G.P., and Marsh, B.J. (2008). Expedited approaches to whole cell electron tomography and organelle mark-up in situ in high-pressure frozen pancreatic islets. *J Struct Biol* 161, 298-313.

Obici, S., Feng, Z., Arduini, A., Conti, R., and Rossetti, L. (2003). Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. *Nat Med* 9, 756-761.

Obici, S., Feng, Z., Morgan, K., Stein, D., Karkani, G., and Rossetti, L. (2002). Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* 51, 271-275.

Obici, S., Feng, Z., Tan, J., Liu, L., Karkani, G., and Rossetti, L. (2001). Central melanocortin receptors regulate insulin action. *J Clin Invest* 108, 1079-1085.

Oishi, K., Zheng, B., and Kuo, J.F. (1990). Inhibition of Na,K-ATPase and sodium pump by protein kinase C regulators sphingosine, lysophosphatidylcholine, and oleic acid. *J Biol Chem* 265, 70-75.

Okamoto, K., and Shaw, J.M. (2005). Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet* 39, 503-536.

Ollmann, M.M., Wilson, B.D., Yang, Y.K., Kerns, J.A., Chen, Y., Gantz, I., and Barsh, G.S. (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278, 135-138.

Olson, B.R., Drutarosky, M.D., Chow, M.S., Hruby, V.J., Stricker, E.M., and Verbalis, J.G. (1991a). Oxytocin and an oxytocin agonist administered centrally decrease food intake in rats. *Peptides* 12, 113-118.

Olson, B.R., Drutarosky, M.D., Stricker, E.M., and Verbalis, J.G. (1991b). Brain oxytocin receptors mediate corticotropin-releasing hormone-induced anorexia. *Am J Physiol* 260, R448-452.

Olszewski, P.K., Wirth, M.M., Grace, M.K., Levine, A.S., and Giraud, S.Q. (2001). Evidence of interactions between melanocortin and opioid systems in regulation of feeding. *Neuroreport* 12, 1727-1730.

Oomura, Y., Ono, T., Ooyama, H., and Wayner, M.J. (1969). Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. *Nature* 222, 282-284.

Orci, L., Thorens, B., Ravazzola, M., and Lodish, H.F. (1989). Localization of the pancreatic beta cell glucose transporter to specific plasma membrane domains. *Science* 245, 295-297.

Packer, L., Witt, E.H., and Tritschler, H.J. (1995). alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 19, 227-250.

Paltauf-Doburzynska, J., Malli, R., and Graier, W.F. (2004). Hyperglycemic conditions affect shape and Ca²⁺ homeostasis of mitochondria in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 44, 423-436.

Pardal, R., and Lopez-Barneo, J. (2002). Low glucose-sensing cells in the carotid body. *Nat Neurosci* 5, 197-198.

Park, K.S., Wiederkehr, A., Kirkpatrick, C., Mattenberger, Y., Martinou, J.C., Marchetti, P., Demaurex, N., and Wollheim, C.B. (2008). Selective actions of mitochondrial fission/fusion genes on metabolism-secretion coupling in insulin-releasing cells. *J Biol Chem* 283, 33347-33356.

Parker, R.M., and Herzog, H. (1999). Regional distribution of Y-receptor subtype mRNAs in rat brain. *Eur J Neurosci* 11, 1431-1448.

Parone, P.A., Da Cruz, S., Tondera, D., Mattenberger, Y., James, D.I., Maechler, P., Barja, F., and Martinou, J.C. (2008). Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA. *PLoS One* *3*, e3257.

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

Pecqueur, C., Alves-Guerra, C., Ricquier, D., and Bouillaud, F. (2009). UCP2, a metabolic sensor coupling glucose oxidation to mitochondrial metabolism? *IUBMB Life* *61*, 762-767.

Pecqueur, C., Alves-Guerra, M.C., Gelly, C., Levi-Meyrueis, C., Couplan, E., Collins, S., Ricquier, D., Bouillaud, F., and Miroux, B. (2001). Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem* *276*, 8705-8712.

Pellerin, L. (2005). How astrocytes feed hungry neurons. *Mol Neurobiol* *32*, 59-72.

Pellerin, L., Bonvento, G., Chatton, J.Y., Pierre, K., and Magistretti, P.J. (2002). Role of neuron-glia interaction in the regulation of brain glucose utilization. *Diabetes Nutr Metab* *15*, 268-273; discussion 273.

Pellerin, L., and Magistretti, P.J. (2004). Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *Neuroscientist* *10*, 53-62.

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

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

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

Pi, J., Zhang, Q., Fu, J., Woods, C.G., Hou, Y., Corkey, B.E., Collins, S., and Andersen, M.E. (2010). ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function. *Toxicol Appl Pharmacol* *244*, 77-83.

Pich, S., Bach, D., Briones, P., Liesa, M., Camps, M., Testar, X., Palacin, M., and Zorzano, A. (2005). The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Genet* *14*, 1405-1415.

Pierre, K., and Pellerin, L. (2005). Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem* *94*, 1-14.

Pinto, S., Roseberry, A.G., Liu, H., Diano, S., Shanabrough, M., Cai, X., Friedman, J.M., and Horvath, T.L. (2004). Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science* *304*, 110-115.

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

Plecita-Hlavata, L., Lessard, M., Santorova, J., Bewersdorf, J., and Jezek, P. (2008). Mitochondrial oxidative phosphorylation and energetic status are reflected by morphology of mitochondrial network in INS-1E and HEP-G2 cells viewed by 4Pi microscopy. *Biochim Biophys Acta* *1777*, 834-846.

Powley, T.L. (2000a). Vagal circuitry mediating cephalic-phase responses to food. *Appetite* *34*, 184-188.

Powley, T.L. (2000b). Vagal input to the enteric nervous system. *Gut* *47 Suppl 4*, iv30-32; discussion iv36.

Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* *92*, 829-839.

Recio-Pinto, E., and Ishii, D.N. (1988). Insulin and insulinlike growth factor receptors regulating neurite formation in cultured human neuroblastoma cells. *J Neurosci Res* *19*, 312-320.

Rhodes, C.J. (2005). Type 2 diabetes—a matter of beta-cell life and death? *Science* *307*, 380-384.

Richard, D., Clavel, S., Huang, Q., Sanchis, D., and Ricquier, D. (2001). Uncoupling protein 2 in the brain: distribution and function. *Biochem Soc Trans* *29*, 812-817.

Richard, D., Huang, Q., Sanchis, D., and Ricquier, D. (1999). Brain distribution of UCP2 mRNA: in situ hybridization histochemistry studies. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 *Suppl* 6, S53-55.

Riedy, C.A., Chavez, M., Figlewicz, D.P., and Woods, S.C. (1995). Central insulin enhances sensitivity to cholecystokinin. *Physiol Behav* 58, 755-760.

Ritter, S., Dinh, T.T., and Zhang, Y. (2000). Localization of hindbrain glucoreceptive sites controlling food intake and blood glucose. *Brain Res* 856, 37-47.

Robertson, S.A., Leininger, G.M., and Myers, M.G., Jr. (2008). Molecular and neural mediators of leptin action. *Physiol Behav* 94, 637-642.

Rojo, M., Legros, F., Chateau, D., and Lombes, A. (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci* 115, 1663-1674.

Roseberry, A.G., Liu, H., Jackson, A.C., Cai, X., and Friedman, J.M. (2004). Neuropeptide Y-mediated inhibition of proopiomelanocortin neurons in the arcuate nucleus shows enhanced desensitization in ob/ob mice. *Neuron* 41, 711-722.

Russek, M. (1970). Demonstration of the influence of an hepatic glucosensitive mechanism on food-intake. *Physiol Behav* 5, 1207-1209.

Sachi, Y., Hirota, K., Masutani, H., Toda, K., Okamoto, T., Takigawa, M., and Yodoi, J. (1995). Induction of ADF/TRX by oxidative stress in keratinocytes and lymphoid cells. *Immunol Lett* 44, 189-193.

Sakuraba, H., Mizukami, H., Yagihashi, N., Wada, R., Hanyu, C., and Yagihashi, S. (2002). Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia* 45, 85-96.

Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R.M., Tanaka, H., Williams, S.C., Richardson, J.A., Kozlowski, G.P., Wilson, S., *et al.* (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92, 573-585.

Sanchez-Lasheras, C., Konner, A.C., and Bruning, J.C. (2010). Integrative neurobiology of energy homeostasis-neurocircuits, signals and mediators. *Front Neuroendocrinol* 31, 4-15.

Santel, A., and Frank, S. (2008). Shaping mitochondria: The complex posttranslational regulation of the mitochondrial fission protein DRP1. *IUBMB Life* 60, 448-455.

Sauvanet, C., Arnaune-Pelloquin, L., David, C., Belenguer, P., and Rojo, M. (2010a). [Mitochondrial morphology and dynamics: actors, mechanisms and functions]. *Med Sci (Paris)* 26, 823-829.

Sauvanet, C., Duvezin-Caubet, S., di Rago, J.P., and Rojo, M. (2010b). Energetic requirements and bioenergetic modulation of mitochondrial morphology and dynamics. *Semin Cell Dev Biol* 21, 558-565.

Sawchenko, P.E. (1987). Evidence for differential regulation of corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivities in parvocellular neurosecretory and autonomic-related projections of the paraventricular nucleus. *Brain Res* 437, 253-263.

Sawchenko, P.E., and Swanson, L.W. (1982). Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 205, 260-272.

Scarpace, P.J., Matheny, M., Pollock, B.H., and Tumer, N. (1997). Leptin increases uncoupling protein expression and energy expenditure. *Am J Physiol* 273, E226-230.

Schaffhauser, A.O., Stricker-Krongrad, A., Brunner, L., Cumin, F., Gerald, C., Whitebread, S., Criscione, L., and Hofbauer, K.G. (1997). Inhibition of food intake by neuropeptide Y Y5 receptor antisense oligodeoxynucleotides. *Diabetes* 46, 1792-1798.

Scheurink, A.J., Balkan, B., Strubbe, J.H., van Dijk, G., and Steffens, A.B. (1996). Overfeeding, autonomic regulation and metabolic consequences. *Cardiovasc Drugs Ther* 10 *Suppl* 1, 263-273.

Scheurink, A.J., and Nolan, L.J. (1996). Food intake, fuel homeostasis, and the autonomic nervous system. *Appetite* 26, 304.

Schuit, F.C., Huypens, P., Heimberg, H., and Pipeleers, D.G. (2001). Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. *Diabetes* 50, 1-11.

Schwartz, M.W. (2001). Brain pathways controlling food intake and body weight. *Exp Biol Med (Maywood)* 226, 978-981.

Schwartz, M.W., Figlewicz, D.P., Baskin, D.G., Woods, S.C., and Porte, D., Jr. (1992). Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev* 13, 387-414.

Sclafani, A., Berner, C.N., and Maul, G. (1975). Multiple knife cuts between the medial and lateral hypothalamus in the rat: a reevaluation of hypothalamic feeding circuitry. *J Comp Physiol Psychol* 88, 201-207.

Segal-Lieberman, G., Bradley, R.L., Kokkotou, E., Carlson, M., Trombly, D.J., Wang, X., Bates, S., Myers, M.G., Jr., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2003). Melanin-concentrating hormone is a critical mediator of the leptin-deficient phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10085-10090.

Seitz, H.J., Kaiser, M., Krone, W., and Tarnowski, W. (1976). Physiologic significance of glucocorticoids and insulin in the regulation of hepatic gluconeogenesis during starvation in rats. *Metabolism* 25, 1545-1555.

Shapiro, R.E., and Miselis, R.R. (1985a). The central neural connections of the area postrema of the rat. *J Comp Neurol* 234, 344-364.

Shapiro, R.E., and Miselis, R.R. (1985b). The central organization of the vagus nerve innervating the stomach of the rat. *J Comp Neurol* 238, 473-488.

Shi, H., Noguchi, N., and Niki, E. (1999). Comparative study on dynamics of antioxidative action of alpha-tocopheryl hydroquinone, ubiquinol, and alpha-tocopherol against lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 27, 334-346.

Shin, A.C., Zheng, H., and Berthoud, H.R. (2009). An expanded view of energy homeostasis: neural integration of metabolic, cognitive, and emotional drives to eat. *Physiol Behav* 97, 572-580.

Shull, S., Heintz, N.H., Periasamy, M., Manohar, M., Janssen, Y.M., Marsh, J.P., and Mossman, B.T. (1991). Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J Biol Chem* 266, 24398-24403.

Silver, I.A., and Erecinska, M. (1998). Glucose-induced intracellular ion changes in sugar-sensitive hypothalamic neurons. *J Neurophysiol* 79, 1733-1745.

Sindelar, D.K., Ste Marie, L., Miura, G.I., Palmiter, R.D., McMinn, J.E., Morton, G.J., and Schwartz, M.W. (2004). Neuropeptide Y is required for hyperphagic feeding in response to neuroglucopenia. *Endocrinology* 145, 3363-3368.

Skulachev, V.P. (1998). Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1363, 100-124.

Slater, T.F. (1982). Lipid peroxidation. *Biochem Soc Trans* 10, 70-71.

Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.L., and van der Blik, A.M. (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 12, 2245-2256.

Smith, M.A., Hisadome, K., Al-Qassab, H., Heffron, H., Withers, D.J., and Ashford, M.L. (2007). Melanocortins and agouti-related protein modulate the excitability of two arcuate nucleus neuron populations by alteration of resting potassium conductances. *J Physiol* 578, 425-438.

Song, Z., Levin, B.E., McArdle, J.J., Bakhos, N., and Routh, V.H. (2001). Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes* 50, 2673-2681.

Spanwick, D., Smith, M.A., Groppi, V.E., Logan, S.D., and Ashford, M.L. (1997). Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Nature* 390, 521-525.

Spanwick, D., Smith, M.A., Mirshamsi, S., Routh, V.H., and Ashford, M.L. (2000). Insulin activates ATP-sensitive K⁺ channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. *Nat Neurosci* 3, 757-758.

Stanley, B.G., Kyrkouli, S.E., Lampert, S., and Leibowitz, S.F. (1986). Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 7, 1189-1192.

Sternson, S.M., Shepherd, G.M., and Friedman, J.M. (2005). Topographic mapping of VMH --> arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nat Neurosci* 8, 1356-1363.

Stowers, R.S., Megeath, L.J., Gorska-Andrzejak, J., Meinertzhagen, I.A., and Schwarz, T.L. (2002). Axonal transport of mitochondria to synapses depends on Milton, a novel Drosophila protein. *Neuron* 36, 1063-1077.

Suzuki, M., Jeong, S.Y., Karbowski, M., Youle, R.J., and Tjandra, N. (2003). The solution structure of human mitochondria fission protein Fis1 reveals a novel TPR-like helix bundle. *J Mol Biol* 334, 445-458.

Taguchi, N., Ishihara, N., Jofuku, A., Oka, T., and Mihara, K. (2007). Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem* 282, 11521-11529.

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

Tewari, K.P., Malinowska, D.H., Sherry, A.M., and Cuppoletti, J. (2000). PKA and arachidonic acid activation of human recombinant ClC-2 chloride channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 279, C40-50.

Tondera, D., Grandemange, S., Jourdain, A., Karbowski, M., Mattenberger, Y., Herzig, S., Da Cruz, S., Clerc, P., Raschke, I., Merkwirth, C., *et al.* (2009). SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J* 28, 1589-1600.

Trayhurn, P., and Mercer, S.W. (1986). Brown adipose tissue thermogenesis in obese animals. *Biochem Soc Trans* 14, 236-239.

Tschritter, O., Stumvoll, M., Machicao, F., Holzwarth, M., Weisser, M., Maerker, E., Teigeler, A., Haring, H., and Fritsche, A. (2002). The prevalent Glu23Lys polymorphism in the potassium inward rectifier 6.2 (KIR6.2) gene is associated with impaired glucagon suppression in response to hyperglycemia. *Diabetes* 51, 2854-2860.

Tsujii, S., and Bray, G.A. (1990). Effects of glucose, 2-deoxyglucose, phlorizin, and insulin on food intake of lean and fatty rats. *Am J Physiol* 258, E476-481.

Tung, Y.C., Ayuso, E., Shan, X., Bosch, F., O'Rahilly, S., Coll, A.P., and Yeo, G.S. (2010). Hypothalamic-specific manipulation of Fto, the ortholog of the human obesity gene FTO, affects food intake in rats. *PLoS One* 5, e8771.

Turrens, J.F. (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 17, 3-8.

Turrens, J.F., Alexandre, A., and Lehninger, A.L. (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 237, 408-414.

Turrens, J.F., and Boveris, A. (1980). Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 191, 421-427.

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

Twig, G., Hyde, B., and Shirihai, O.S. (2008b). Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta* 1777, 1092-1097.

Unger, T.J., Calderon, G.A., Bradley, L.C., Sena-Esteves, M., and Rios, M. (2007). Selective deletion of Bdnf in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus of adult mice results in hyperphagic behavior and obesity. *J Neurosci* 27, 14265-14274.

Uo, T., Dworzak, J., Kinoshita, C., Inman, D.M., Kinoshita, Y., Horner, P.J., and Morrison, R.S. (2009). Drp1 levels constitutively regulate mitochondrial dynamics and cell survival in cortical neurons. *Exp Neurol* 218, 274-285.

Vaisse, C., Clement, K., Guy-Grand, B., and Froguel, P. (1998). A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet* 20, 113-114.

Vallat, J.M., and Funalot, B. (2010). [Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease: an update]. *Med Sci (Paris)* 26, 842-847.

Vallat, J.M., Ouvrier, R.A., Pollard, J.D., Magdelaine, C., Zhu, D., Nicholson, G.A., Grew, S., Ryan, M.M., and Funalot, B. (2008). Histopathological findings in hereditary motor and sensory neuropathy of axonal type with onset in early childhood associated with mitofusin 2 mutations. *J Neuropathol Exp Neurol* 67, 1097-1102.

van den Top, M., Lee, K., Whyment, A.D., Blanks, A.M., and Spanswick, D. (2004). Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nat Neurosci* 7, 493-494.

van Itallie, T.B. (1990). The glucostatic theory 1953-1988: roots and branches. *Int J Obes* 14 Suppl 3, 1-10.

Van Obberghen, E., Baron, V., Delahaye, L., Emanuelli, B., Filippa, N., Giorgetti-Peraldi, S., Lebrun, P., Mothe-Satney, I., Peraldi, P., Rocchi, S., *et al.* (2001). Surfing the insulin signaling web. *Eur J Clin Invest* 31, 966-977.

Vanhorebeek, I., De Vos, R., Mesotten, D., Wouters, P.J., De Wolf-Peeters, C., and Van den Berghe, G. (2005). Protection of hepatocyte mitochondrial ultrastructure and function by strict blood glucose control with insulin in critically ill patients. *Lancet* 365, 53-59.

Wakabayashi, J., Zhang, Z., Wakabayashi, N., Tamura, Y., Fukaya, M., Kensler, T.W., Iijima, M., and Sesaki, H. (2009). The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. *J Cell Biol* 186, 805-816.

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

Wan, S., Browning, K.N., Coleman, F.H., Sutton, G., Zheng, H., Butler, A., Berthoud, H.R., and Travagli, R.A. (2008). Presynaptic melanocortin-4 receptors on vagal afferent fibers modulate the excitability of rat nucleus tractus solitarius neurons. *J Neurosci* 28, 4957-4966.

Wang, C., Bomberg, E., Levine, A., Billington, C., and Kotz, C.M. (2007). Brain-derived neurotrophic factor in the ventromedial nucleus of the hypothalamus reduces energy intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293, R1037-1045.

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

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

Wang, X., and Schwarz, T.L. (2009). The mechanism of Ca²⁺-dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility. *Cell* 136, 163-174.

Wasiak, S., Zunino, R., and McBride, H.M. (2007). Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J Cell Biol* 177, 439-450.

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

Weigle, D.S., Bukowski, T.R., Foster, D.C., Holderman, S., Kramer, J.M., Lasser, G., Lofton-Day, C.E., Prunkard, D.E., Raymond, C., and Kuijper, J.L. (1995). Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse. *J Clin Invest* 96, 2065-2070.

Westermann, B. (2002). Merging mitochondria matters: cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion. *EMBO Rep* 3, 527-531.

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

Williams, D.L., Kaplan, J.M., and Grill, H.J. (2000). The role of the dorsal vagal complex and the vagus nerve in feeding effects of melanocortin-3/4 receptor stimulation. *Endocrinology* 141, 1332-1337.

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

Williams, G., Cai, X.J., Elliott, J.C., and Harrold, J.A. (2004). Anabolic neuropeptides. *Physiol Behav* 81, 211-222.

Witt, M.R., and Nielsen, M. (1994). Characterization of the influence of unsaturated free fatty acids on brain GABA/benzodiazepine receptor binding in vitro. *J Neurochem* 62, 1432-1439.

Wollheim, C.B., and Maechler, P. (2002). Beta-cell mitochondria and insulin secretion: messenger role of nucleotides and metabolites. *Diabetes* 51 Suppl 1, S37-42.

Woods, S.C., Chavez, M., Park, C.R., Riedy, C., Kaiyala, K., Richardson, R.D., Figlewicz, D.P., Schwartz, M.W., Porte, D., Jr., and Seeley, R.J. (1996). The evaluation of insulin as a metabolic signal influencing behavior via the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 20, 139-144.

Woods, S.C., and Porte, D., Jr. (1974). Neural control of the endocrine pancreas. *Physiol Rev* 54, 596-619.

Woods, S.C., Seeley, R.J., Porte, D., Jr., and Schwartz, M.W. (1998). Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 280, 1378-1383.

Wullschlegel, S., Loewith, R., and Hall, M.N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471-484.

Xu, B., Goulding, E.H., Zang, K., Cepoi, D., Cone, R.D., Jones, K.R., Tecott, L.H., and Reichardt, L.F. (2003). Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci* 6, 736-742.

Yamagishi SI, E.D., Du XL, Brownlee M (2001). Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes* 50, 1491-1494.

Yamashita, T., Murakami, T., Otani, S., Kuwajima, M., and Shima, K. (1998). Leptin receptor signal transduction: OBRa and OBRb of fa type. *Biochem Biophys Res Commun* 246, 752-759.

Yang, X.J., Kow, L.M., Funabashi, T., and Mobbs, C.V. (1999). Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms. *Diabetes* 48, 1763-1772.

Yeo, G.S., Connie Hung, C.C., Rochford, J., Keogh, J., Gray, J., Sivaramakrishnan, S., O'Rahilly, S., and Farooqi, I.S. (2004). A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. *Nat Neurosci* 7, 1187-1189.

Yeo, G.S., Farooqi, I.S., Aminian, S., Halsall, D.J., Stanhope, R.G., and O'Rahilly, S. (1998). A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet* 20, 111-112.

Yonashiro, R., Ishido, S., Kyo, S., Fukuda, T., Goto, E., Matsuki, Y., Ohmura-Hoshino, M., Sada, K., Hotta, H., Yamamura, H., *et al.* (2006). A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics. *EMBO J* 25, 3618-3626.

Yoon, K.H., Ko, S.H., Cho, J.H., Lee, J.M., Ahn, Y.B., Song, K.H., Yoo, S.J., Kang, M.I., Cha, B.Y., Lee, K.W., *et al.* (2003). Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2300-2308.

Yoon, Y., Galloway, C.A., Jhun, B.S., and Yu, T. (2011). Mitochondrial dynamics in diabetes. *Antioxid Redox Signal* 14, 439-457.

Yoshihara, F., Kojima, M., Hosoda, H., Nakazato, M., and Kangawa, K. (2002). Ghrelin: a novel peptide for growth hormone release and feeding regulation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5, 391-395.

Yu, T., Robotham, J.L., and Yoon, Y. (2006). Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2653-2658.

Yu, T., Sheu, S.S., Robotham, J.L., and Yoon, Y. (2008). Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res* 79, 341-351.

Zanna, C., Ghelli, A., Porcelli, A.M., Karbowski, M., Youle, R.J., Schimpf, S., Wissinger, B., Pinti, M., Cossarizza, A., Vidoni, S., *et al.* (2008). OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion. *Brain* 131, 352-367.

Zarjevski, N., Cusin, I., Vettor, R., Rohner-Jeanrenaud, F., and Jeanrenaud, B. (1993). Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology* 133, 1753-1758.

Zhang, R., Dhillon, H., Yin, H., Yoshimura, A., Lowell, B.B., Maratos-Flier, E., and Flier, J.S. (2008). Selective inactivation of Socs3 in SF1 neurons improves glucose homeostasis without affecting body weight. *Endocrinology* 149, 5654-5661.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.

Zhao, W.Q., Chen, H., Quon, M.J., and Alkon, D.L. (2004). Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *Eur J Pharmacol* 490, 71-81.

Zheng, H., Patterson, L.M., Morrison, C., Banfield, B.W., Randall, J.A., Browning, K.N., Travagli, R.A., and Berthoud, H.R. (2005a). Melanin concentrating hormone innervation of caudal brainstem areas involved in gastrointestinal functions and energy balance. *Neuroscience* 135, 611-625.

Zheng, H.F., Li, X.L., Jin, Z.Y., Sun, J.B., Li, Z.L., and Xu, W.X. (2005b). Effects of unsaturated fatty acids on calcium-activated potassium current in gastric myocytes of guinea pigs. *World J Gastroenterol* 11, 672-675.

Zheng, M., Aslund, F., and Storz, G. (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* 279, 1718-1721.

Zick, M., Duvezin-Caubet, S., Schafer, A., Vogel, F., Neupert, W., and Reichert, A.S. (2009). Distinct roles of the two isoforms of the dynamin-like GTPase Mgm1 in mitochondrial fusion. *FEBS Lett* 583, 2237-2243.

Ziegler, D.R., Cullinan, W.E., and Herman, J.P. (2002). Distribution of vesicular glutamate transporter mRNA in rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 448, 217-229.

Zorov, D.B., Filburn, C.R., Klotz, L.O., Zweier, J.L., and Sollott, S.J. (2000). Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J Exp Med* 192, 1001-1014.

Zorzano, A., Liesa, M., and Palacin, M. (2009). Mitochondrial dynamics as a bridge between mitochondrial dysfunction and insulin resistance. *Arch Physiol Biochem* 115, 1-12.

Zuchner, S., Mersiyanova, I.V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., *et al.* (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 36, 449-451.

Zunino, R., Schauss, A., Rippstein, P., Andrade-Navarro, M., and McBride, H.M. (2007). The SUMO protease SENP5 is required to maintain mitochondrial morphology and function. *J Cell Sci* 120, 1178-1188.