

Université de Montréal

Métabolisme astrocytaire des acides gras et gliotransmission dans l'hypothalamus : deux fonctions de l'Acyl-CoA Binding Protein impliquées dans le contrôle de l'homéostasie énergétique.

Par

Khalil Bouyakdan

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Docteur en Biochimie et médecine moléculaire

Janvier 2017

© Khalil Bouyakdan, 2017

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Métabolisme astrocytaire des acides gras et gliotransmission dans l'hypothalamus : deux fonctions de l'Acyl-CoA Binding Protein impliquées dans le contrôle de l'homéostasie énergétique.

Présentée par :
Khalil Bouyakdan

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Thierry Alquier, Directeur de recherche
Dr. Vincent Poitout, Co-directeur
Dr. Nathalie Grandvaux, Président-rapporteur
Dr. Graziella Di Cristo, Membre du jury
Dr. David St-Pierre, Examineur externe
Dr. John Francis Kalaska, Représentant de la doyenne de la FES

Résumé

L'obésité est le désordre métabolique le plus courant en Amérique du Nord et constitue un facteur de risque majeur dans le développement de plusieurs pathologies, incluant les maladies cardiovasculaires et le diabète de type 2. L'obésité est causée principalement par un apport nutritionnel surpassant les dépenses énergétiques. L'organisme doit être en mesure d'évaluer adéquatement son état nutritionnel pour moduler la balance énergétique et maintenir un poids corporel sain. Cette détection se fait principalement dans l'hypothalamus médiobasal (MBH), une région du cerveau essentielle au maintien de l'homéostasie glucidique et de la balance énergétique. Plus précisément, le noyau arqué de l'hypothalamus peut détecter plusieurs signaux métaboliques circulants comme le glucose et les acides gras, et hormonaux, comme l'insuline et la leptine. Ces signaux modulent l'activité de deux populations neuronales distinctes, les neurones orexigènes NPY et anorexigènes POMC, pour contrôler la prise alimentaire, les dépenses énergétiques, ainsi que l'homéostasie du glucose. Les types cellulaires et les mécanismes impliqués dans la détection des acides gras et leurs effets sur la prise alimentaire et l'homéostasie énergétique ne sont pas bien connus. Il est donc primordial de comprendre les mécanismes par lesquels notre organisme évalue son état nutritionnel et par le fait même, intervient pour maintenir une balance énergétique stable.

Le but du premier volet de ma thèse a été de caractériser le métabolisme central des acides gras. Nous cherchons ainsi à déterminer quel type cellulaire est impliqué dans le métabolisme des acides gras et à évaluer l'impact du glucose sur ce dernier. Nos données suggèrent que les astrocytes sont les cellules cérébrales ayant la plus grande capacité à utiliser et à métaboliser les acides gras. Nous montrons aussi que le couplage métabolique entre le glucose et les acides gras implique l'activation de l'AMP-activated kinase (AMPK). De plus, ce couplage est spécifique aux régions hypothalamiques puisque le métabolisme des acides gras est régulé par le glucose dans les astrocytes et les explants de l'hypothalamus, mais pas du cortex. Finalement, nous montrons que cette interaction métabolique dépend du type d'acide gras puisque l'oxydation et l'estérification du palmitate, mais pas de l'oléate, sont couplées au glucose. Nos résultats démontrent pour la première fois l'existence d'un couplage entre le métabolisme du glucose et des acides gras dans le cerveau. De plus, ce couplage est spécifique à l'hypothalamus, région impliquée dans la détection des nutriments et du contrôle de la balance énergétique, ainsi qu'au type d'acide gras.

Étant donné l'importance des astrocytes dans le métabolisme central des acides gras, le deuxième volet de ma thèse vise à caractériser le métabolisme intracellulaire des acides gras dans les astrocytes. Pour ce faire, nous nous sommes focalisés sur Acyl-CoA Binding Protein (ACBP), une protéine presque exclusivement exprimée dans les astrocytes dans le cerveau et impliquée dans le métabolisme des acides gras en périphérie. Nous voulions donc déterminer si le métabolisme des acides gras astrocytaire était régulé par ACBP ainsi que s'il existe un mécanisme de régulation différentiel des acides gras saturés et insaturés. Nous montrons que la déficience en ACBP réduit l'oxydation ainsi que l'estérification des acides gras insaturés, mais pas des acides gras saturés, dans les astrocytes et les explants hypothalamiques.

Finalement, le troisième volet de ma thèse vise à déterminer l'implication d'ACBP dans le contrôle *in vivo* de la prise alimentaire ainsi que d'identifier les mécanismes par lesquels ACBP et son produit de clivage octadecaneuropeptide (ODN) agissent pour moduler la balance énergétique. Nos résultats montrent que la perte de fonction d'ACBP spécifiquement dans les astrocytes augmente la susceptibilité à l'obésité induite par une diète riche en gras. De plus, nos résultats suggèrent que l'action anorexigène d'ODN serait dépendante de l'activation directe des neurones anorexigènes POMC du noyau arqué via un récepteur couplé aux protéines G.

L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de cette thèse supporte le rôle prépondérant des astrocytes dans le métabolisme oxydatif des acides gras dans l'hypothalamus ainsi que leur capacité à détecter les divers nutriments tels le glucose et les acides gras. De plus, nos travaux mettent en lumière un nouveau mécanisme de contrôle de la prise alimentaire et du métabolisme énergétique via l'activation directe des neurones POMC par une protéine impliquée dans le métabolisme intracellulaire des acides gras insaturés dans les astrocytes. Ceci suggère que l'action anorexigène des acides gras insaturés soit médiée par leur liaison et/ou leur métabolisme intracellulaire via ACBP. Finalement, nos résultats ouvrent la porte à l'identification d'une cible potentielle pour le traitement des désordres alimentaires menant au développement de plusieurs pathologies telles l'obésité et le diabète de type 2.

Mots clés : ACBP, acides gras, astrocytes, dépenses énergétiques, endozélines, gliotransmission, hypothalamus, obésité, ODN, POMC, prise alimentaire

Abstract

Obesity is the most prevalent metabolic disorder in North America and is a major risk factor for the development of various pathologies including type 2 diabetes. Obesity is caused by nutritional intake overtaking energy expenditure. Thus, the body needs to be able to accurately assess its nutritional status and modulate the energy balance accordingly to maintain a healthy body weight. This role can be ascribed to the mediobasal hypothalamus (MBH), a brain region known for its implication in the maintenance of glucose homeostasis and energy balance. Specifically, the arcuate nucleus is able to detect both metabolic and hormonal signals from the periphery, such as glucose, fatty acids, insulin and leptin. These signals act on the activity of two distinct neuronal populations, orexigenic NPY neurons and anorectic POMC neurons, to control food intake, energy expenditure and glucose homeostasis. The mechanisms and cell type involved in hypothalamic fatty acid sensing and subsequent effects on food intake and energy homeostasis remain to be elucidated. It is thus crucial to understand the mechanisms by which our body assesses its nutritional status and acts to maintain a stable energy balance.

The first aim of my thesis was to characterize central fatty acid metabolism. We aim to identify which cell type in the brain is involved in their metabolism. We also aim to evaluate if and how fatty acid metabolism is modulated by glucose. Our data suggest that, in the brain, astrocyte have the highest capacity to use and oxidize fatty acids. We also show a coupling between glucose and fatty acid metabolism that relies on the AMP-activated kinase (AMPK) and is specific to the hypothalamus. Indeed, fatty acid oxidation was regulated by glucose in astrocytes and brain slices from the hypothalamus, but not from the cortex. Finally, we show that palmitate, but not oleate, oxidation and esterification are coupled to glucose. Our findings reveal a metabolic coupling of glucose and fatty acid metabolism in the brain specific to hypothalamic areas as well as to fatty acid type.

The second aim of my thesis was to characterize astrocyte fatty acid metabolism. We thus focused on Acyl-CoA Binding Protein (ACBP), a protein involved in fatty acid metabolism in peripheral tissue that, in the brain, is almost exclusively found in astrocytes. We looked to determine whether astrocyte fatty acid metabolism is regulated by ACBP and if saturated and unsaturated fatty acids metabolism is differentially regulated. We show that ACBP can regulate unsaturated, but not saturated, fatty acid oxidation and esterification in both astrocytes and hypothalamic slices.

Finally, the third aim of my thesis was the *in vivo* regulation of food intake by ACBP as well as the identification of a potential mechanism by which ACBP and its cleaved peptide octadecaneuropeptide (ODN) modulate energy balance. Our data show that an astrocyte specific ACBP loss of function increases susceptibility to high fat diet induced obesity. Our data also suggest that the anorectic action of ODN (cleaved from ACBP) involves a direct activation of POMC neurons in the arcuate nucleus via a G protein coupled receptor.

Taken together, our findings support the essential role of astrocytes in hypothalamic fatty acid metabolism and their ability to detect various circulating nutrients such as glucose and fatty acids. Our data sheds light on a potentially new mechanism of modulation of food intake and energy expenditure via a direct activation of POMC neurons by ACBP. Thus, the anorectic action of unsaturated fatty acid could require their binding and/or intracellular metabolism by ACBP. These new data could lead to the identification of a clinically relevant target for the treatment of various feeding disorders that could lead to pathologies like obesity and type 2 diabetes.

Key words: ACBP, astrocytes, endozepines, energy expenditure, fatty acids, food intake, gliotransmission, hypothalamus, obesity, ODN, POMC

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des figures	xi
Liste des tableaux	xii
Liste des abréviations	xiii
Remerciements.....	xvii
Avant-propos	xviii
Revue bibliographique	1
I Hypothalamus et homéostasie énergétique	2
I.1 Régulation hypothalamique de la balance énergétique.....	3
I.2 Noyau Arqué	4
I.2.1 Neurones POMC/CART	5
I.2.1.1 Pro-opiomélanocortine.....	5
I.2.1.2 CART.....	6
I.2.2 Neurones NPY/AgRP	7
I.2.2.1 Neuropeptide Y.....	7
I.2.2.2 Agouti-Related Peptide.....	9
II Contribution des cellules gliales	10
II.1 Diversité des cellules gliales.....	11
II.1.1 Cellules microgliales.....	11
II.1.2 Oligodendrocytes.....	12
II.1.3 Astrocytes	13
II.1.3.1 Structure et organisation.....	14
II.2.1 Glucose	18
II.2.2 Acides gras et corps cétoniques	21
II.2.3 Métabolisme énergétique	24
III Rôle des astrocytes dans le cerveau	27

III.1 Navettes Astrocyte-Neurone	27
III.1.1 Lactate.....	27
III.1.2 Corps cétoniques	29
III.2 Synapse tripartite.....	30
III.2.1 Recapture du glutamate	33
III.3 Gliotransmission	34
III.3.1 Acides aminés	37
III.3.1.1 Glutamate	37
III.3.1.2 D-sérine.....	38
III.3.2 GABA	39
III.3.2.1 Les récepteurs GABA.....	40
III.3.3 ATP/Adénosine	42
III.3.4 Peptides	42
III.3.5 Cytokines.....	44
III.4 Rôle des astrocytes dans le comportement	45
III.4.1 Sommeil et la mémoire.....	45
III.4.2 Contrôle de la prise alimentaire	46
IV Détection astrocytaire des nutriments.....	47
IV.1 Glucose	48
IV.2 Acides gras.....	50
IV.3 Action centrale des acides gras	52
IV.3.1 Contrôle de la prise alimentaire et homéostasie énergétique.....	54
V Acyl-CoA Binding Protein (Diazepam Binding Inhibitor).....	60
V.1 Identification.....	60
V.1.1 La controverse	61
V.2 ACBP en périphérie.....	62
V.2.1 Maintient des réserves intracellulaires d'Acyl-CoA.....	63
V.2.2 Oxydation des acides gras	64
V.2.3 Estérification des acides gras.....	65
V.2.4 Effets transcriptionnels.....	66
V.3 ACBP dans le système nerveux central.....	67

V.3.1 Clivage et sécrétion	67
V.3.1.1 Octadecaneuropeptide (ODN).....	68
V.3.1.2 Triakontatétraneuropeptide (TTN).....	69
V.3.1.3 Sécrétion.....	70
V.3.2 Action sur le récepteur GABA _A	72
V.3.2.1 Modulation allostérique du récepteur GABA _A par ACBP.....	73
V.3.3 Récepteur métabotropique	75
V.3.4 Synthèse des neurostéroïdes	76
V.3.5 Prolifération et neuroprotection	77
V.3.6 Comportements liés à l'anxiété.....	79
V.3.7 Prise alimentaire.....	80
Objectifs.....	84
Résultats	88
Glucose regulates hypothalamic long-chain fatty acid metabolism via AMP-activated Kinase (AMPK) in neurons and astrocytes.	89
A novel role for central ACBP/DBI as a regulator of long-chain fatty acid metabolism in astrocytes	127
ACBP/DBI regulates hypothalamic melanocortin pathway to modulate feeding and energy homeostasis.....	160
Discussion	191
Étude 1.....	194
Couplage du métabolisme du glucose et des acides gras	196
Régulation différentielle du métabolisme des acides gras saturés et insaturés	199
Métabolisme des acides gras dans le cerveau.....	200
L'implication du couplage métabolique dans la détection des acides gras	201
Étude 2.....	203
Rôle d'ACBP dans le métabolisme central des acides gras.....	206
Régulation différentielle du métabolisme des acides gras saturés et insaturés par ACBP	208
Implication du double rôle d'ACBP	211
Étude 3.....	214
Implication d'ACBP dans le métabolisme énergétique chez la souris.....	216
Action via la voie des mélanocortines	218

Modulation de l'activité des neurones de l'ARC par les astrocytes	221
Conclusion et perspectives	224
Conclusion.....	225
Perspectives.....	229
Annexes.....	232
Annexe 1 : Données supplémentaires à l'étude 3	xix
Annexe 2 : Régulation de la prise alimentaire et la balance énergétique par ATGL	xxvii
Annexe 3 : Collaboration à d'autres projets de recherche.....	xxxi
Bibliographie.....	xxxv

Liste des figures

Figure 1 : Interactions entre les neurones impliqués dans la régulation de la balance énergétique.	8
Figure 2 : Diversité des astrocytes et des cellules épendymocytaires.	14
Figure 3 : Organisation et distribution des astrocytes dans le cerveau.	16
Figure 4 : Modes de transport à travers la barrière hémato encéphalique.	17
Figure 5 : Couplage métabolique et modèle de la navette astrocyte-neurone du lactate.	28
Figure 6 : Propagation de l'activation d'astrocytes par le Ca^{++}	32
Figure 7 : Différents modes de modulation de l'activité synaptique par les astrocytes.	36
Figure 8 : Schéma représentant l'assemblage le plus commun du récepteur $GABA_A$	41
Figure 9 : Effet des acides gras à longue chaîne dans l'hypothalamus médiobasal.	59
Figure 10 : Représentation schématique des différents produits de clivage d'ACBP.	68
Figure 11 : Représentation du mode d'action de différentes substances sur un récepteur.....	74
Figure 12 : Modèle décrivant la prolifération cellulaire induite par l'endozépine ODN.	78
Figure 13 : Différents rôles connus d'ACBP dans le CNS et les tissus périphériques.	82
Figure 14 : Modèle proposé d'une régulation du métabolisme énergétique par ACBP.	228

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification de divers types d'acides gras libres.....	53
--	----

Liste des abréviations

ACBP :	Acyl-CoA Binding Protein
ACC :	Acetyl-CoA carboxylase
ACS :	Acetyl-CoA synthetase
AICAR :	5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide
AgRP :	Agouti-Related Peptide
AMPA :	α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate
AMPK :	AMP-activated kinase
ANP :	Atrial natriuretic peptide
ANLS :	Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle
AP :	Action Potentials
ARC :	Arcuate Nucleus
ATP :	Adenosine triphosphate
ATGL :	Adipose triglyceride lipase
BBB :	Blood-Brain Barrier
BDNF :	Brain Derived Neurotropic Factor
BHB :	β -Hydroxybutyrate
cAMP :	cyclic Adenosine monophosphate
CART :	Cocaine and Amphetamine-Regulated Transcript
CBR :	Central Benzodiazepine Receptor
CNS :	Central Nervous System
CSF :	Cerebro-spinal fluid
CPT :	Carnitine palmitoyltransferase
CXN :	Connexin

DBI :	Diazepam Binding Inhibitor
DHA :	Docosahexanoic Acid
DMH :	Dorsomedial Hypothalamus
EAAT :	Excitatory Amino Acid Transporter
EPA :	Eicosapentænoic Acid
EPSC :	Excitatory Postsynaptic Current
ER :	Endoplasmic Reticulum
FABP :	Fatty Acid Binding Protein
FATP :	Fatty Acid Transport Protein
FAS :	Fatty acid synthase
GABA :	γ -aminobutyrique Acid
GFAP :	Glial Fibrillary Acidic Protein
GIIS :	Glucose Induced Insulin Secretion
GLAST :	Glutamate Aspartate Transporter
GLT :	Glutamate Transporter
GLUT :	Glucose transporter
GPCR :	G Protein-Coupled Receptor
HGP :	Hepatic Glucose Production
HNF-4 α :	Hepatocyte nuclear factor-4 α
ICV :	Intracerebroventricular
sIPSC :	Spontaneous Inhibitory postsynaptic current
IP ₃ :	Inositol triphosphate
K _{ATP} :	ATP-sensitive potassium channel
LCFA :	Long-Chain Fatty Acid
LDH :	Lactate dehydrogenase

LTP :	Long Term Potentiation
MBH :	Mediobasal Hypothalamus
MCR :	Melanocortin Receptor
MCFA :	Medium-Chain Fatty Acid
MCT :	Monocarboxylate Transporter
mGluR :	Metabotropic Glutamate Receptor
MSH :	Melanocyte-Stimulating Hormone
NAM :	Negative Allosteric Modulator
NEFA :	Non-Esterified Fatty Acid
NMDA :	N-methyl-D-aspartate
NPY :	Neuropeptide Y
OP :	Octapeptide
ODN :	Octadecaneuropeptide
OPC :	Oligodendrocytes Precursor Cells
PAM :	Positive Allosteric Modulator
PBR :	Peripheral Benzodiazepine Receptor
PEDF :	Pigment epithelium derived factor
PLC :	Phospholipase C
PIP ₂ :	Phosphatidylinositol biphosphate
POMC :	Pro-opiomelanocortine
PMA :	phorbol miristic acetate
PUFA :	Polyunsaturated Fatty Acid
PVN :	Paraventricular Nucleus
SIC :	Slow inward current
siRNA :	Small interference Ribonucleic acid

SOC :	Slow outward current
SVZ :	Subventricular Zone
TAG :	Triacylglycerol
TCA :	Tricarboxylic Acid
TNF :	Tumor Necrosis Factor
TSPO :	Translocator protein
TTN :	Triakontatetraneuropeptide
VLDL :	Very low density lipoprotein
VMH :	Ventromedial Hypothalamus

Remerciements

Le travail réalisé dans le cadre de cette thèse n'est pas l'œuvre d'une seule personne et a été rendu possible par toutes les personnes qui m'ont supporté et encouragé. C'est pour cette raison que j'aimerais commencer cet ouvrage en remerciant toutes ces personnes. J'aimerais remercier avant tout mon directeur de thèse, sans qui je n'aurais pu être où je suis.

Thierry, merci de m'avoir donné l'opportunité de me joindre à ton labo et de m'avoir encouragé et d'avoir cru en moi, même quand je ne croyais pas en moi-même. Merci surtout pour ta patience, ton professionnalisme et ta passion pour la science. J'ai beaucoup appris lors de mon passage dans ton labo et je sais que cette expérience va me suivre tout au long de ma carrière.

J'aimerais aussi remercier mes collègues de laboratoire, actuels, et ceux qui sont déjà partis, Bouchra, Cécile, Demetra, Alexandre, Léa et plus récemment Jérôme. Vous avez chacun apporté une touche unique à mon passage dans le labo. Les membres des labos du 8^e étage, qui sont trop nombreux pour être nommés individuellement, vous avez tous contribué à votre manière à rendre la vie étudiante et scientifique au CRCHUM beaucoup plus intéressant.

Surtout, j'aimerais remercier tous les membres de ma famille, qui s'est récemment élargie. Vous avez été pour moins une source de soutien et de support tout au long de ma thèse, merci pour votre patience durant ma rédaction et pour tous les sacrifices que vous avez faits pour que je puisse me rendre où je suis.

Avant-propos

Le taux d'obésité est en croissance dans le monde et surtout en Amérique du Nord. Ce problème de santé publique n'est plus restreint aux pays les plus développés, mais touche maintenant les pays en développement. L'organisme mondial de la santé (OMS) définit le surpoids lorsque l'indice de masse corporelle ou IMC est supérieur ou égal à 25 kg/m² et l'obésité lorsque l'IMC atteint 30 kg/m² (Ogunbode et al. 2011). Le pourcentage d'adulte en surpoids est passé de 58 % à 77 % aux États-Unis de 2000 à 2009 et de 46 % à près de 60 % au Canada durant la même période selon l'OMS. L'obésité entraîne plusieurs autres comorbidités tels les maladies cardiovasculaires, le diabète de type 2, l'hypertension, la dépression et plusieurs autres. Les problèmes associés à l'obésité et au surpoids sont nombreux et ont un énorme coût sur la société. Le Canadian Obesity Network estime les coûts liés à l'obésité et au surpoids en 2010 à 4.1 % du budget canadien pour la santé, soit environ 6 milliards de dollars.

Bien qu'il existe plusieurs causes génétiques de l'obésité, elles ne composent qu'une très petite partie du problème d'obésité mondial. Le surpoids est essentiellement une dérégulation de la balance énergétique durant laquelle les apports en énergie surpassent les dépenses. La régulation de cette balance énergétique est au cœur du problème. Cette problématique est surtaxée par la consommation de nourriture riche en gras et en sucre qui peut entraîner une dérégulation de cette balance et créer un cercle vicieux menant à une consommation toujours plus élevée de nourriture riche en gras et en sucre. Ainsi les travaux présentés dans cet ouvrage ont été effectués dans l'optique de mieux comprendre comment les divers nutriments comme le glucose et les acides gras sont détectés au niveau du cerveau pour moduler en retour la balance énergétique.

Une meilleure compréhension de ces mécanismes de régulation de la prise alimentaire et des dépenses énergétiques et des différents acteurs de ce contrôle permettra d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de l'obésité et de ses comorbidités.

Revue bibliographique

I Hypothalamus et homéostasie énergétique

Pour pouvoir survivre dans un environnement dans lequel les conditions (température, disponibilité de la nourriture, etc.) sont en constante fluctuation, l'organisme doit être capable de réguler et moduler différents paramètres et réponses physiologiques. Ce contrôle a été décrit pour la première fois par le physiologiste français Claude Bernard en 1865 comme la capacité d'un organisme à maintenir à des niveaux optimaux l'ensemble des conditions physiologiques, ce qu'il décrit comme le milieu intérieur, malgré les variations de l'environnement externe (température, disponibilité de la nourriture, etc.). Ce concept de milieu intérieur a été repris par le physiologiste américain Walter Bradford Cannon en 1932 qui décrit l'homéostasie comme la coordination de l'ensemble des processus physiologiques requis au maintien de l'état stationnaire, ou « steady-state » de l'organisme. Pour maintenir l'homéostasie, l'organisme doit être en mesure de réguler plusieurs paramètres dont la température corporelle, la pression artérielle, la glycémie, ses réserves énergétiques et plusieurs autres.

Le maintien de cette homéostasie repose sur la capacité de l'organisme à détecter les moindres variations des paramètres du milieu intérieur et de pouvoir activer des réponses physiologiques nécessaires pour les maintenir à des niveaux optimaux. Il est donc nécessaire d'avoir un système centralisé capable de détecter les changements ainsi que de coordonner les différentes réponses physiologiques de l'organisme. Au sein du système nerveux central, ou « Central Nervous System » (CNS), l'hypothalamus est une structure capable d'assumer ce rôle puisque ce dernier reçoit une variété de signaux, incluant des signaux hormonaux et nutritionnels, en provenance de différents organes et peut les intégrer pour engendrer une réponse concertée appropriée. Ainsi l'hypothalamus est impliqué, entre autres, dans le maintien de la pression artérielle, la température corporelle, le rythme circadien, l'adaptation au stress, la balance énergétique et plusieurs autres fonctions vitales (Routh et al. 2014, Chen et al. 2015).

I.1 Régulation hypothalamique de la balance énergétique

L'homéostasie énergétique est un des paramètres régulés en grande partie par l'hypothalamus. Pour maintenir un poids corporel sain et stable, les neurones hypothalamiques doivent être en mesure d'équilibrer les apports énergétiques avec les dépenses tout en tenant compte des réserves énergétiques disponibles à l'organisme. Les apports énergétiques proviennent principalement de la consommation de nourriture, mais peuvent aussi inclure certains processus d'autophagie, notamment les épithéliums du système digestif qui sont en constant renouvellement. Les dépenses énergétiques proviennent de l'activité locomotrice, du métabolisme basal (l'énergie requise pour le maintien des fonctions vitales à thermoneutralité telles la respiration, la circulation sanguine, etc.), la digestion ainsi que les processus de thermogénèse. Cette régulation requiert une forme de communication bidirectionnelle entre la périphérie et le CNS ainsi qu'entre les régions intra et extra hypothalamiques. L'hypothalamus reçoit donc des signaux en provenance de la périphérie lui permettant de déterminer le statut nutritionnel de l'organisme, ceci se fait via la détection de différents signaux nutritionnels et hormonaux. D'une part, différents nutriments circulants, comme le glucose et les acides gras, sont détectés dans l'hypothalamus pour signaler l'état nutritionnel de l'organisme et moduler la prise alimentaire (Blouet and Schwartz 2010). D'autre part, des signaux hormonaux, comme l'insuline et la leptine, sont détectés dans l'hypothalamus où elles ont des effets similaires pour inhiber la prise alimentaire. Ces hormones sont sécrétées de façon proportionnelle à la masse adipeuse et leur concentration reflète les niveaux des réserves énergétiques de l'organisme (Niswender and Schwartz 2003, Ahima and Antwi 2008). Ces différents signaux agissent de façon concertée pour permettre la régulation à court terme (via la détection des nutriments) et à long terme (contrôle hormonal) de la prise alimentaire (Blouet and Schwartz 2010).

L'hypothalamus est divisé en plusieurs régions anatomiquement distinctes composées de différents types de neurones. Le « Mediobasal Hypothalamus » (MBH) est considéré comme le centre de la satiété puisque des lésions dans cette région chez le rongeur ont des effets sur les comportements alimentaires et sur la prise de poids. Le MBH est à son tour divisé en plusieurs noyaux distincts soit le « Arcuate Nucleus » (ARC), le « Ventromedial hypothalamus » (VMH) et « Dorsomedial Hypothalamus » (DMH) (Kalra et al. 1999, Luquet and Magnan 2009). Ces différents noyaux sont composés de populations distinctes de neurones et assument chacun des rôles spécifiques. Les

noyaux du MBH sont généralement associés à la détection de nutriments, comme le glucose et les acides gras, et d'hormones, comme l'insuline et la leptine. D'autres noyaux hypothalamiques comme le « Paraventricular Nucleus » (PVN) reçoivent des afférences en provenance de l'ARC et envoi des projections vers des régions distales du cerveau dans le tronc cérébral comme le noyau moteur dorsal et le noyau du tractus solitaire (Kalra et al. 1999, Luquet and Magnan 2009).

I.2 Noyau Arqué

Dans l'hypothalamus, l'ARC est idéalement situé pour la détection des variations dans les taux de signaux circulants comme les différents nutriments et hormones. L'ARC est situé à la base du MBH au niveau du troisième ventricule près de l'éminence médiane, une région du cerveau où la barrière hémato encéphalique ou « Blood-Brain Barrier » (BBB) est fenêtrée et est relativement perméable aux signaux périphériques. Ces signaux sont ensuite relayés vers les autres noyaux de l'hypothalamus qui sont ainsi capables d'intégrer ces signaux pour réguler la prise alimentaire ainsi que les dépenses énergétiques (Sandoval et al. 2009). Ce noyau est composé principalement de deux populations neuronales régulées de façon différentielle par les signaux nutritionnels, les neurones orexigènes co-exprimant les neuropeptides agouti-related peptide (AgRP) et le neuropeptide Y (NPY), ainsi que les neurones anorexigènes exprimant les peptides pro-opiomelanocortine (POMC) et « cocaine and amphetamine-regulated transcript » (CART). Ces différentes populations neuronales forment des projections, entre autres, vers les neurones du PVN exprimant le « Melanocortine Receptor » (MCR) (Belgardt et al. 2009). Ce système hypothalamique de détection et régulation de la prise alimentaire et des dépenses énergétiques est connu sous le nom de la voie hypothalamique de la mélanocortine.

I.2.1 Neurones POMC/CART

I.2.1.1 Pro-opiomélanocortine

Les neurones anorexigènes de l'ARC sont caractérisés par l'expression des neuropeptides POMC et CART. POMC est un propeptide qui est clivé pour générer plusieurs hormones peptidiques incluant les différentes « Melanocyte-Stimulating Hormone » (MSH), la β -endorphine et l'hormone adénocorticotrope pour ne nommer que celle-ci (Millington 2007). Le type de peptide produit et sécrété par les cellules POMC est déterminé par les différentes protéases exprimées dans ce tissu. Certaines hormones peuvent aussi être sécrétées en tant que pro-hormone et être clivées à leur site d'action par d'autres protéases qui ne sont pas exprimées dans les cellules sécrétant cette pro-hormone (Bicknell 2008). Les neurones exprimant POMC sont principalement situés dans l'ARC de l'hypothalamus, mais ils sont aussi présents dans d'autres régions cérébrales tels l'hippocampe et le cortex (Bicknell 2008). Plusieurs études montrent que le glucose et les acides gras insaturés (oléate) peuvent activer les neurones POMC. Ces derniers notent une augmentation de la fréquence des « Action Potentials » (AP), par des enregistrements électrophysiologiques, suite à l'addition de glucose (Parton et al. 2007) ou d'oléate (Jo et al. 2009). De plus, l'expression du neuropeptide anorexigène POMC est régulée par le statut nutritionnel, elle est diminuée par le jeûne et augmentée par la prise alimentaire, ainsi que des signaux hormonaux comme la leptine (Mizuno et al. 1998, Hagan et al. 1999).

Dans l'ARC, POMC produit principalement l' α -MSH via son clivage par la prohormone convertase 1 pour produire l'hormone adénocorticotrope qui est à son tour clivée par la prohormone convertase 2 (Bicknell 2008). L'action d' α -MSH sur la prise alimentaire requiert l'activation du récepteur MCR dans les neurones du PVN (Figure 1). Les deux principaux MCR exprimés dans le cerveau sont les MC3 et 4R. MC4R est le récepteur le plus fortement exprimé et son expression est répandue à plusieurs régions du cerveau tels le cortex, l'hippocampe, l'amygdale, le tronc cérébral et l'hypothalamus, plus particulièrement le PVN, DMH et l'ARC (Kishi et al. 2003). L'expression de MC3R est plus restreinte et est trouvée dans l'aire tegmentale ventrale, l'hippocampe et bien sûr l'hypothalamus (Roselli-Reh fuss et al. 1993). Des études d'inactivation de ces deux récepteurs suggèrent que MC4R a un rôle plus important dans la régulation de la prise alimentaire due à un phénotype plus sévère, chez le KO MC4R

que les KO MC3R (Parker and Bloom 2012). L'obésité associée à l'augmentation de la prise alimentaire et la réduction des dépenses énergétiques des souris MC4R KO est très similaire à ce qui est observé dans un modèle d'inactivation du gène codant pour POMC (Gropp et al. 2005). Le rôle des neurones du PVN dans la suppression de la prise alimentaire par la voie hypothalamique de la mélanocortine est aussi mis en évidence par la réactivation sélective du récepteur MC4R (Balthasar et al. 2005). En effet, la restauration de ce récepteur dans les neurones du PVN est suffisante pour prévenir les augmentations de la prise alimentaire et de la prise de poids observées lors d'une inactivation de MC4R. Par contre l'augmentation des dépenses énergétiques n'a pas été corrigée, indiquant que différentes populations neuronales, intra ou extra hypothalamiques, peuvent être responsables des différents effets médiés par les neurones POMC. En plus de moduler la prise alimentaire, il est aussi suggéré que ces neurones peuvent être capables de diminuer préférentiellement la consommation de diète riche en gras (Boghossian et al. 2010). De plus, ces souris déficientes en POMC vont préférentiellement consommer de la diète riche en gras (Tung et al. 2007, Garfield et al. 2009) si elles ont accès à des diètes riches en gras en plus de leur diète régulière. L'importance de la voie de la mélanocortine dans la régulation de la prise alimentaire ainsi que dans le développement de l'obésité et du diabète de type 2 est mise en évidence par le fait que des mutations dans les gènes codant pour POMC et MC4R sont les formes les plus fréquentes de l'obésité monogénique observée chez l'humain (Vaisse et al. 1998, Yeo et al. 1998, Coll et al. 2004).

I.2.1.2 CART

Dans l'ARC, le peptide CART est exprimé dans les mêmes neurones POMC, il est aussi exprimé dans le PVN, co-exprimé avec l'ocytocine et la vasopressine, et l'aire latérale de l'hypothalamus (Vrang et al. 1999). Tout comme l' α -MSH, le peptide CART a une action anorexigène, s'il est administré dans le cerveau par injection intracérébroventriculaire (ICV) (Lambert et al. 1998). Les mécanismes par lesquels CART inhibe la prise alimentaire ne sont pas aussi bien définis que pour l' α -MSH. Aucun récepteur du peptide CART n'a été identifié jusqu'à présent et son effet inhibiteur sur la prise alimentaire ne nécessite pas l'activation de la voie de la mélanocortine (Edwards et al. 2000). D'autres données suggèrent une régulation de l'expression de CART par les niveaux circulants de leptine ainsi qu'une diminution de son expression chez les souris *db/db* déficientes pour le récepteur de la leptine (Xu et al. 2014).

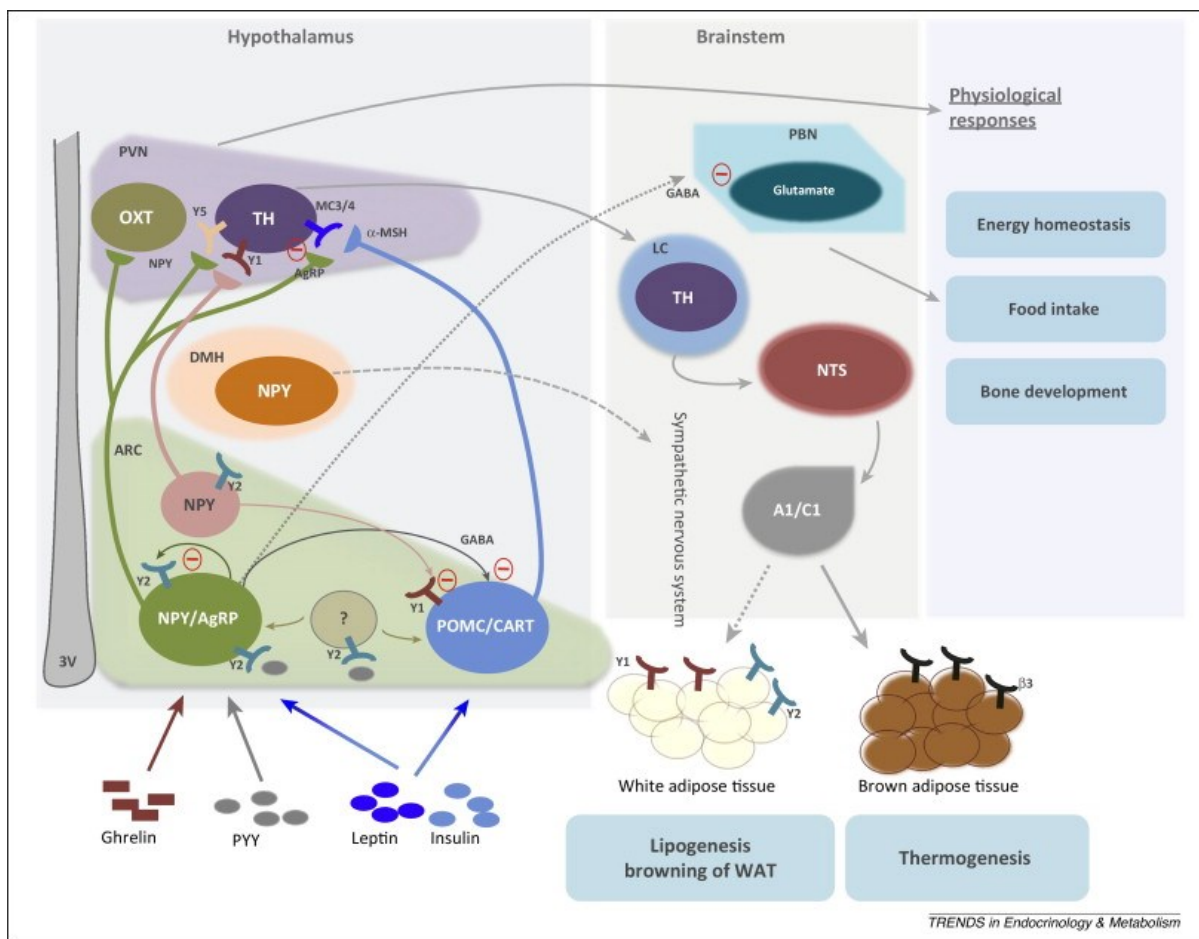
I.2.2 Neurones NPY/AgRP

I.2.2.1 Neuropeptide Y

Les neurones orexigènes de l'ARC produisent et sécrètent le peptide NPY. La majorité de ces neurones expriment aussi un autre neuropeptide orexigène, le peptide AgRP. NPY est un neuropeptide de 36 acides aminés et a la capacité de moduler la prise alimentaire ainsi que les dépenses énergétiques, faisant de lui un des plus importants neuropeptides orexigènes du CNS. Ce dernier est le membre principal de la famille des peptides NPY. Cette famille inclut le Peptide YY, le Polypeptide pancréatique et bien sûr NPY (Acuna-Goycolea et al. 2005). Bien que NPY soit exprimé dans plusieurs régions du cerveau, comme le cortex et le tronc cérébral, les niveaux d'expression les plus élevés sont retrouvés dans l'ARC (Acuna-Goycolea et al. 2005). L'effet orexigène de NPY a été suggéré il y a déjà plus d'une trentaine d'années chez le rongeur chez qui l'administration ICV ou intra hypothalamique de ce neuropeptide entraîne une augmentation de la prise alimentaire et une prise de poids (Clark et al. 1984, Stanley and Leibowitz 1985). Plus récemment, il a été démontré qu'une administration chronique par ICV de ce neuropeptide conduit au développement de l'obésité chez les rongeurs (Zarjevski et al. 1993).

Les neurones NPY sont activés en conditions de déficits énergétiques et agissent sur des neurones de second ordre, tels les neurones du VMH, du DMH et de l'aire latérale de l'hypothalamus, mais principalement les neurones du PVN. Les neurones NPY peuvent être activés par la ghréline, un peptide orexigène sécrété par le système gastro-intestinal. Inversement, ces neurones sont inhibés par l'insuline et la leptine, qui ont pour effet de réduire la prise alimentaire (Loh et al. 2015). NPY agit principalement via des récepteurs de type G Protein-Coupled Receptor (GPCR), les récepteurs Y, qui sont exprimés sur plusieurs types de neurones au niveau du PVN, sur les neurones POMC de l'ARC et même sur les neurones NPY dans l'ARC. Les récepteurs Y sont généralement associés à la protéine G_i , leur conférant un profil inhibiteur (Kassis et al. 1987). Les neurones NPY projettent vers les neurones de seconds ordres du PVN et, suite à leur activation, agissent sur ces derniers pour augmenter la prise alimentaire et diminuer les dépenses énergétiques. Le groupe de Sternson et al. a montré récemment que les neurones NPY sont capables d'inhiber les neurones à ocytocine du PVN pour augmenter la prise alimentaire (Atasoy et al. 2012). Les neurones NPY peuvent aussi inhiber directement les

neurones POMC via leurs récepteurs Y ou via la relâche d'un neurotransmetteur inhibiteur, le γ -aminobutyrique acid (GABA) (Acuna-Goycolea et al. 2005). Ces neurones peuvent aussi augmenter la prise alimentaire en inhibant les récepteurs MC3/4R dans le PVN en aval des neurones POMC. L'interaction entre ces différents neurones est résumée dans la Figure 1.



Reproduit avec la permission de Loh et al. 2015

Figure 1 : Interactions entre les neurones impliqués dans la régulation de la balance énergétique.

Les neurones NPY et POMC de l'ARC reçoivent des signaux orexigènes et anorexigènes en provenance de la circulation sanguine. Les neurones NPY agissent sur les neurones de second ordre du PVN via leur récepteur Y ainsi que via la relâche de GABA pour réguler une variété de fonctions physiologiques incluant la prise alimentaire et la thermogénèse. Les neurones NPY inhibent les neurones POMC de l'ARC via le récepteur Y et la relâche de GABA. Les neurones POMC agissent sur les neurones

exprimant le récepteur MC3 et 4R dans le PVN pour moduler la prise alimentaire et les dépenses énergétiques. Les neurones de l'ARC ainsi que les neurones de second ordre du PVN peuvent agir sur plusieurs noyaux du tronc cérébral pour réguler les différentes fonctions biologiques. Abréviations : (3 V) troisième ventricule, (GABA) Acide γ -aminobutyrique, (TH) tyrosine hydroxylase, (NTS) noyau du tractus solitaire, (LC) locus coeruleus, (PBN) noyau parabrachial, (WAT) tissu adipeux blanc.

I.2.2.2 Agouti-Related Peptide

AgRP est un neuropeptide composé de 132 acides aminés exprimé exclusivement dans l'ARC, plus précisément dans les neurones exprimant NPY. En effet, ces deux neuropeptides orexigènes sont co-exprimés dans plus de 95 % des neurones NPY (Broberger et al. 1998). Les propriétés orexigènes d'AgRP ont été démontrées premièrement par administration ICV chez le rongeur (Rossi et al. 1998). Plus récemment, il a été montré que l'activation de quelques neurones AgRP dans l'ARC entraîne une hyperphagie sévère (Aponte et al. 2011). Le mécanisme prépondérant par lequel AgRP augmente la prise alimentaire est par antagonisme de la voie hypothalamique de la mélanocortine, tel que décrit dans la Figure 1. AgRP est en effet un antagoniste endogène des récepteurs MC3 et 4R (Ollmann et al. 1997). L'invalidation des peptides NPY et AgRP ne semble pas produire de phénotype sur la prise alimentaire (Parker and Bloom 2012), possiblement dû à un mécanisme compensatoire durant le développement. D'autres études montrent que l'ablation des neurones NPY/AgRP uniquement chez l'adulte produit une diminution sévère de la prise alimentaire (Luquet et al. 2005). Il a été suggéré que la perte du signal inhibiteur GABAergique serait la cause principale de ce phénotype chez ces souris, plutôt que l'absence de ces neuropeptides. Effectivement, une activation pharmacologique du récepteur GABA_A directement au site d'action des neurones NPY/AgRP restaure l'appétit et une prise alimentaire normale (Wu et al. 2009). Par contre, d'autres études ont montré que l'activation spécifique des neurones AgRP dans l'ARC, par optogénétique, était suffisante pour engendrer une réponse orexigène, indépendamment de la voie de la mélanocortine (Aponte et al. 2011). De plus, l'inhibition des neurones POMC par AgRP n'est pas nécessaire à l'initiation de la prise alimentaire. En effet, l'augmentation rapide de la prise alimentaire par l'activation spécifique des neurones AgRP n'est pas prévenue par l'activation simultanée des neurones anorexigènes POMC (Atasoy et al. 2012).

Le MBH, et plus précisément l'ARC, comprend plusieurs populations neuronales formant un réseau interconnecté capable de réguler la prise alimentaire ainsi que les dépenses énergétiques (Parker and Bloom 2012). Ces différentes populations neuronales sont sensibles aux variations des nutriments et hormones circulants et peuvent être régulées par l'état nutritionnel (Mizuno et al. 1998, Loh et al. 2015). Ainsi, cette région cérébrale peut détecter et est capable d'initier les réponses appropriées pour le maintien de l'homéostasie énergétique. Le cerveau est composé d'une grande hétérogénéité de types cellulaires, ayant des rôles différents et complémentaires. La contribution spécifique de ces différents types cellulaires dans la détection des nutriments ainsi que dans le contrôle de la balance énergétique n'est pas entièrement élucidée. En effet, de plus en plus de données suggèrent une action concertée des cellules gliales et des neurones dans plusieurs processus centraux, particulièrement dans la détection des nutriments et du maintien de la balance énergétique en réponse à cette détection.

II Contribution des cellules gliales

Le cerveau est composé d'une grande variété de types cellulaires, dont les deux principales sont les neurones, responsables des influx nerveux, et les cellules gliales. Ces dernières ont longtemps été considérées comme un simple support physique pour les neurones, d'où leur nom qui dérive du mot grec pour colle ou « glu » (Ndubaku and de Bellard 2008, Dale Purves 2011). Il est maintenant bien établi que les cellules gliales ont plusieurs rôles essentiels au fonctionnement des neurones et du CNS. Les cellules gliales, particulièrement les astrocytes, sont impliquées dans la formation des synapses, fournissent les substrats énergétiques nécessaires à la neurotransmission et sont également capables d'une communication bidirectionnelle avec les neurones pour moduler la transmission synaptique (Wang and Bordey 2008, Allen and Barres 2009). Les cellules gliales sont couramment décrites comme les cellules les plus abondantes du CNS, le pourcentage de cellules gliales est estimé à environ 90% des cellules cérébrales chez l'humain (Nedergaard et al. 2003, Nishiyama et al. 2005). Cependant, de nouvelles techniques de comptage suggèrent que ce ratio puisse avoir été surestimé et se situerait plutôt autour de 50 % dans le cerveau adulte chez l'humain. Ce ratio glie-neurones varie à travers les différentes régions du CNS, certains ont mesurés un

pourcentage de cellules gliales à 19 % des cellules du cervelet, 58 % du cortex et 92 % du reste du cerveau chez l'humain (Azevedo et al. 2009, Herculano-Houzel 2014).

II.1 Diversité des cellules gliales

Tout comme les neurones, les cellules gliales sont loin d'être une population homogène. La glie est composée d'une variété de types cellulaires qui peuvent être classifiés en trois catégories selon leurs fonctions et morphologie. Ainsi on retrouve les cellules microgliales, les oligodendrocytes et les astrocytes. Respectivement, ces trois types cellulaires représentent environ 6 %, 76 % et 17 % des cellules gliales du cerveau humain adulte (Pelvig et al. 2008).

II.1.1 Cellules microgliales

La microglie est la seule population de cellules gliales du CNS ayant une origine périphérique. Ces cellules proviennent de précurseurs érythromyéloïdes de la vésicule vitelline et migrent vers le cerveau en développement au jour embryonnaire 8 avant l'établissement de la BBB (Kierdorf et al. 2013, Casano and Peri 2015). En effet, ayant une origine similaire aux macrophages, les cellules microgliales sont les macrophages résidents du tissu cérébral et protègent les neurones contre les pathogènes potentiels. Ces cellules sont sensibles aux insultes tissulaires et favorisent la survie neuronale en éliminant les débris cellulaires et en stimulant la réparation neuronale par la sécrétion de plusieurs facteurs neurotrophiques tels Insulin like growth factor 1, l'interleukine 1 β et interféron γ (Abi-Saab et al. 2002). Les cellules microgliales peuvent projeter leurs prolongements cellulaires sur de longues distances dans le but de détecter ou de réagir aux dommages tissulaires (Hines et al. 2009). En plus de leur rôle immunitaire, ces cellules sont impliquées dans le développement embryonnaire du cerveau en stimulant la neurogénèse, en phagocytant les neurones apoptotiques, en raffinant les connexions synaptiques et en stimulant l'angiogenèse (Casano and Peri 2015).

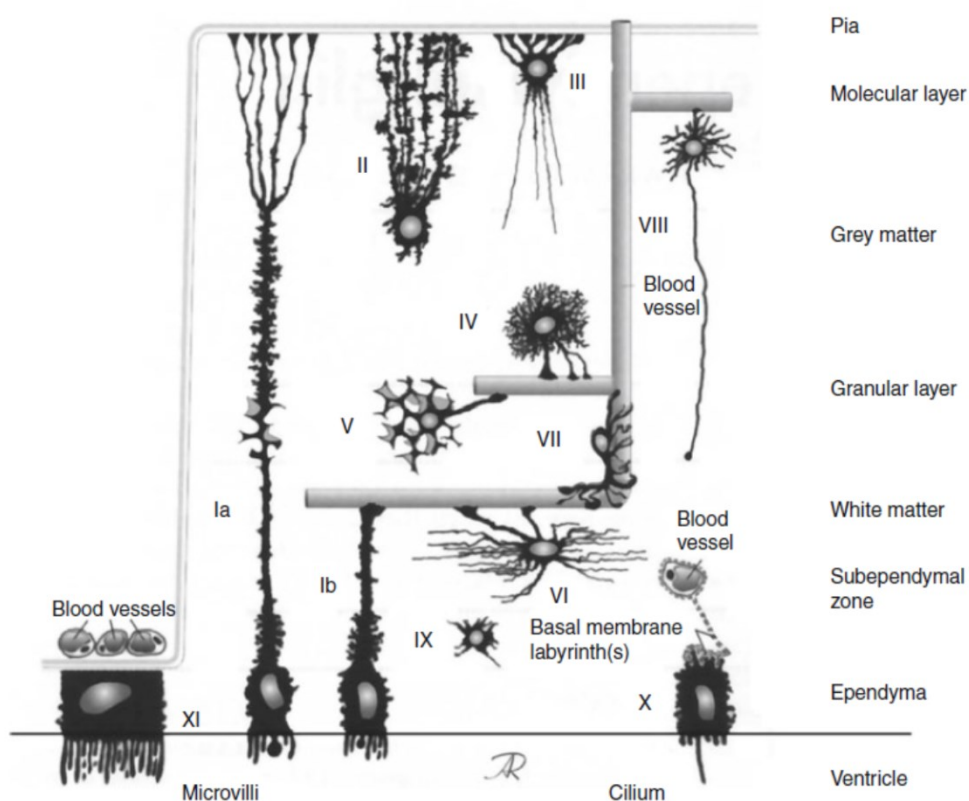
II.1.2 Oligodendrocytes

Les oligodendrocytes forment la population de cellules gliales la plus abondante représentant environ 75 % de la glie chez l'humain adulte (Pelvig et al. 2008). Les « Oligodendrocytes Precursor Cells » (OPC), sont considérées par certains comme le quatrième type de cellules gliales exprimant le protéoglycan NG2, qu'ils ont nommé cellules gliales NG2 ou glie NG2 (Nishiyama et al. 1999). L'abondance et la distribution quasi uniforme des cellules NG2 dans le cerveau adulte suggèrent que ces cellules sont plus que de simples précurseurs d'oligodendrocytes (Richardson et al. 2011). En effet, certains ont suggéré que les OPC seraient plutôt des cellules souches adultes (Crawford et al. 2014).

La fonction principale des oligodendrocytes est d'assurer la myélinisation des axones pour accélérer la vitesse de propagation des potentiels d'action (PA). Les oligodendrocytes enroulent leurs membranes lipidiques autour des axones pour former la gaine de myéline tout en laissant des « espaces » non myélinisés nommés nœuds de Ranvier. Comparativement aux autres membranes lipidiques chez les eucaryotes, la gaine de myéline est extrêmement riche en lipides, pouvant atteindre 70-75 % de sa masse sèche (Jahn et al. 2009). Cette gaine isole l'axone du milieu extérieur et empêche la propagation de l'influx nerveux à travers les régions isolées. Les AP sont alors forcés de « sauter » d'un nœud de Ranvier à l'autre, accélérant ainsi la vitesse de l'influx nerveux. Ce dernier peut passer d'environ 0.5-10 m/s dans un axone non myélinisé à environ 150 m/s dans un axone myélinisé (Dale Purves 2011). Dans le CNS, chaque oligodendrocyte est en contact avec une cinquantaine d'axones différents. En comparaison, une cellule de Schwann, l'équivalent des oligodendrocytes dans le système nerveux périphérique, ne peut encapsuler qu'un seul axone (Hildebrand et al. 1993, Jahn et al. 2009). Dans le CNS, tous les neurones ne sont pas forcément myélinisés, les oligodendrocytes ciblent les neurones ayant un diamètre axonal supérieur à 200 nm (Bradl and Lassmann 2010). La myélinisation des axones semble aussi être dépendante de leur activité électrique, par exemple, les neurones du nerf optique sont myélinisés uniquement à la suite d'un stimulus visuel (Gyllensten and Malmfors 1963, Demerens et al. 1996). En effet, la majorité des neurones myélinisés du CNS le sont uniquement lors des dernières étapes du développement embryonnaire et postnatal. Le processus de myélinisation axonal atteint son pic vers la première année de vie et n'est pas tout à fait complété avant l'âge de 30 ans (Baumann and Pham-Dinh 2001).

II.1.3 Astrocytes

Les astrocytes constituent la troisième population de cellules gliales du CNS et est de loin la plus diversifiée. Les astrocytes, ainsi nommés du à leur forme étoilée, peuvent être classifiés en deux types principaux, les astrocytes protoplasmiques et les astrocytes fibreux. Les astrocytes protoplasmiques, retrouvés principalement dans la matière grise, possèdent plusieurs prolongements ramifiés de façon uniforme tandis que les astrocytes fibreux sont plus abondants dans la matière blanche et sont composés de longs prolongements moins nombreux (Sofroniew and Vinters 2010). Il existe cependant plus de deux types d'astrocytes. Reichenbach et Wolburg les ont classifiés en plusieurs classes selon leur morphologie (Reichenbach and Wolburg 2005). Ces différents types d'astrocytes sont représentés dans la Figure 2. Cette grande hétérogénéité complique la caractérisation et définition de cette population de cellules gliales (Kimelberg 2004, Emsley and Macklis 2006).



Reproduit avec la permission de Reichenbach and Wolburg 2005 et Kettenmann and Ransom 2005

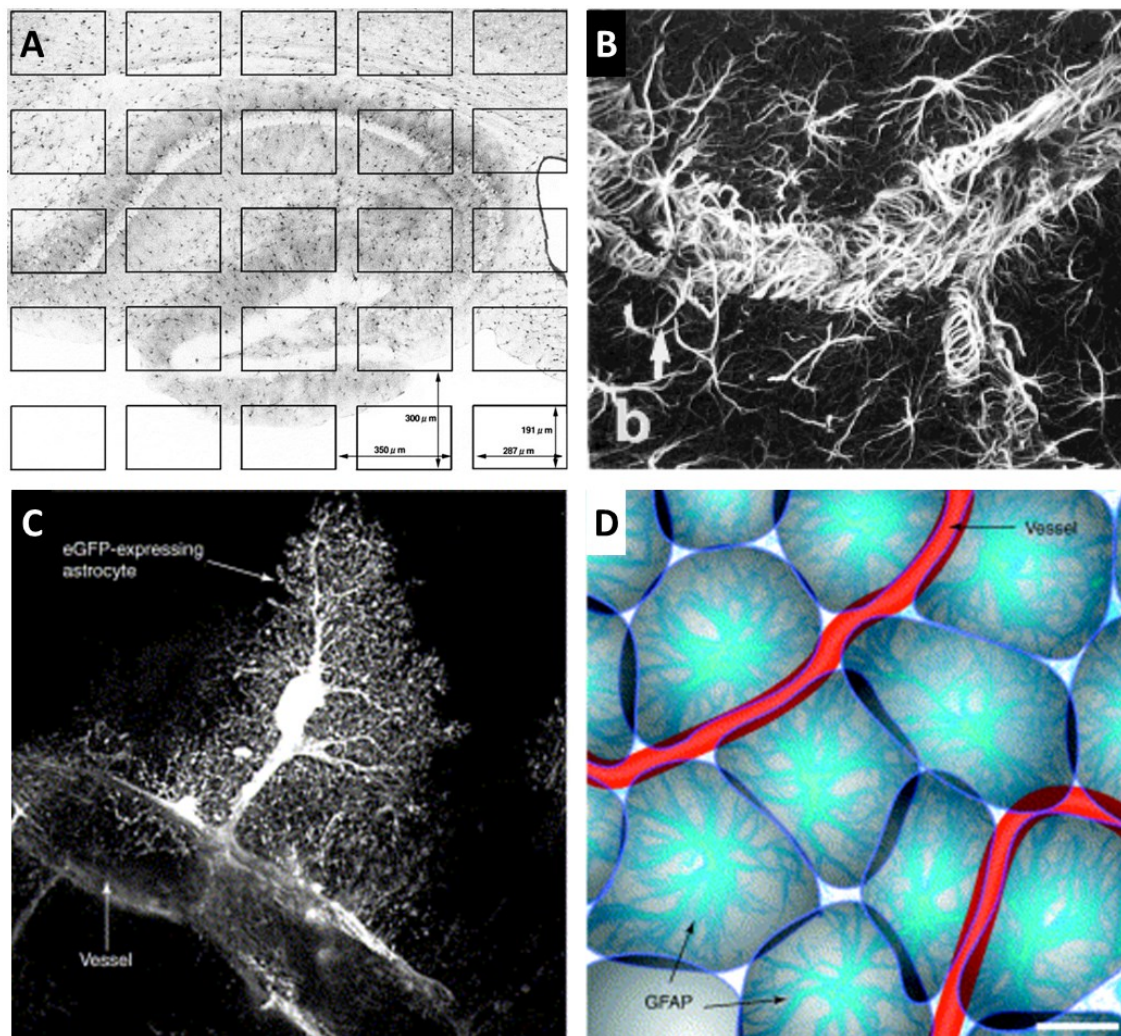
Figure 2 : Diversité des astrocytes et des cellules épendymocytaires.

Représentation morphologique des différents types d'astrocytes tels que classifiés par Reichenbach et Wolburg et leur positionnement relatif aux diverses structures du CNS. Abréviations : I tanocytes, II astrocytes radiaux (cellules gliales de Bergmann), III astrocytes marginaux, IV astrocytes protoplasmiques, V astrocytes velate, VI astrocytes fibreux, VII astrocytes périvasculaires, VIII astrocytes interlaminaires, IX astrocytes immatures, X épendymocytes, XI cellules du plexus choroïde.

II.1.3.1 Structure et organisation

De façon générale, les astrocytes possèdent de 5 à 8 prolongements principaux hautement ramifiés. Ils sont généralement caractérisés par l'expression de divers marqueurs comme la vimentine, le marqueur S100 ainsi que « Glial Fibrillary Acidic Protein » (GFAP). Malgré qu'aucun de ces trois marqueurs ne représente adéquatement tous les astrocytes, GFAP est le plus couramment utilisé. Ce dernier est uniquement exprimé dans le corps cellulaire et les prolongements principaux de l'astrocyte donnant l'apparence étoilée aux astrocytes. Si l'on tient compte de toutes les ramifications secondaires provenant des quelques prolongements principaux, les astrocytes ont plutôt la forme d'un polygone arrondi (Figure 3) (Nedergaard et al. 2003). Dans la matière grise, et possiblement aussi dans la matière blanche, ces astrocytes sont distribués de façon uniforme et hautement organisée. Ceci fait en sorte que leurs prolongements occupent un espace relativement bien défini et exclusif à un seul astrocyte, définit comme le domaine d'un astrocyte. Les domaines d'astrocytes voisins ne se chevauchent pas (moins de 5 % de leur volume) et uniquement les ramifications les plus fines de leurs prolongements peuvent former des jonctions gap avec les astrocytes voisins et ainsi former un réseau communicant d'astrocytes (Ogata and Kosaka 2002, Nedergaard et al. 2003, Houades et al. 2008). La Figure 3 montre un marquage d'astrocyte faisant contact avec un vaisseau sanguin ainsi qu'une représentation de l'interaction entre astrocytes voisins. Les prolongements astrocytaires sont étroitement associés avec les processus pré- et post-synaptiques des neurones et forment une unité fonctionnelle référée en tant que synapse tripartite (Araque et al. 1999). La taille du domaine d'un astrocyte chez la souris varie d'une région cérébrale à l'autre, par exemple dans le cortex un astrocyte peut couvrir un volume total de 22 000 μm^3 tandis que dans l'hippocampe ce volume peut aller jusqu'à 85 000 μm^3 . Étant donné qu'une majorité des synapses est associée à un

astrocyte, un seul astrocyte dans l'hippocampe serait potentiellement associé à plus de 100 000 synapses. Les astrocytes humains sont beaucoup plus complexes et volumineux que chez le rongeur. Contrairement aux 5 à 8 prolongements chez le rongeur, les astrocytes humains peuvent avoir jusqu'à 40 prolongements cellulaires principaux et couvrir un volume 27 fois plus grand. Ceci permettrait à un seul astrocyte humain d'envelopper près de 2 000 000 synapses (Oberheim et al. 2006, Houades et al. 2008, Oberheim et al. 2009). La majorité des astrocytes sont aussi en contact direct avec la microvasculature du cerveau via leur pied astrocytaire. Ces derniers peuvent couvrir plus de 99 % de la surface des capillaires sanguins dans le CNS. Ils sont donc idéalement situés pour détecter et transporter les substrats énergétiques de la circulation sanguine vers les neurones, en passant par le vaste réseau interconnecté d'astrocytes (Kacem et al. 1998, Mathiisen et al. 2010).



Adapté avec la permission de Kacem et al. 1998, Ogata and Kosaka 2002 et Nedergaard et al. 2003

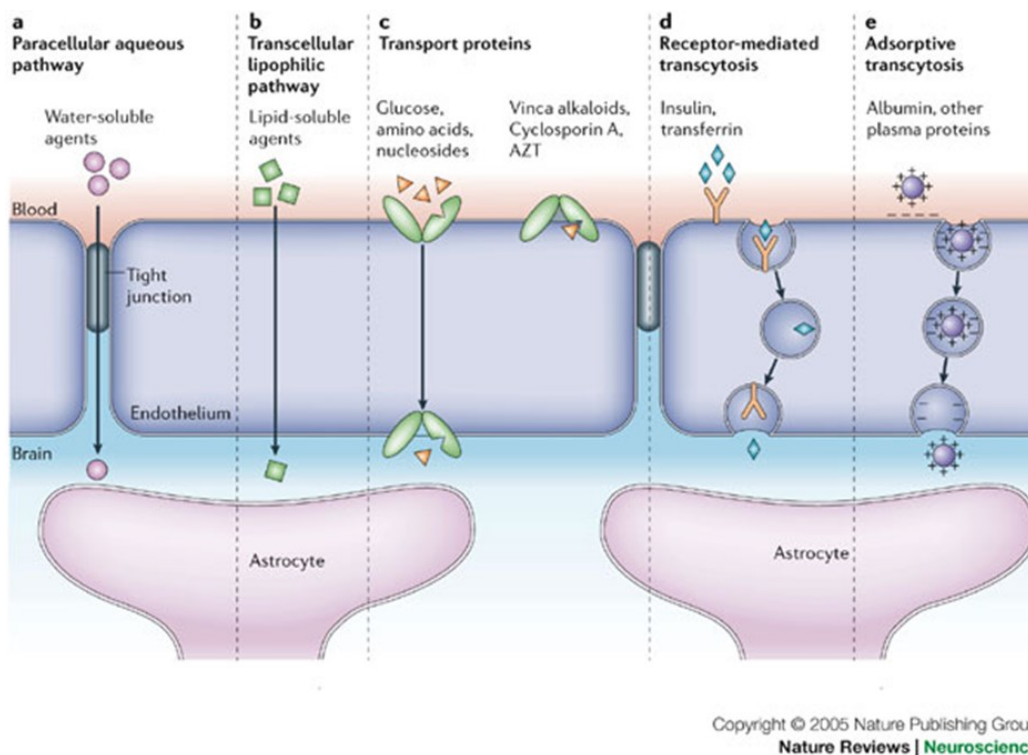
Figure 3 : Organisation et distribution des astrocytes dans le cerveau.

A- Coupe coronale montrant une distribution uniforme des astrocytes dans l'hippocampe de souris, les astrocytes sont marqués à l'aide d'un anticorps dirigé contre le marqueur S100. B- Coupe coronale dans le cortex pariétal représentant un vaisseau sanguin entièrement recouvert de pieds astrocytaires, marquage à l'aide d'un anticorps dirigé contre le marqueur astrocytaire GFAP. C- Image d'un seul astrocyte exprimant la protéine fluorescente eGFP pour marquer les ramifications des prolongements de l'astrocyte. Le marqueur GFAP ne permet de voir que les prolongements principaux et secondaires, ce qui a conduit au terme astrocyte. D- Représentation de la forme et l'organisation des astrocytes par rapport aux vaisseaux sanguins et aux autres astrocytes. Les prolongements principaux positifs pour le marqueur GFAP sont représentés en bleu. Abréviations : (eGFP) Green fluorescent protein, (GFAP) Glial fibrillary acidic protein.

II.2 Transport et métabolisme des nutriments

Plusieurs études récentes suggèrent que les astrocytes soient impliqués dans la détection des nutriments et la régulation de la balance énergétique (Garcia-Caceres et al. 2012). En effet, les astrocytes sont idéalement positionnés pour pouvoir détecter les nutriments et hormones circulants. Ainsi, avant de discuter les différents rôles des astrocytes, il est important d'introduire les différents concepts du transport et du métabolisme des nutriments dans le CNS et l'implication des astrocytes dans ces processus. Le cerveau est isolé du reste du corps par la BBB, une structure composée de jonctions serrées entre les cellules de l'endothélium des capillaires sanguins du cerveau. La BBB assume un rôle essentiel en prévenant l'entrée de pathogènes et de toxines dans le cerveau et en permettant une régulation du milieu extracellulaire, notamment l'homéostasie ionique via la régulation des concentrations d'ions Na^+ , K^+ et Ca^{++} (Hawkins and Davis 2005). Contrairement aux endothéliums des vaisseaux sanguins périphériques, les cellules endothéliales dans le cerveau sont imperméables aux petites molécules incluant les molécules hydrosolubles. L'imperméabilité de la BBB est assurée par plusieurs facteurs. (1) Les cellules endothéliales dans le CNS forment des jonctions complexes formées de plusieurs protéines de jonctions serrées ainsi que des molécules d'adhésion cellulaire. (2) Les endothéliums cérébraux ont des taux de transport vésiculaire inférieurs aux endothéliums périphériques. (3) Le transport de molécules à travers la BBB se fait principalement par des transporteurs hautement sélectifs. (4) Ces cellules expriment peu de molécules d'adhésion des leucocytes, ce qui limite l'accès des cellules immunitaires au CNS. Par contre, les molécules gazeuses,

tels l'oxygène et le dioxyde de carbone, ainsi que les petites molécules liposolubles, tels l'éthanol et certaines drogues, peuvent diffuser librement à travers la membrane plasmique des cellules endothéliales de la BBB (Abbott and Romero 1996, Abbott et al. 2006, Chow and Gu 2015). Le transport du glucose, par exemple, est facilité par l'expression du glucose transporter (GLUT) 1 au niveau de la BBB (Yeh et al. 2008). La Figure 4 décrit les divers modes de transport des macromolécules à travers la BBB.



Reproduit avec la permission de Abbott, Ronnback et al. 2006

Figure 4 : Modes de transport à travers la barrière hémato encéphalique.

Représentation d'une coupe transversale de la BBB et des pieds astrocytaires qui y sont associés ainsi que des divers modes de transports à travers la BBB selon le type de molécules transportés. A- Le passage des petites molécules hydrosolubles est sévèrement restreint, uniquement les plus petites molécules peuvent emprunter cette voie. B- Les molécules liposolubles peuvent traverser au niveau des cellules endothéliales. C- Les composés non liposolubles comme le glucose, les acides aminés et les corps cétoniques sont transportés via des récepteurs membranaires par transport actif (nécessitant l'ATP) ou passif. D- Les plus grosses molécules et certains peptides comme l'insuline sont généralement transportés par endocytose médié par un récepteur. E- Les plus grosses protéines dans

la circulation périphérique comme l'albumine sont transportées par endocytose suivant leur adsorption sur la membrane plasmique des cellules endothéliales de la BBB.

Due à leur association particulière avec la microvasculature du cerveau et la BBB (Figure 3 et Figure 4) (Mathiisen et al. 2010), les astrocytes sont les cellules les mieux positionnées pour détecter et transporter les nutriments de la circulation sanguine vers le CNS via leur pied astrocytaire. De plus, ces cellules forment un vaste réseau d'astrocytes connectés par leur prolongement via des molécules de jonction gap comme la connexin (CXN) 30 et 43. Ceci fait en sorte que les astrocytes peuvent acheminer ces substrats énergétiques vers les régions du parenchyme cérébral qui n'ont pas un accès direct à la circulation périphérique (Rouach et al. 2008). Les astrocytes sont aussi capables de stocker le glucose sous forme de glycogène pour répondre aux besoins énergétiques des neurones lors de périodes d'activité neuronale (Gruetter 2003). En effet, la plus grande partie des dépenses énergétiques du cerveau provient de l'activité neuronale (Harris et al. 2012, Howarth et al. 2012). Ceci a amené plusieurs à proposer que les astrocytes seraient impliqués dans le transport des nutriments et l'acheminement de ces derniers vers les neurones. Les astrocytes doivent donc être équipés pour le transport des principaux nutriments utilisés dans le cerveau, incluant le glucose et les acides gras.

II.2.1 Glucose

Dans le cerveau, le transport du glucose se fait majoritairement au niveau des pieds astrocytaires, en contact direct avec l'endothélium de la BBB. Son passage à travers cette membrane est facilité par le transporteur de glucose GLUT1. Ce transporteur est présent sous deux formes différenciées par des niveaux différents de glycosylation et donc leur poids moléculaire (Birnbaum et al. 1986). Dans le cerveau, le variant de 55 kDa est exprimé exclusivement dans l'endothélium de la BBB tandis que le variant de 45 kDa est majoritairement exprimé dans les astrocytes, les épendymocytes ainsi que les membranes du plexus choroïde et de façon très limitée chez les neurones (Simpson et al. 2007). GLUT1 est un transporteur à haute affinité pour le glucose, soit environ 3 mM (Zhao and Keating 2007), il est donc saturé à de faibles concentrations de glucose, permettant ainsi un transport de glucose ininterrompu, et ce, même en période d'hypoglycémie.

Cette association des astrocytes à la BBB ainsi que l'expression préférentielle de GLUT1 dans les cellules gliales, plutôt que dans les neurones, suggèrent que le transport du glucose est effectué principalement par les astrocytes. Ceci est supporté par plusieurs études employant des analogues non métabolisable du glucose. Ces études montrent que le transport ainsi que l'utilisation du glucose sont plus élevés dans les astrocytes que dans les neurones dans plusieurs modèles *in vitro* (co-cultures d'astrocytes et de neurones), *ex vivo* (explants d'hippocampe et de cervelet) ainsi qu'*in vivo* (Barros et al. 2009, Chuquet et al. 2010, Jakoby et al. 2014). Cette préférence pour le transport et l'utilisation du glucose par les astrocytes est observée surtout lors d'une augmentation de l'activité neuronale. Les auteurs montrent que les premières étapes du métabolisme du glucose, notamment sa phosphorylation par l'hexokinase, sont effectuées dans les cellules gliales (Barros et al. 2009, Jakoby et al. 2014). En effet, l'activité de l'hexokinase est plus élevée dans les cellules gliales de Bergmann et les astrocytes que dans les neurones (Kato-Semba et al. 1988). Malgré cette utilisation préférentielle du glucose dans les astrocytes, l'oxydation du glucose par les cellules gliales ne représente pas plus de 20 % de l'oxydation totale du glucose (Harris et al. 2012, Hyder et al. 2013). Effectivement, les dépenses énergétiques des astrocytes ne représentent qu'une très petite portion de la consommation d'Adenosine triphosphate (ATP) du cerveau, soit environ 5-15 %. L'énergie produite par la phosphorylation de l'ATP dans le cerveau est presque entièrement dédiée aux processus synaptiques dans les neurones (Attwell and Laughlin 2001, Belanger et al. 2011). Dans le cortex, il est estimé que les divers processus synaptiques sont responsables de plus de 70 % de la consommation d'ATP, soit 44 % pour la transmission synaptique et 16 % pour la propagation des AP et 15 % pour le maintien des potentiels membranaires (Howarth et al. 2012). Les astrocytes transportent donc le glucose de façon disproportionnée par rapport à leurs dépenses énergétiques. Cette disparité entre leur grande capacité de transport du glucose et leur relative faible consommation énergétique suggère que la majorité du glucose transporté dans les astrocytes n'est pas utilisé localement pour la production d'ATP (Barros et al. 2009, Chuquet et al. 2010, Jakoby et al. 2014). Ceci est compatible avec les observations d'Edmond qui suggère que les astrocytes ont un profil beaucoup plus glycolytique qu'oxydatif, quant au métabolisme du glucose (Edmond et al. 1987).

Les astrocytes ont une grande activité hexokinase (Kato-Semba et al. 1988, Sanchez-Alvarez et al. 2004), entraînant sa séquestration intracellulaire par sa phosphorylation en glucose-6-phosphate. Une fois phosphorylé, la majorité du glucose peut être dégradé par la glycolyse pour produire principalement du lactate ou être utilisé pour la synthèse du glycogène (Wiesinger et al. 1997). La

production d'ATP à partir du glucose dans les astrocytes peut être maintenue presque exclusivement par la glycolyse. De plus, cette glycolyse est maintenue, voire même stimulée, en conditions hypoxiques jusqu'à ce que la production de lactate entraîne une acidose lactique (Zwingmann and Leibfritz 2003). Cette capacité d'utilisation du glucose en condition hypoxique n'est pas observée chez les neurones et permet aux astrocytes de maintenir la production d'ATP dans des conditions hypoxiques ou ischémiques.

Dans le cerveau, seuls les astrocytes sont capables de synthétiser et de stocker des réserves de glycogène en condition non pathologiques (Vilchez et al. 2007, Barros 2013). Ces réserves de glycogène dans le cerveau sont estimées à environ 3-12 $\mu\text{mol/g}$ (Barros 2013). En comparaison, le foie contient des réserves de glycogène d'environ 100-500 $\mu\text{mol/g}$ et le muscle squelettique 300-350 $\mu\text{mol/g}$ (Cruz and Dienel 2002, Brown and Ransom 2007). Le glycogène astrocytaire est une réserve essentielle de glucose utilisée durant les augmentations rapides de l'activité neuronale qui requièrent un apport immédiat de substrat énergétique qui ne peut être fourni assez rapidement par une augmentation du flux sanguin (Brown and Ransom 2007). De plus, le contenu en glycogène dans les astrocytes peut être régulé par le glutamate durant ces périodes d'activité (Brown and Ransom 2007, Sofroniew and Vinters 2010). L'activité neuronale peut même être maintenue exclusivement par le glycogène astrocytaire durant les périodes d'hypoglycémie ou de privation de glucose (Brown et al. 2005, Brown and Ransom 2015). Le glucose peut aussi être dirigé vers la voie du pentose phosphate, qui est une voie anabolique produisant du ribose-5-phosphate, un sucre à cinq carbones nécessaire à la synthèse des acides nucléiques. Cette voie n'est pas favorisée en conditions normales et ne représente que 6 % du glucose utilisé dans un système d'astrocytes primaires en culture (Ben-Yoseph et al. 1994).

Ceci a amené le groupe de Magistretti et Pellerin à élaborer une hypothèse de coopération astrocyte-neurone ou « Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle » (ANLS). Ce modèle de coopération métabolique entre les astrocytes et les neurones suggère que le glucose serait initialement pris en charge par les astrocytes, où il serait converti en lactate suite à sa glycolyse avant d'être acheminé vers les neurones pour son oxydation complète. Cette hypothèse de l'ANLS (Figure 5) sera discutée plus en détail dans une section subséquente.

II.2.2 Acides gras et corps cétoniques

Plusieurs études ont suggéré que les acides gras ne pouvaient pas franchir la BBB et que le cerveau était capable de synthétiser les différents lipides dont il avait besoin. D'autres suggèrent que certains acides gras essentiels, comme l'acide linoléique, peuvent traverser la BBB, tandis que les acides gras saturés et insaturés dits « non essentiels » sont exclusivement produits par la synthèse *de novo* et suggèrent l'existence d'un mécanisme de transport sélectif de certains acides gras (Edmond 2001). Des études de perfusion d'acides gras radio marqués ($[^{14}\text{C}]$ palmitate) suggèrent que les acides gras libres sont rapidement transportés dans le cerveau à travers la BBB. Ces études montrent qu'environ 40% du $[^{14}\text{C}]$ palmitate dans le cerveau est incorporé dans les phospholipides et les lipides neutres après environ 45 s de perfusion intra carotidienne (Smith and Nagura 2001). De façon intéressante, la capacité de transport des acides gras peut varier d'une région à l'autre du cerveau. L'indice de captation du cerveau, ou « brain uptake index », pour le $[^{14}\text{C}]$ palmitate est d'environ 30% dans l'hypothalamus comparé à 22% dans le reste du cerveau (Clement et al. 2002). De plus, près de 20 % des dépenses énergétiques du SCN proviennent de l'oxydation des acides gras. Une telle contribution nécessite donc un apport exogène d'acides gras vers le cerveau et ne peut être expliquée par une synthèse *de novo* (Ebert et al. 2003). L'abondance en polyunsaturated fatty acid (PUFA) essentiel dans le cerveau, notamment l'acide arachidonique et le « Docosahexanoic Acid » (DHA), implique l'existence d'un mécanisme de transport des acides gras à travers la BBB (Liu et al. 2015).

Bien que le transport des acides gras à travers la BBB n'est pas remis en doute, plusieurs questions restent quant à quels mécanismes de transports actifs ou passifs ces derniers emploient. Plusieurs hypothèses ont été formulées quant à la manière dont les acides gras traversent la BBB. Ces hypothèses peuvent être classifiées sous deux catégories principales, la diffusion passive par flip-flop et le transport facilité par des protéines membranaires. L'hypothèse de la diffusion passive par flip-flop implique le passage d'acides gras libres, soit des « Non-Esterified Fatty Acid » (NEFA) qui ne seraient pas liés à des protéines. Les acides gras sont des molécules amphiphiles, ils peuvent ainsi s'adsorber et s'incorporer à la membrane luminale de l'endothélium de la BBB. Par la suite, ils se dissocient du côté intracellulaire de la membrane, où leur concentration est plus faible que dans la circulation périphérique (Hamilton and Brunaldi 2007). L'hypothèse du transport facilité suggère que la BBB est relativement imperméable aux acides gras et que ces derniers requièrent des mécanismes de transport facilités par des protéines pour traverser.

La grande majorité des acides gras circulants sont liés à des protéines sous une forme ou un autre. Ainsi ils peuvent être liés à l'albumine en tant que NEFA, ou estérifiés en triacylglycerol (TAG) associés à des lipoprotéines. Sous ces deux formes, les acides gras ne peuvent passer la BBB, ils doivent d'abord se dissocier de l'albumine ou être hydrolysés par des protéines lipases (Smith and Nagura 2001, Spector 2001).

La lipoprotéine lipase (LPL) est une des enzymes clé dans l'hydrolyse des TAG circulants et dans le transport des acides gras dans les tissus périphériques pour leur oxydation mitochondriale ou pour être estérifiés à nouveau en TAG (Wang and Eckel 2009). Ainsi il est possible que cette lipase soit aussi impliquée dans le transport des acides gras vers le CNS. La LPL est exprimée et fonctionnelle au niveau de la BBB et est même régulée à la baisse par le jeûne (Brecher and Kuan 1979, Eckel and Robbins 1984). De plus, des déficiences de la LPL neuronale diminuent le transport d'acides gras dans l'hypothalamus et contribuent au développement de l'obésité (Wang et al. 2011). Cette diminution est aussi observée dans un système de cultures neuronales hypothalamiques invalidées pour la LPL (Libby et al. 2015).

Une des faiblesses de la théorie de la diffusion passive est qu'elle ne peut, par elle-même, expliquer la sélectivité du transport de certains acides gras. En effet, un transport sélectif à travers une membrane est généralement associé à un transport par des protéines membranaires. Ce « transport sélectif » est parfaitement illustré par les différences entre les niveaux de deux acides gras essentiels dans le cerveau, soit le DHA et le « Eicosapentænoic Acid » (EPA). Les concentrations de DHA sont environ 250 à 300 fois plus élevées que pour l'EPA mais, dans le plasma ils ne sont que 4 fois plus élevés. Ceci semble suggérer que le DHA est transporté de façon préférentielle ou à un taux de transport plus élevé que l'EPA (Kitson et al. 2012). Malgré ces grandes différences dans les niveaux de ces deux PUFA dans le cerveau, leurs coefficients de transport vers le cerveau sont presque identiques. De plus, ce coefficient de transport est comparable à celui du diazépam, une molécule capable de diffuser librement vers le cerveau, suggérant que ces deux acides gras diffusent à la même vitesse que des molécules lipophiles (Ouellet et al. 2009). De plus, une autre indication que ces acides gras diffusent librement est que leur transport n'est pas saturable à des concentrations physiologiques puisque l'addition de grandes concentrations (jusqu'à 100 μ M) de DHA ou EPA non radio-marqué ne diminue pas le taux de diffusion de leurs traceurs respectifs (Ouellet et al. 2009) et que seul leur complexation à l'albumine diminue cette diffusion en réduisant la proportion « libre » de ces acides

gras. Ainsi, les différences de niveaux de DHA et D'EPA sont probablement dues à une différence dans leur utilisation une fois dans le cerveau plutôt qu'à un transport sélectif. En effet, contrairement au DHA, l'EPA est rapidement oxydé dans la mitochondrie, suite à son passage à travers la BBB (Chen et al. 2009, Chen and Bazinet 2015). Ceci est aussi le cas pour d'autres PUFA qui sont « sous-représentés » dans le cerveau, comme l'acide linoléique et α -linoléique. Ces deux acides gras à longue chaîne seraient rapidement oxydés avant de subir plusieurs étapes d'élongation et former respectivement l'acide arachidonique et le DHA (Demar et al. 2005, DeMar et al. 2006).

Un autre argument souvent avancé contre la diffusion passive est l'expression de différents transporteurs d'acides gras comme «fatty acid transport protein (FATP) » et la translocase des acides gras au niveau de la BBB. La présence de ces derniers semble indiquer qu'ils sont impliqués et importants dans ce processus (Mitchell et al. 2011). Cependant, plusieurs études incluant des études d'invalidations génétiques (Xu et al. 2013) remettent en cause l'activité translocase de ces protéines et suggèrent que ces deux « transporteurs » n'ont pas la capacité de transporter les acides gras à travers la membrane. Ces protéines ont toutefois une activité Acyl-CoA synthase qui permet de séquestrer les acides gras dans la cellule et facilitent ainsi leur métabolisme intracellulaire (Hamilton and Brunaldi 2007, Xu et al. 2013). Puisque les Acyl-CoA, contrairement aux NEFA, ne sont pas capables de diffuser par flip-flop à travers la bicouche lipidique, ces protéines de transport des acides gras faciliteraient leur transport en diminuant leurs concentrations intracellulaires et en empêchant leur sortie par diffusion passive. De plus, l'analyse de la structure de ces protéines révèle qu'ils sont presque entièrement localisés dans le cytosol, ceci rend improbable un rôle direct dans le transport des acides gras extracellulaires (Lewis et al. 2001, Hamilton and Brunaldi 2007).

La réalité du transport des acides gras à travers les différentes membranes cellulaires est probablement une combinaison de la diffusion passive et du transport facilité. Les acides gras diffusent librement à travers la membrane par flip-flop. Cette diffusion est un processus bidirectionnel et requiert donc un gradient de concentration de part et d'autre de la membrane ou une manière de séquestrer les acides gras une fois à l'intérieur de la cellule. Ce gradient en NEFA peut alors être maintenu par différentes protéines de liaison aux acides gras comme les fatty acid binding protein (FABP), ou sont convertis en Acyl-CoA par les Acetyl-CoA synthetase (ACS) ou FATP. En accord avec cette vision, le taux de transport vers le cerveau est influencé par le flux d'utilisation des acides gras, notamment entre l'estérification et l'oxydation β des acides gras (Chen et al. 2008).

En plus des acides gras et du glucose, le cerveau peut utiliser les corps cétoniques comme substrat alternatif, ceci est particulièrement important durant le développement postnatal (Cornford and Cornford 1986, Hasselbalch et al. 1995). Ce transport de corps cétoniques peut aussi être accentué durant les périodes de jeûne (Gjedde and Crone 1975, Pan et al. 2000). Les corps cétoniques sont transportés par une catégorie de transporteurs membranaires capables de transporter le lactate, le pyruvate ainsi que les corps cétoniques. Ces « Monocarboxylate Transporters » (MCT) sont exprimés au niveau des cellules endothéliales de la BBB ainsi que sur les pieds astrocytaires. MCT1 est exprimé dans les cellules endothéliales de la BBB tandis que MCT2 est fortement exprimé dans les astrocytes, ces derniers peuvent aussi être exprimés dans les neurones (Conn et al. 1983, Nehlig 2004). Le transport des corps cétoniques est donc similaire à celui du glucose et du lactate.

Le cerveau peut ainsi compter sur un apport périphérique de divers substrats énergétiques, comme le glucose, les acides gras et les corps cétoniques, pour subvenir à ses besoins énergétiques. Par contre, ces différents substrats ne contribuent pas tous au même niveau au métabolisme énergétique. Le glucose est utilisé de manière préférentielle à l'âge adulte tandis que les corps cétoniques peuvent combler ces besoins durant des périodes de jeûne prolongé ou durant le développement postnatal.

II.2.3 Métabolisme énergétique

Le cerveau constitue environ 2 % de la masse corporelle, il consomme pourtant plus de 20 % de la quantité totale d'oxygène et plus de 25 % du glucose au repos (Belanger et al. 2011). Ces besoins énergétiques, qui semblent disproportionnés vis-à-vis la masse relative du cerveau, peuvent être expliqués par la grande consommation énergétique de l'activité neuronale. En effet, environ 75 % des dépenses énergétiques totales du cerveau, estimées à 27.2 μmol d'ATP/g/min dans le cortex, proviennent des différents processus de signalisation cellulaire incluant le maintien des potentiels membranaires (15 %), les AP (16 %) et les différents processus nécessaires à la transmission synaptique incluant la synthèse et le recyclage des neurotransmetteurs (44 %) (Harris et al. 2012, Howarth et al. 2012). Pour être capables de maintenir et même augmenter ces niveaux élevés de dépenses énergétiques, pour soutenir une augmentation d'activité neuronale, les neurones ont besoin d'un apport constant d'une grande quantité de substrats énergétiques. L'approvisionnement neuronal en glucose, la principale source d'énergie du cerveau provient principalement de la

circulation périphérique ainsi que de ses réserves internes, stockées sous forme de glycogène (Barros 2013).

Le cerveau utilise principalement le glucose pour répondre à ses besoins énergétiques, mais ce dernier est aussi capable d'utiliser les acides gras (Lewandowski et al. 1991, Cunnane et al. 2001). De plus, plusieurs des enzymes impliquées dans le métabolisme intracellulaire des acides gras sont exprimées dans le cerveau et restent actives dans plusieurs régions à l'âge adulte (Obici et al. 2003, Moulle et al. 2013). D'autres indications de la capacité du cerveau à oxyder les acides gras proviennent de l'isolation de cellules cérébrales, notamment les cellules gliales, qui sont capables d'utiliser les acides gras pour leurs besoins en énergie (Edmond et al. 1987). D'autres études, utilisant des traceurs radioactifs, montrent qu'environ 85 % et 60 % de l'acide α -linoléique et linoléique (Demar et al. 2005, DeMar et al. 2006), ainsi que l'EPA (Chen et al. 2009), sont oxydés rapidement après leur infusion dans la circulation périphérique. Une étude récente sur des cellules progénitrices de la « Subventricular Zone » (SVZ) montre que ces cellules utilisent de façon efficace les acides gras pour produire de l'ATP (Stoll et al. 2015).

Les acides gras sont des molécules très riches en énergie. En effet, l'oxydation complète d'un acide gras en CO_2 produit plus de molécules d'ATP par carbone que le glucose soit environ 8 ATP par carbone, dans le cas du palmitate, contre 6 pour le glucose. Ceci est dû au fait que chaque paire de carbones de l'acide gras produit un Acétyl-CoA à l'exception du dernier cycle de β -oxydation tandis que les 6 carbones du glucose ne produisent que 2 Acétyl-CoA (Harvey Lodish 2000). Les acides gras sont donc un substrat de choix pour les organes et les tissus ayant de fortes demandes énergétiques. Le cœur avec sa forte consommation d'environ 6 kg d'ATP par jour (Wang et al. 2014) produit 50-70 % de ses réserves d'ATP à partir de l'oxydation des acides gras (Lopaschuk et al. 2010). Bien que le cerveau ait lui aussi de grands besoins énergétiques, uniquement 20 % de ces derniers sont comblés par l'oxydation des acides gras (Ebert et al. 2003). Si l'on considère les besoins énergétiques élevés du cerveau lors d'activité neuronale accrue, ainsi que sa faible capacité de stockage de réserves énergétiques, il semblerait logique pour le cerveau d'oxyder majoritairement le substrat ayant la plus grande densité énergétique, 39 kJ/g pour les « Long-Chain Fatty Acid » (LCFA), comparé à 17 kJ/g pour le glucose (Schonfeld and Reiser 2013). Plusieurs raisons peuvent expliquer pourquoi l'oxydation des acides gras n'est pas favorisée dans le cerveau. L'oxydation β des acides gras consomme plus d'oxygène et génère plus de dérivés réactifs de l'oxygène que l'oxydation du glucose (Schonfeld and

Reiser 2013). Le cerveau est un organe qui est très sensible à l'hypoxie, une baisse trop prononcée de l'oxygénation du cerveau inactive la phosphorylation oxydative, principale voie de production de l'ATP dans le cerveau, empêchant alors les neurones de maintenir les gradients ioniques nécessaires à leur activité (Erecinska and Silver 2001). Il est aussi possible de produire de l'ATP en condition anaérobie avec le glucose via la glycolyse, ce qui n'est pas possible avec les acides gras. Finalement, l'oxydation du glucose génère l'ATP plus rapidement que l'oxydation des acides gras, qui n'est peut-être pas assez rapide pour fournir les neurones en périodes d'activité synaptique élevées (Schonfeld and Reiser 2013, Chen et al. 2014). Malgré le fait que l'oxydation des acides gras ne soit pas favorisée dans le cerveau, certains acides peuvent être oxydés suite à leur transport dans le cerveau. C'est le cas de l'acide linoléique et α -linoléique qui sont préférentiellement oxydés plutôt qu'estérifiés ou utilisés pour la synthèse d'AA et de DHA (Demar et al. 2005, DeMar et al. 2006).

Une autre indication de l'importance de l'oxydation des acides gras dans le cerveau vient des maladies liées à des désordres de l'oxydation des acides gras. Les défauts de l'oxydation des acides gras sont un regroupement de défauts dans une ou plusieurs enzymes impliquées dans le transport ou le métabolisme oxydatif des acides gras. Ces maladies peuvent causer des encéphalopathies et des crises épileptiques, une hypotonie et des léthargies pouvant conduire jusqu'au coma (Wajner and Amaral 2015). De plus, plusieurs maladies neurodégénératives, telles la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, la maladie d'Alzheimer et plusieurs autres, sont caractérisées par des défauts de l'activité oxydative mitochondriale (Chaturvedi and Flint Beal 2013).

Les astrocytes sont les principaux utilisateurs des acides gras dans le cerveau. Ils vont ainsi oxyder préférentiellement les acides gras et les corps cétoniques plutôt que le glucose (Edmond et al. 1987). En fait, la plus grande partie de l'oxydation astrocytaire des acides gras comme le palmitate conduit à la production de corps cétoniques (Blazquez et al. 1998). Ces derniers pourront ainsi être acheminés vers les neurones pour être oxydés comme substrat alternatif au glucose (Guzman and Blazquez 2001), ce concept de navette sera élaboré dans une section subséquente.

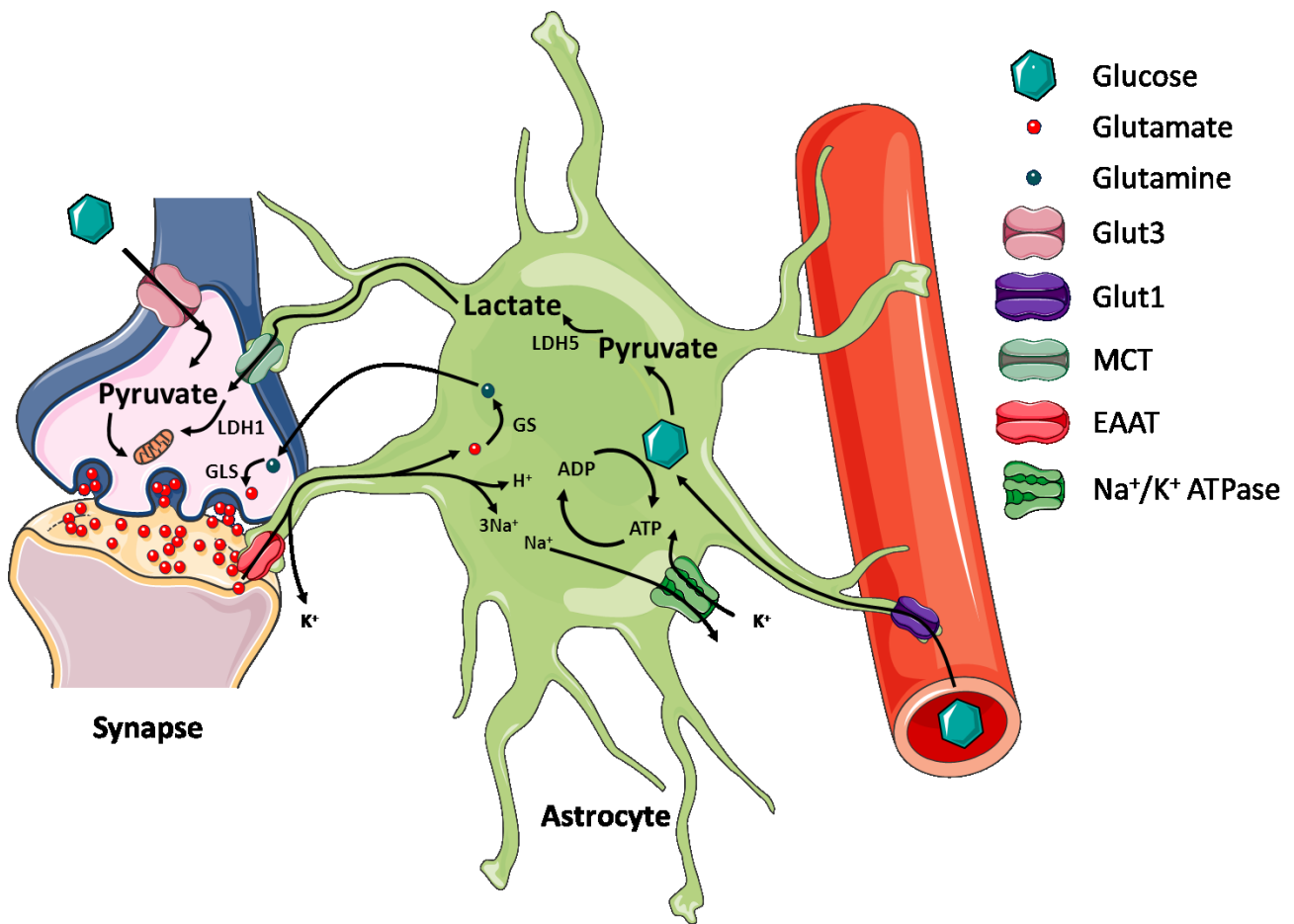
III Rôle des astrocytes dans le cerveau

Les astrocytes ont longtemps été considérés comme des cellules de soutien pour les neurones. Nous savons maintenant que les astrocytes ont une implication plus directement dans plusieurs processus neuronaux incluant la recapture des neurotransmetteurs, le maintien de l'homéostasie ionique et du pH de la synapse, la régulation du flux sanguin, la migration des neurones lors du développement ainsi que le stockage et l'acheminement de substrats énergétiques vers les neurones ainsi que plusieurs autres fonctions incluent le sommeil, la cognition, la potentialisation à long terme et également dans la prise alimentaire (Ogata and Kosaka 2002, Nedergaard et al. 2003, Halassa et al. 2009, Sofroniew and Vinters 2010, Newman et al. 2011, Frank 2013). Nous allons discuter dans les sections suivantes du rôle des astrocytes dans le couplage métabolique avec les neurones, la régulation de l'activité synaptique et certaines fonctions physiologiques récemment découvertes.

III.1 Navettes Astrocyte-Neurone

III.1.1 Lactate

Comme mentionné plus haut, pour pouvoir adéquatement fournir la quantité d'énergie nécessaire aux neurones, il n'est pas suffisant de simplement leur fournir des substrats énergétiques. Les astrocytes doivent aussi être capables de détecter les augmentations de l'activité neuronale et ainsi augmenter cet apport énergétique. Les astrocytes détectent l'activité neuronale via leur capacité à transporter le glutamate relâché dans la fente synaptique par le neurone présynaptique. Magistretti et Pellerin ont proposé que cette recapture du glutamate entraîne une augmentation de l'utilisation du glucose sous forme de glycolyse aérobie et de glycolyse dans les astrocytes pour produire du lactate. Le lactate produit dans les astrocytes est acheminé aux neurones où il sera converti en pyruvate par le lactate dehydrogenase (LDH) et oxydé pour produire de l'ATP (Magistretti and Pellerin 1999) ou pour la synthèse de glutamate et ainsi restaurer les stocks de neurotransmetteurs du neurone (Pellerin et al. 1998). Ils proposent ainsi un modèle l'ANLS résumé dans la Figure 5 ci-dessous (Pellerin and Magistretti 1994, Magistretti 2006).



Adapté à partir de Magistretti 2006 et Bélanger et al. 2011

Figure 5 : Couplage métabolique et modèle de la navette astrocyte-neurone du lactate.

Les astrocytes couplés aux synapses glutamatergiques sont capables de détecter l'augmentation de l'activité neuronale par la recapture du glutamate via leurs récepteurs EAAT, ce neurotransmetteur est réacheminé aux neurones sous forme de glutamine. Les astrocytes, en contact étroit avec les capillaires sanguins transportent le glucose et l'entrepose sous forme de glycogène. En réponse à l'activation neuronale, les astrocytes acheminent le lactate provenant de la glycogénolyse et la glycolyse aux neurones qui l'utilisent pour répondre à leurs besoins énergétiques ou pour la synthèse de glutamate. Abréviations : (ADP) adénosine biphosphate, (ATP) adenosine triphosphate, (GS) glutamine synthase, (GLS) glutamate synthase, (GLUT) Glucose transporter, (EAAT) Excitatory amino acid transporter, (LDH) lactate déshydrogénase, Monocarboxylate transporter (MCT).

Le modèle de l'ANLS est en opposition à l'hypothèse classique qui stipule qu'une augmentation de l'activité neuronale entraîne une augmentation de l'utilisation du glucose à la fois dans les neurones et les astrocytes en augmentant la glycolyse ainsi que l'oxydation aérobie du glucose pour générer de l'ATP. Plusieurs observations *in vitro* et *ex vivo* supportent l'hypothèse de l'ANLS, notamment le fait que les neurones en culture oxydent préférentiellement le lactate en CO₂ plutôt que le glucose. Le lactate est capable de maintenir l'activité synaptique en absence de glucose *ex vivo* (Bouzier-Sore et al. 2003, Itoh et al. 2003, Ivanov et al. 2011). Le profil d'expression des gènes impliqués dans le transport et le métabolisme du lactate dans les astrocytes et les neurones est compatible avec et tend à supporter l'hypothèse de l'ANLS. Les astrocytes expriment MCT1, l'isoforme associée à l'export du lactate, tandis que les neurones expriment MCT2, associée au transport intracellulaire (Broer et al. 1997, Baltan 2015). De plus, les astrocytes expriment LDH5, conversion du pyruvate en lactate, tandis que les neurones expriment LDH1 qui catalyse la réaction inverse (Bittar et al. 1996).

Cette hypothèse est aussi supportée via plusieurs études *in vivo* montrant que le lactate est suffisant pour soutenir l'activité neuronale en hypoglycémie sévère et qu'il peut même être oxydé de façon préférentielle par rapport au glucose (Wyss et al. 2011). D'autres études suggèrent que l'apport de lactate vers les neurones, plutôt que le glucose, est un processus important de la « Long Term Potentiation » (LTP) chez le rat. Ces études montrent que l'inhibition de l'ANLS, par l'inhibition de l'export de lactate par les astrocytes ou par l'inhibition de sa capture par les neurones, inhibe la LTP et la formation de la mémoire à long terme chez les animaux (Newman et al. 2011, Suzuki et al. 2011). Ces observations sont supportées par une étude plus récente montrant une restauration du conditionnement opérant par une infusion de lactate dans l'amygdale basolatérale lorsque l'ANLS est inhibé au niveau de la glycogénolyse dans cette région (Boury-Jamot et al. 2016).

III.1.2 Corps cétoniques

Tout comme le lactate, les neurones peuvent oxyder des corps cétoniques pour soutenir leur activité électrique (Izumi et al. 1998). Par contre, il semblerait que les corps cétoniques ne soient métabolisés que dans certaines conditions de déficit énergétique ou durant le développement néonatal. Cette dernière est une période de transition qui est caractérisée par un changement drastique dans la disponibilité des différents nutriments. Les nouveau-nés passent d'un apport constant de glucose et

faible en acides gras, à un apport discontinu de lait maternel riche en acides gras et pauvre en glucose. Dans ces conditions, les corps cétoniques deviennent la principale source d'énergie pour les neurones (Cotter et al. 2011). Ceci est supporté par des observations *ex vivo* sur des explants de rats postnataux, où certains corps cétoniques comme le β -hydroxybutyrate (BHB) sont suffisants pour le maintien de l'activité neuronale d'explants provenant de rats âgés de 15 jours, mais pas de rats âgés de 30 jours (Izumi et al. 1998). En effet, les corps cétoniques, principalement produits par le foie, sont transportés à travers la BBB par le transporteur MCT1. De plus le transport de BHB vers le cerveau est augmenté d'environ 7 fois durant la période périnatale (Morris 2005) probablement due au niveau d'expression du transporteur MCT1, jusqu'à 25 fois plus élevée durant cette période qu'à l'âge adulte (Leino et al. 1999).

Bien que le foie semble être la principale source de corps cétoniques pour le cerveau, les astrocytes ont aussi la capacité de les synthétiser à partir d'acides gras ou de leucine (Auestad et al. 1991, Bixel and Hamprecht 1995). Cette production de corps cétoniques pourrait être dédiée à leur oxydation dans les neurones. Ceci est corroboré par des études montrant que les astrocytes sont les principaux utilisateurs des acides gras dans le cerveau (Edmond et al. 1987, Edmond 1992) et que la majorité de ces acides gras sont destinés à la production de corps cétoniques dans des conditions de pénurie de glucose et d'hypoxie (Takahashi et al. 2014). La navette des corps cétoniques serait donc un mécanisme mis en place pour protéger les neurones d'une déficience énergétique associée au manque de glucose ainsi qu'à l'hypoxie. Contrairement au glucose et au lactate, la production de BHB dans les astrocytes et son oxydation dans les neurones ne sont pas inhibés durant par l'hypoxie (Blazquez et al. 1999). Les corps cétoniques peuvent être considérés comme des facteurs neuroprotecteurs en agissant en tant que source d'énergie alternative.

III.2 Synapse tripartite

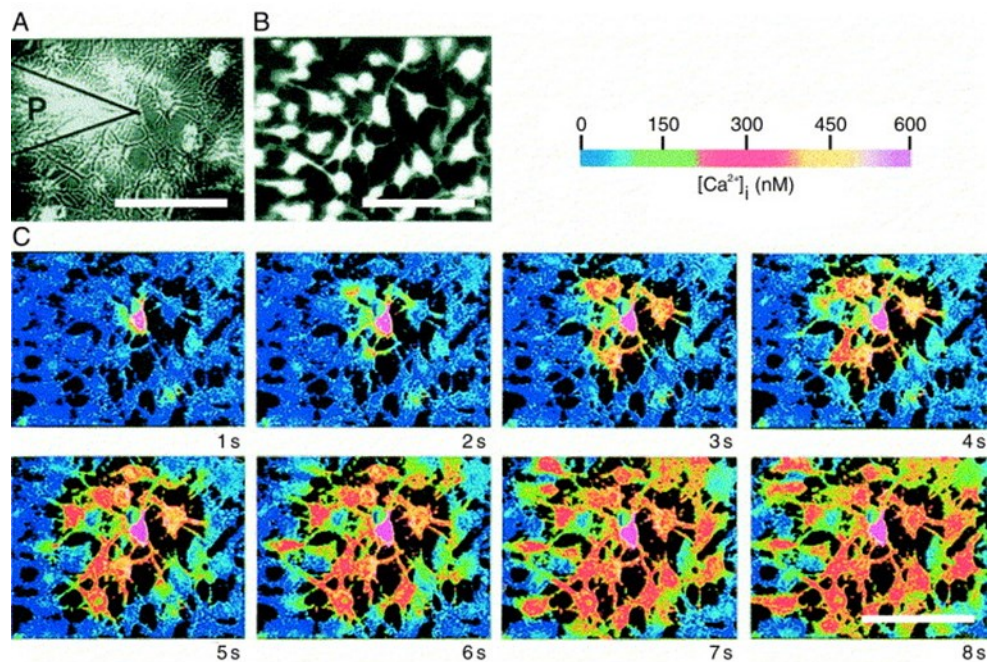
Plusieurs données s'accordent sur un rôle plus important des astrocytes qu'un simple support physique et métabolique aux neurones. Les premières démonstrations d'une implication astrocytaire dans les processus signalétiques sont relativement récentes. Ces études montrent que des astrocytes sont sensibles au neurotransmetteur glutamate et que ce dernier pouvait induire des oscillations de calcium dans ces astrocytes (Cornell-Bell et al. 1990, Cornell-Bell and Finkbeiner 1991). Suite à ces

études séminales, plusieurs autres ont contribué à montrer une forme de communication entre les neurones et les astrocytes. Ce n'est qu'en 1999, près de 10 ans suivant la première démonstration d'une forme de signalisation neurone-astrocyte, que Haydon et Araque ont proposé pour la première fois le modèle de la synapse tripartite (Araque et al. 1999). Ce nouveau modèle de la synapse inclut les terminaisons pré- et postsynaptiques ainsi qu'un astrocyte qui forme une gaine autour de cette synapse (Araque et al. 1999).

Traditionnellement, les astrocytes n'étaient pas considérés comme des cellules excitables au même titre que les neurones puisqu'elles n'ont pas d'activité électrique, ne pouvaient pas être stimulées et propager des AP. Par contre, des données subséquentes suggèrent que les astrocytes peuvent être excités par divers stimuli, incluant une stimulation mécanique ainsi que par la relâche d'ion calcium intracellulaire. Dans le cas du Ca^{++} , ce signal peut se propager aux astrocytes voisins via les jonctions gap à l'extrémité de leurs prolongements cf. Figure 6 (Charles et al. 1991, Araque et al. 1999). Ces oscillations du calcium intracellulaire sont essentielles à la communication astrocyte-neurone ainsi qu'entre astrocytes. Ces oscillations de calcium peuvent avoir lieu de façon spontanée *in vivo*, toutefois, ces événements spontanés sont rares (Wang, Lou, et al. 2006). En effet, ces oscillations de calcium sont généralement stimulées suite à une activation neuronale (Wang, Lou, et al. 2006) et seraient à la base de l'excitabilité des astrocytes (Zorec et al. 2012). L'activation d'un astrocyte serait donc médiée par la libération des stocks de Ca^{++} contenus dans le réticulum endoplasmique en réponse à l'activation des récepteurs de l'inositol triphosphate (Hua et al. 2004).

Par contre, l'excitabilité de ces cellules n'est pas suffisante pour les considérer comme des éléments actifs dans le CNS. Pour être considéré comme des cellules capables de signalisation, les astrocytes doivent satisfaire trois conditions principales : 1- ils doivent être en mesure de recevoir de l'information sous forme d'un signal tel un neurotransmetteur comme le glutamate, 2- ils doivent être en mesure d'intégrer cette information et 3- de transmettre cette information à d'autres cellules (Perea et al. 2014). Plusieurs données existent montrant que les astrocytes satisfont ces différentes exigences et peuvent être considérés comme des cellules actives dans le cerveau. Les astrocytes sont capables de détecter la relâche de plusieurs neurotransmetteurs incluant le glutamate et le GABA, montrant ainsi leur capacité à recevoir des signaux (Cornell-Bell et al. 1990, Zorec et al. 2012). De plus, ces derniers sont capables de différencier les signaux en provenance de différentes régions du cerveau, montrant une capacité à intégrer ces signaux (Perea and Araque 2005). Finalement, ils sont

capables de sécréter différentes substances neuroactives pour moduler l'activité neuronale (Araque, Parpura, et al. 1998, Araque, Sanzgiri, et al. 1998). Bien que le concept de la synapse tripartite dans lequel l'astrocyte joue un rôle fonctionnel soit bien accepté, il ne s'applique pas nécessairement à toutes les synapses. Certaines données de microscopie électronique montrent que dans l'hippocampe, seulement 40 % des synapses seraient enveloppées par un prolongement astrocytaire (Witcher et al. 2010).



Reproduit avec la permission de Charles et al. 1991, Araque et al. 1999

Figure 6 : Propagation de l'activation d'astrocytes par le Ca^{++} .

Des astrocytes en cultures sont capables de communiquer un signal d'activation aux astrocytes voisins via leurs prolongements. (A) Image en contraste de phase montrant la stimulation mécanique d'un seul astrocyte à l'aide d'une micropipette (P). (B) Image en fluorescence de ces mêmes astrocytes suite à l'addition d'un marqueur fluorescent fura-2 excité à 380 nm. (C) Visualisation de la relâche intracellulaire de $[Ca^{2+}]_i$ tel que visualisé par la longueur d'onde d'émission du marqueur fura-2 à des intervalles d'une seconde. Barre d'échelle à 100 μm .

Les astrocytes ont plusieurs fonctions essentielles au bon fonctionnement de la synapse. Les astrocytes préviennent l'excitotoxicité, du a la sur activation des neurones postsynaptiques, par la recapture et le recyclage du glutamate. Ils maintiennent l'homéostasie ionique de la fente synaptique

pour maintenir ou restaurer la polarité des membranes. Ils modulent l'activité de la synapse via la relâche de gliotransmetteurs. Finalement, ils isolent la synapse à laquelle ils sont associés en l'enveloppant pour prévenir la fuite de neurotransmetteurs et l'activation de synapses avoisinantes (Panatier et al. 2014). Plusieurs de ces fonctions sont aussi représentées dans la Figure 5.

III.2.1 Recapture du glutamate

Une des fonctions de l'astrocyte dans la synapse est la recapture du glutamate. Le glutamate est le principal neurotransmetteur activateur du cerveau et une surabondance de ce neurotransmetteur peut entraîner une excitotoxicité soit une surexcitabilité des neurones et entraîner la mort cellulaire. Cette recapture du glutamate par les astrocytes permet aussi de prévenir les fuites de neurotransmetteurs vers les synapses avoisinantes ainsi que de réguler la durée de l'activation de la synapse (Tilleux and Hermans 2007). La recapture astrocytaire du glutamate est couplée au transport d'ions sodium et potassium via les « Excitatory Amino Acid Transporter » (EAAT) dont les deux principaux, EAAT 1 et 2 sont principalement exprimés dans les cellules gliales. EAAT 1 et 2 sont aussi connus en tant que glutamate aspartate transporter (GLAST) et glutamate transporter-1 (GLT-1) (Rothstein et al. 1994, Domercq et al. 2005). La recapture du glutamate par GLAST et GLT-1 permet le maintien des concentrations synaptiques de glutamate en dessous du seuil d'activation (25 nM). GLAST et GLT-1 ont un rôle dans la capture du glutamate et n'agissent pas en tant que récepteur du glutamate. C'est-à-dire que la capture du glutamate par ces transporteurs n'est pas associée à l'activation de l'astrocyte. Des défauts dans la recapture du glutamate sont associés à plusieurs pathologies neurologiques dont l'épilepsie (Tilleux and Hermans 2007).

Une fois transporté, le glutamate peut être converti en glutamine avant d'être réacheminé vers les neurones pour restaurer leurs réserves de neurotransmetteurs (Hertz et al. 1999) ou pour la synthèse du GABA (Hertz et al. 1999). Les neurones dépendent de la glutamine provenant des astrocytes pour la synthèse du glutamate puisque sa synthèse *de novo* à partir du glucose épuise les intermédiaires du cycle du « Tricarboxylic Acid » (TCA) (Coulter and Eid 2012). Les astrocytes, contrairement aux neurones, peuvent restaurer ces intermédiaires via la conversion du pyruvate, issu de la glycogénolyse et la glycolyse, en oxaloacétate (Shank et al. 1985). Le transport du glutamate par

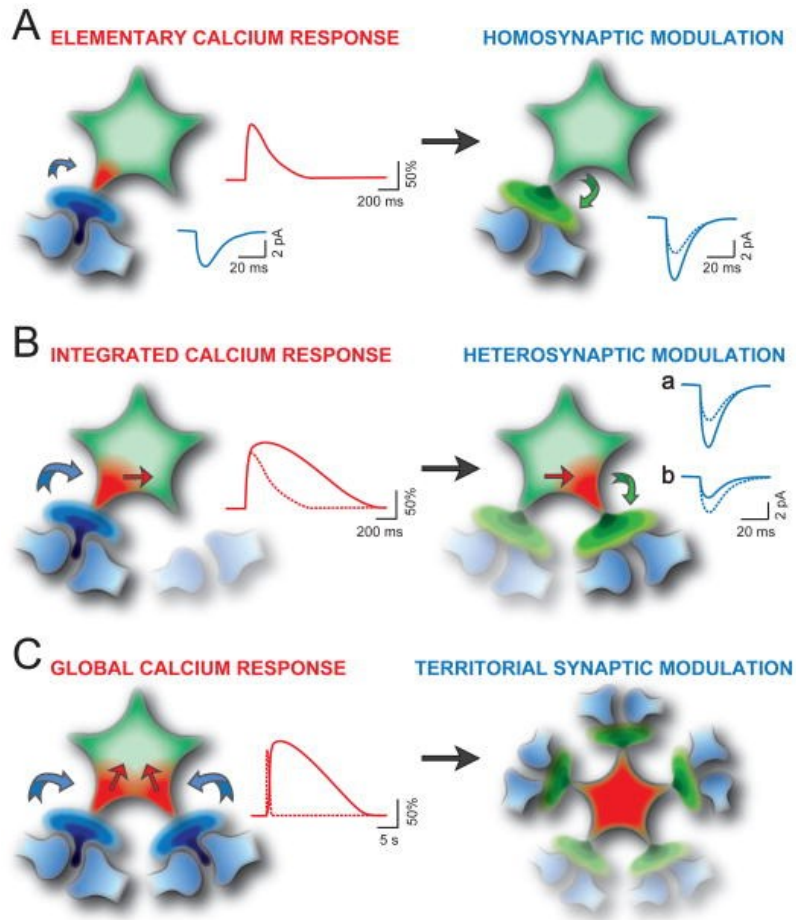
GLAST et GLT-1 est couplé à des processus générant de l'ATP, comme la dégradation du glycogène et la glycolyse. Le glutamate peut aussi être oxydé dans la mitochondrie pour générer de l'ATP ou du lactate destiné aux neurones (Westergaard et al. 1995, Robinson and Jackson 2016). De plus, cette recapture du glutamate par les astrocytes est à la base de l'hypothèse de l'ANLS (Pellerin and Magistretti 1994). Finalement, le glutamate peut aussi être sécrété dans le milieu extracellulaire pour moduler l'activité neuronale (Araque, Parpura, et al. 1998).

III.3 Gliotransmission

Les astrocytes sont capables de communication bidirectionnelle avec les neurones. Cette gliotransmission est basée sur la capacité d'un astrocyte périssynaptique à détecter la relâche de neurotransmetteurs, d'augmenter ses niveaux de calcium intracellulaire et libérer un gliotransmetteur pour moduler l'activité neuronale (Santello et al. 2012). Le concept de gliotransmission est donc étroitement lié au concept de la synapse tripartite (Araque, Parpura, et al. 1998, Araque et al. 2014). Un exemple de modulation de l'activité neuronale est observé dans un modèle de co-culture d'astrocytes et de neurones de l'hippocampe. La stimulation d'un seul astrocyte diminue l'amplitude des « Excitatory Postsynaptic Current » (EPSC) des neurones adjacents de manière transitoire (Araque, Sanzgiri, et al. 1998). Cette modulation de l'activité neuronale peut se faire au niveau de la synapse ou via des récepteurs extrasynaptiques.

Des exemples de modulation extrasynaptiques de l'activité neuronale par les astrocytes sont les « slow inward currents » (SIC), événements excitateurs et les « slow outwards currents » (SOC), événements inhibiteurs (Pál 2015). L'activation d'astrocytes dans l'hippocampe produit des SIC dans les neurones avoisinants, ce qui entraîne une synchronisation de ces neurones. Ces SIC sont produit suite à l'activation de récepteur du glutamate de type N-méthyl-D-aspartate (NMDA) à des sites extrasynaptiques (Angulo et al. 2004, Fellin et al. 2004). Les SOC sont aussi des événements extrasynaptiques. Ils peuvent être générés par la sécrétion de GABA par les astrocytes. Une stimulation mécanique d'astrocytes provoque une augmentation de la fréquence des SOC. Tout comme pour les SIC, les SOC ne sont pas affectés par l'inhibition de la transmission synaptique ou de l'activité neuronale (Kozlov et al. 2006, Jiménez-González et al. 2011).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la sécrétion de gliotransmetteurs, incluant l'exocytose de vésicules sécrétoires ou de lysosomes ainsi que l'inversion du transport par les transporteurs du glutamate (Perea et al. 2009). Les processus astrocytaires à proximité des synapses contiennent des petites vésicules sécrétoires (Bezzi et al. 2004, Jourdain et al. 2007). De plus, les astrocytes possèdent la machinerie cellulaire nécessaire à la sécrétion vésiculaire incluant les différentes protéines du complexe SNARE (Montana et al. 2006) et la sécrétion de glutamate induite par le Ca^{++} est inhibée par les inhibiteurs de l'exocytose. La relâche de gliotransmetteur, quelque soit le mécanisme de sécrétion, est presque toujours initiée par un événement synaptique voisin et est accompagnée d'une élévation des niveaux intracellulaires de Ca^{++} dans l'astrocyte (Bezzi et al. 1998). L'astrocyte peut alors moduler l'activité de la synapse initiale (modulation homosynaptique), d'une synapse adjacente (modulation hétérosynaptique), ou de l'ensemble des synapses dans son domaine (modulation territoriale), ces différents modes de gliotransmission sont résumés à la Figure 7 (Araque et al. 2014).



Reproduit avec la permission de Araque et al. 2014

Figure 7 : Différents modes de modulation de l'activité synaptique par les astrocytes.

Les astrocytes sont capables de moduler l'activité synaptique via la relâche de gliotransmetteurs qui peuvent agir sur le neurone présynaptique, postsynaptique à des sites intra ou extra synaptiques. Cette communication astrocyte-neurone, ou gliotransmission, débute généralement par une augmentation du Ca^{++} dans l'astrocyte suite à la détection d'une activité synaptique et entraîne la relâche de gliotransmetteurs. Cette gliotransmission peut moduler l'activité synaptique du neurone initial (A) modulation homosynaptique, d'un neurone adjacent (B) hétérosynaptique, ou de plusieurs neurones dans le domaine/territoire de l'astrocyte impliqué (C) territorial.

Les astrocytes sécrètent une variété de gliotransmetteurs pour moduler la transmission synaptique. Ils peuvent sécréter des acides aminés, comme le glutamate et la D-sérine, des dérivés d'acides aminés comme le GABA, des acides nucléiques comme l'ATP ou l'adénosine, ainsi que des peptides et

cytokines comme Tumor Necrosis Factor (TNF) α , IL-1. Parmi les gliotransmetteurs les mieux caractérisés, on retrouve le glutamate et le GABA (Hamilton and Attwell 2010, Pál 2015). Ces deux gliotransmetteurs sont les deux principaux neurotransmetteurs activateur et inhibiteur respectivement, mais sont aussi sécrétés par les astrocytes et peuvent être considérés comme gliotransmetteurs.

III.3.1 Acides aminés

III.3.1.1 Glutamate

Le glutamate est le principal neurotransmetteur activateur du CNS. Le glutamate est aussi considéré comme un gliotransmetteur puisqu'il peut aussi être sécrété par les astrocytes en réponse à l'élévation du calcium intracellulaire. Une des premières études sur la sécrétion astrocytaire du glutamate utilise un système de co-culture astrocytes-neurones. La stimulation d'un seul astrocyte dans ces cultures provoque l'activation des neurones voisins via le récepteur NMDA (Parpura et al. 1994). Le glutamate agit via l'activation de différents récepteurs du glutamate qui peuvent être classifiés en deux catégories principales. On retrouve les récepteurs à canaux ioniques et que les récepteurs métabotropiques. Les récepteurs à canaux ioniques sont subdivisés en trois catégories nommées à partir de leurs agonistes, soit les récepteurs sensibles au NMDA, au α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate (AMPA) et au kainate. Les « metabotropic Glutamate Receptors » (mGluR) sont aussi divisés en trois groupes, soit groupe I, II et III (Kew and Kemp 2005, Pleasure 2008).

Le glutamate sécrété par les astrocytes peut agir sur les neurones pour augmenter leur excitabilité, comme observé dans des tranches *ex vivo* d'hippocampe où l'activation d'un astrocyte entraîne la relâche de glutamate pour synchroniser plusieurs neurones adjacents (Angulo et al. 2004). Ce gliotransmetteur peut aussi potentialiser la transmission synaptique via l'activation des récepteurs NMDA extrasynaptique (Araque, Sanzgiri, et al. 1998, Jourdain et al. 2007). Le glutamate module l'activité neuronale en fonction du récepteur sur lequel il agit. L'activation du récepteur présynaptique mGluR I augmente la fréquence des EPSC spontanés ainsi qu'évoqués pour

potentialiser la transmission synaptique (Perea and Araque 2010). À l'inverse, l'activation de mGluR II et III augmente la fréquence des « Spontaneous Inhibitory Postsynaptic Current » (sIPSC) pour inhiber la transmission synaptique (Liu et al. 2004). Le glutamate peut aussi agir sur les récepteurs postsynaptiques pour activer ou synchroniser plusieurs neurones. Cette activation des NMDAR postsynaptique par n'est pas bloquée par l'inhibition de la relâche neuronale de neurotransmetteurs, indiquant que le glutamate est bel et bien d'origine astrocytaire (Angulo et al. 2004).

Les astrocytes peuvent sécréter le glutamate par transport inversé, un processus impliquant l'inversion du transport glutamate par les EAAT (Szatkowski et al. 1990). Le glutamate serait aussi sécrété par une voie plus traditionnelle impliquant les vésicules sécrétoires (Parpura and Zorec 2010). En effet, des observations en microscopie électronique ainsi que par immunofluorescence révèlent une association particulière de VGLUT 1 et 2 avec des vésicules sécrétoires dans les astrocytes et la présence de protéines du complexe SNARE (Hepp et al. 1999, Bezzi et al. 2004).

III.3.1.2 D-sérine

Les astrocytes peuvent sécréter un autre acide aminé pour moduler l'activité neuronale. La D-sérine n'est pas un acide aminé conventionnel étant donné sa configuration chirale « D » plutôt que « L ». Les acides aminés "D" sont généralement retrouvés chez les bactéries et peuvent être absorbés dans l'alimentation. Ils peuvent aussi être synthétisés, généralement à partir de leur équivalent « L ». La D-sérine peut être synthétisée dans les cellules gliales via la conversion de la L-sérine par la sérine racémase (Wolosker et al. 1999). La D-sérine est synthétisée et sécrétée par les astrocytes suite à l'activation des récepteurs astrocytaires du glutamate (Mothet et al. 2005, Martineau et al. 2006). Celle-ci est sécrétée et agit en tant que co-activateur du récepteur NMDA et potentialise son activation par le glutamate. Le retrait sélectif de la D-sérine par sa dégradation diminue l'activité des NMDAR. À l'inverse, l'addition exogène de D-sérine augmente l'activité de ce récepteur (Mothet et al. 2000). Comme plusieurs autres gliotransmetteurs, la relâche de D-sérine est initiée suite à l'élévation des concentrations de Ca^{++} intracellulaire, cette dernière peut ainsi lier NMDAR sur le neurone postsynaptique pour moduler la LTP (Yang et al. 2003, Mothet et al. 2005, Panatier et al. 2006). Une étude plus récente montre une augmentation de l'amplitude des EPSC des neurones du cortex préfrontal suite à la relâche de D-sérine gliale (Fossat et al. 2012). La terminaison du signal généré par ce

gliotransmetteur n'est pas élucidée, mais certaines études suggèrent que sa dégradation par la D-amino acid oxidase est impliquée dans ce processus (Pilone 2000).

III.3.2 GABA

L'acide γ -aminobutyrique ou GABA est un neurotransmetteur inhibiteur pouvant être sécrété par des astrocytes comme gliotransmetteurs (Jacob et al. 2008). Ce gliotransmetteur, comme le glutamate, agit sur deux classes de récepteurs membranaires soit les récepteurs ionotropiques et métabotropiques. Le GABA est synthétisé dans les astrocytes à partir du glutamate via sa décarboxylation enzymatique (Yoon et al. 2012, Schousboe et al. 2013). Les astrocytes peuvent alors sécréter ce gliotransmetteur inhibiteur pour inhiber l'activité neuronale. Ceci a été montré en exposant des neurones à un milieu conditionné par des astrocytes hippocampaux. Ce milieu était capable d'inhiber l'activité neuronale de façon similaire à l'application de GABA sur ces cellules. Les auteurs ont confirmé par chromatographie de masse que cette « substance inhibitrice » était bel et bien le GABA (Jow et al. 2004).

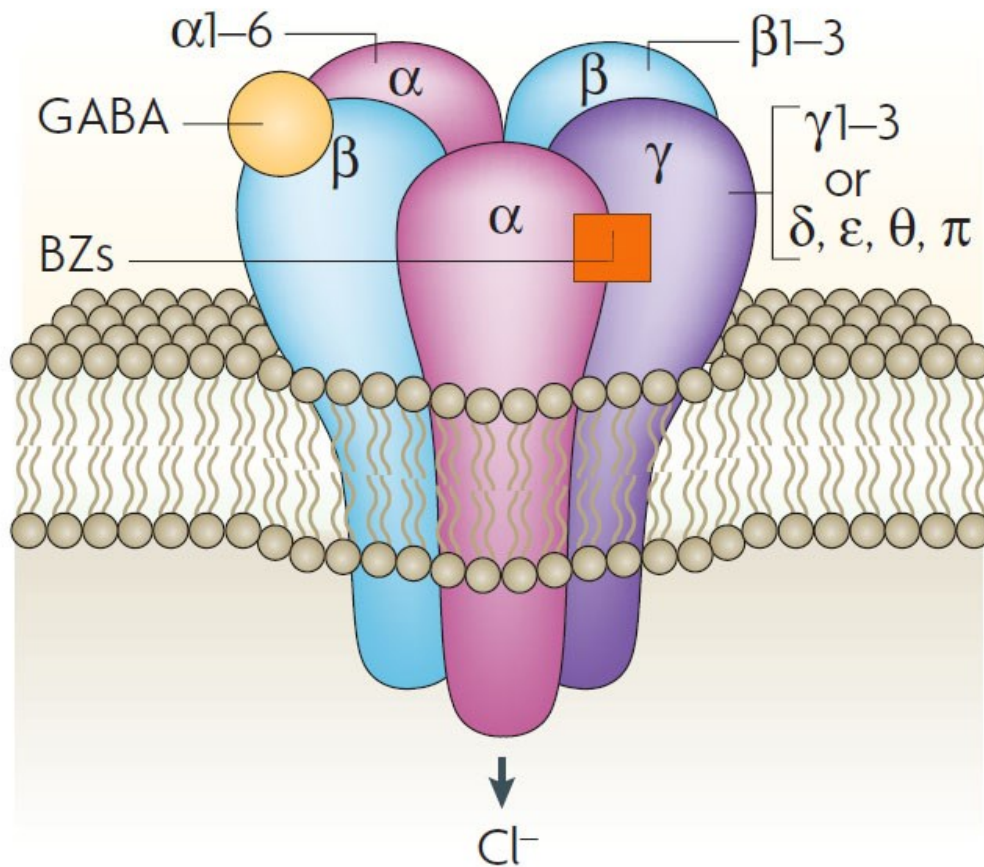
La plupart des neurones de l'hippocampe reçoivent des signaux astrocytaires excitateurs via le glutamate ainsi qu'inhibiteurs via GABA. Ces signaux sont mesurés en présence de Tétridotoxine, un inhibiteur de la transmission synaptique, confirmant l'origine gliale de ces signaux (Le Meur et al. 2012).

Comme le GABA sécrété par les neurones, le GABA astrocytaire est un transmetteur inhibiteur. Ainsi, des astrocytes du bulbe olfactif peuvent inhiber des neurones dans un système de culture d'explants via l'activation du récepteur GABA_A pour produire des SOC. Ces courants inhibiteurs sont observés de façon simultanée dans plusieurs neurones à proximité, suggérant une synchronisation de ces neurones par un astrocyte (Kozlov et al. 2006). De plus, cette inhibition est bel et bien d'origine gliale et non neuronale puisqu'elle est observée en présence de TTX dans un système d'explants. Contrairement à d'autres gliotransmetteurs, comme le glutamate, le GABA ne serait pas sécrété par exocytose de vésicules sécrétoires. Certaines données, notamment dans les cellules gliales de Bergmann, suggèrent que la sécrétion de GABA par les astrocytes passe exclusivement via les transporteurs GAT ou GABA transporteurs (Barakat and Bordey 2002).

III.3.2.1 Les récepteurs GABA

Les différents récepteurs du GABA peuvent être classifiés en trois classes, les récepteurs A, B et C. Le récepteur de type A est un récepteur ionotropique tandis que le récepteur de type B est une GPCR. Finalement le récepteur de type C est considéré par plusieurs comme un sous-type du récepteur GABA_A (Barnard et al. 1998). Les récepteurs GABA sont présents à la fois au niveau des neurones pré- et post-synaptiques. Le récepteur GABA_A est un canal ionique hétéropentamérique. La combinaison des différentes sous-unités du récepteur varie en fonction du type cellulaire et la région dans laquelle il est exprimé. Le récepteur GABA_A est formé par l'assemblage de cinq sous-unités parmi huit différentes familles soit les sous-unités α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , π , θ et ρ_{1-3} (Mehta and Ticku 1999). L'assemblage le plus commun du récepteur GABA_A est celui composé de deux sous-unités α et β en alternance, ainsi qu'une sous unité γ (Jacob et al. 2008). Cette forme du récepteur GABA_A est représentée dans la Figure 8. La liaison du GABA à ce récepteur entraîne l'ouverture du canal ionique transmembranaire et permet l'entrée d'ion Cl⁻. Ceci a pour effet d'hyperpolariser les membranes et bloque la dépolarisation nécessaire à l'activation neuronale. Le profil inhibiteur de la transmission GABA est observé uniquement dans les neurones matures tandis que dans les premières étapes du développement du cerveau, ce signal est activateur. Ceci est dû au fait que les neurones immatures n'expriment pas de cotransporteur potassium chlorure fonctionnel permettant un maintien du gradient ionique nécessaire à la polarité membranaire. L'ouverture du canal ionique du récepteur GABA_A dans ces conditions permet la sortie des ions Cl⁻ et provoque ainsi une dépolarisation au lieu d'une hyperpolarisation (Kirmse et al. 2015).

GABA_A receptor



Reproduit avec la permission de Jacob et al. 2008

Figure 8 : Schéma représentant l'assemblage le plus commun du récepteur GABA_A.

Représentation de l'assemblage le plus courant des 5 sous-unités formant le récepteur GABA_A soit deux sous-unités α et deux β en alternance, et une sous-unité γ. Les sites de liaisons de GABA, à l'interface des sous-unités α et β, ainsi que des benzodiazépines à l'interface α et γ sont représentés respectivement par le cercle jaune (GABA) et le carré orange (benzodiazépines). La liaison du GABA cause l'ouverture du canal ionique pour permettre l'entrée de l'ion Cl⁻ tandis que la liaison des benzodiazépines potentialise l'effet du GABA. Abréviations: (GABA) acide γ-aminobutyrique, (BZ) benzodiazépines (Cl⁻) ion chlorure.

Le récepteur GABA_B est une GPCR ou récepteur métabotrope. Bien que certains GPCR forment des homodimères, GABA_B est le premier récepteur de ce type à être identifié sous une forme

hétérodimérique composée de deux sous unités différentes, soit le récepteur B1 et B2 (Marshall et al. 1999). Le récepteur GABA_B est généralement couplé aux protéines G α_i (Bowery et al. 2002). GABA_B peut exercer son effet inhibiteur à la fois au niveau pré- et post-synaptique par deux mécanismes principaux. Le premier implique l'inhibition de l'adénylate cyclase et le deuxième implique une modulation de la conductance membranaire en modulant l'activité des canaux ioniques Ca⁺⁺ et K⁺ (Bowery et al. 2002, Gassmann and Bettler 2012).

III.3.3 ATP/Adénosine

L'ATP est la molécule énergétique par excellence de l'organisme. Par contre, elle peut aussi agir comme molécule signalétique. Cet acide nucléique phosphorylé peut agir sur les récepteurs purinergiques au niveau des synapses pour moduler rapidement l'activité neuronale. L'ATP est ainsi être considéré comme un neurotransmetteur (Edwards et al. 1992). Plusieurs données suggèrent que l'ATP sécrétée par les astrocytes est essentielle à la propagation des vagues de Ca⁺⁺ (Figure 6), dans un processus qui semble être dépendent des CXN (Cotrina et al. 1998, Guthrie et al. 1999). L'ATP sécrétée par les astrocytes agit sur les récepteurs des purines, ceux-ci peuvent être classifiés en deux catégories soit les récepteurs des adénosines P1 et récepteurs des purines P2. La sécrétion d'ATP est généralement induite suite à une transmission GABAergique et a pour effet d'inhiber l'activation neuronale de manière hétérosynaptique (voir Figure 7) (Serrano et al. 2006). La sécrétion d'ATP peut avoir différents effets sur la transmission synaptique, elle permet une augmentation de l'amplitude des EPSC dans l'hypothalamus (Gordon et al. 2009) tandis que dans l'hippocampe, l'ATP relâchée par les astrocytes produit une dépression de l'activité synaptique (Perea and Araque 2010).

III.3.4 Peptides

Les astrocytes peuvent sécréter une grande variété de protéines et de peptides. Plusieurs études de protéomique ont identifié plus de 150 protéines ou peptides pouvant être relâchés dans le milieu de culture d'astrocytes primaires (Dowell et al. 2009, Yin et al. 2012). Certains de ces peptides sécrétés par les astrocytes peuvent aussi être considérés comme des gliotransmetteurs. Parmi les peptides

sécrétés par les astrocytes pouvant être considérés comme gliotransmetteurs, le « Atrial natriuretic peptide » (ANP) et « Brain Derived Neurotropic Factor » (BDNF) sont les peptides les plus étudiés (Parpura and Zorec 2010).

L'ANP est un peptide diurétique et vasorelaxant qui est sécrété par les myocytes en réponse à une augmentation du volume sanguin ou à une déficience en oxygène (Baertschi et al. 2001). Dans le cerveau, ce peptide est généralement associé à régions associées à l'olfaction, à la régulation de la pression artérielle et de la balance électrolytique. Des études immunologiques chez l'humain montrent une expression dans plusieurs populations de cellules gliales du cortex et du cervelet, dans les astrocytes protoplasmiques, fibreux, Bergmann, ainsi que dans certains neurones (McKenzie et al. 2001). Une autre étude chez l'humain montre une augmentation du nombre d'astrocytes immunoréactif pour ANP suite à un infarctus. Cette augmentation est limitée à la zone du cerveau affectée et n'est pas observée lors d'hémorragies ou de contusions (Nogami et al. 2001). Cette augmentation est compatible avec le rôle de l'ANP dans le contrôle du flux sanguin cérébral. Comme c'est le cas pour les autres gliotransmetteurs, l'élévation des niveaux de Ca^{++} cytoplasmique précède et est essentielle à la sécrétion de l'ANP par les astrocytes (Krzan et al. 2003). La sécrétion de l'ANP par les astrocytes suit la voie classique de synthèse d'un propeptide dans le réticulum endoplasmique (ER) suivie par la maturation du peptide par son clivage pour finalement être sécrété dans par la fusion de vésicules sécrétoires à la membrane cytoplasmique (Dannies 1999).

BDNF fait partie de la famille des neurotrophines, des molécules ayant plusieurs rôles dans la survie des cellules neuronales en agissant en tant que facteur pro-survie (facteur trophique), dans la croissance axonale. BDNF semble aussi jouer un rôle dans le devenir cellulaire de certaines populations neuronales (Eide et al. 1993). La sécrétion de BDNF par les astrocytes peut se faire de plusieurs façons, il peut être synthétisé dans les neurones sous forme de propeptide et être sécrété par ces derniers pour être recyclé dans les astrocytes. Ces derniers peuvent ensuite le sécréter à nouveau en réponse à un signal glutamatergique dans le milieu extracellulaire où il sera clivé avant de lier son récepteur (Bergami et al. 2008). Les astrocytes, en plus de recycler le pro-BDNF neuronal, peuvent aussi synthétiser et sécréter BDNF en réponse à différents stimuli (Takemoto et al. 2015). Le BDNF est sécrété via la voie classique de sécrétion des neuropeptides et gliopeptides en réponse à l'augmentation des niveaux de calcium intracellulaire (Stenovec et al. 2015). La sécrétion de BDNF peut aussi être induite par la présence de facteurs neuronaux, l'exposition de cultures primaires

d'astrocytes à la des neurones en culture a ainsi pour effet d'augmenter les niveaux d'expression de ce peptide et de stimuler sa sécrétion. De plus, les astrocytes sécrètent BDNF suite à des lésions neuronales induites par le kainate (Rudge et al. 1995). BDNF est aussi capable de moduler ou de potentialiser la transmission synaptique. Lorsqu'il est ajouté à des cultures primaires, BDNF est capable de potentialiser la transmission synaptique de la synapse neuromusculaire (Lohof et al. 1993). En tant que gliotransmetteur, BDNF peut agir sur diverses cibles neuronales pour moduler leur activité. Ceci peut inclure les récepteurs du glutamate de type NMDA (Mizuno et al. 2003) et AMPA (Li et al. 1998) dans l'hippocampe et moduler l'excitabilité de ces neurones pour affecter la LTP. De plus, BDNF peut inhiber la transmission GABA à des sites post-synaptiques, ce qui résulte en une augmentation de la fréquence des AP (Tanaka et al. 1997, Henneberger et al. 2002).

III.3.5 Cytokines

Les astrocytes sécrètent aussi différentes cytokines qui peuvent être considérées comme gliotransmetteurs. Parmi les cytokines considérées comme gliotransmetteurs, on retrouve TNF α et IL-1. Suite à différents stressés, comme un stress physique ou ischémique, les niveaux de TNF α et d'IL-1 sécrétés par des astrocytes en culture dans le milieu augmentent rapidement (Lau and Yu 2001). Ceci suggère que ces cytokines dérivées des cellules gliales peuvent avoir un effet sur d'autres types cellulaires dans le cerveau.

Plusieurs études sur des cultures de neurones d'hippocampe ainsi que des co-cultures d'astrocytes et de neurones, suggèrent que la cytokine TNF α peut agir sur la transmission synaptique en modulant la densité des récepteurs du glutamate AMPA et GABA_A sur les neurones en culture (Beattie et al. 2002, Stellwagen et al. 2005). Ces études suggèrent que le TNF α sécrété par les astrocytes augmente la force ainsi que la fréquence des événements synaptiques excitateurs ou EPSC en augmentant le nombre de récepteurs AMPA et inversement en diminuant la densité des récepteurs GABA_A. Cette action positive sur la transmission synaptique est corroborée par des études sur des cultures d'explants, ces études montrent que cette cytokine peut moduler à la hausse, à la fois les courants synaptiques évoqués et spontanés (Tancredi et al. 1992, Grassi et al. 1994). La modulation des EPSC par TNF α serait due à sa relâche par les astrocytes, tel que démontré par l'inactivation astrocytaire et/ou neuronale de cette cytokine (Stellwagen and Malenka 2006). TNF α peut aussi avoir un rôle

important dans la relâche du glutamate astrocytaire et ainsi la modulation des EPSC dans certaines synapses de l'hippocampe (Santello et al. 2011).

Une des premières études sur l'effet de IL-1 sur l'activité cérébrale porte sur son action sur l'activité neuronale, mesurée par électro-encéphalogramme, lors du sommeil lent ou sommeil profond (Tobler et al. 1984). L'implication de L'IL-1, particulièrement IL-1 β , a depuis été relativement bien caractérisée. L'administration d'IL-1 β exogène dans le cerveau peut produire les mêmes caractéristiques d'un sommeil profond ou sommeil avec l'absence de mouvements rapides des yeux, de plus son inactivation par l'utilisation d'anticorps dirigé contre cette cytokine ou l'administration d'antagoniste du récepteur d'IL-1 inhibe cette phase du sommeil (Krueger 2008, Taishi et al. 2012). De plus, une étude chez le rat suggère que l'interleukine 1- β peut moduler l'activité neuronale via une action directe sur le neurone, renforçant l'idée que cette cytokine puisse agir en tant que gliotransmetteur (Lukats et al. 2005).

Les astrocytes, via cette communication bidirectionnelle avec les neurones, sont capables de moduler l'activité de ces derniers. Cette modulation de l'activité neuronale ouvre la porte à un contrôle par les astrocytes de divers processus comportementaux essentiels comme le sommeil, l'apprentissage, ainsi que des comportements alimentaires.

III.4 Rôle des astrocytes dans le comportement

III.4.1 Sommeil et la mémoire

Le premier à proposer un rôle des astrocytes dans la régulation du sommeil est Ramon y Cajal, il a proposé que les processus astrocytaires puissent s'insérer entre les processus pré et post-synaptiques pour initier le sommeil (Frank 2013). Les mécanismes précis d'initiation du sommeil ne sont pas encore bien compris. Certains ont proposé que les diminutions des réserves astrocytaires de glycogène servant à supporter l'activité neuronale initient le sommeil. Les réserves de glycogènes seraient alors rétablies avant le réveil (Benington and Heller 1995). D'autres hypothèses impliquent la relâche cumulative de gliotransmetteurs comme l'adénosine qui aboutirait en une initiation du sommeil (Halassa et al. 2009). Certains suggèrent que le gliotransmetteur impliqué dans l'initiation du

sommeil est l'adénosine sécrétée par les astrocytes agit sur les récepteurs de type A1 au niveau des neurones (Blutstein and Haydon 2013). Bien que Cajal ait fait ces premières observations sur le rôle des astrocytes dans le sommeil il y a déjà plus de 120 ans, nous n'avons pas de réponse définitive à cette question. De nouvelles données pointent vers cette hypothèse de changements morphologiques des astrocytes au niveau de la synapse. Les auteurs suggèrent que durant l'état d'éveil, les astrocytes sont fortement associés aux synapses pour éliminer le glutamate de la fente synaptique tandis qu'ils se « rétractent » pour permettre une fuite de ce neurotransmetteur qui entraîne la synchronisation neuronale caractéristique du sommeil (Bellesi et al. 2015, Tso and Herzog 2015).

Les astrocytes sont aussi impliqués dans la formation de mémoire à long terme via la facilitation de la LTP dans les neurones de l'hippocampe. La LTP est un processus qui demande de grandes quantités d'énergie aux neurones. Plusieurs données suggèrent que le lactate dérivé des astrocytes est essentiel dans ce processus (Yang et al. 2003, Suzuki et al. 2011). Les astrocytes, via la relâche de divers gliotransmetteurs, sont des composants essentiels à la LTP et la formation de mémoires à long terme. La transmission glutamatergique provenant des astrocytes est particulièrement importante dans ce processus (Moraga-Amaro et al. 2014). Les astrocytes peuvent aussi favoriser la LTP via la relâche de D-sérine, qui potentialise l'activation du récepteur NMDA (Yang et al. 2003).

III.4.2 Contrôle de la prise alimentaire

Comme mentionné précédemment, le contrôle hypothalamique de la prise alimentaire est généralement associé à la modulation de l'activité des neurones orexigènes et anorexigènes de l'ARC. Étant donné la capacité des astrocytes à moduler l'activité neuronale, il est possible que ces derniers puissent activer ou inhiber les circuits neuronaux modulant la prise alimentaire et les dépenses énergétiques. Récemment, plusieurs études ont été réalisées pour déterminer l'implication des astrocytes dans le contrôle de ces circuits neuronaux. L'activation sélective d'astrocytes hypothalamiques entraîne une inhibition des neurones AgRP via la sécrétion d'adénosine. Cette inhibition des neurones orexigènes entraîne une diminution de la prise alimentaire chez la souris (Yang et al. 2015). Ces résultats sont confirmés par une autre étude qui, en utilisant une approche

d'optogénétique, montrent également une inhibition des neurones AgRP via la sécrétion astrocytaire d'adénosine (Sweeney et al. 2016). De plus, ils montrent que cette inhibition de la prise alimentaire est aussi indépendante d'un effet potentiel sur les comportements liés à l'anxiété. D'autres études ont aussi montré que l'activation d'astrocytes hypothalamiques pouvait stimuler la prise alimentaire. En effet, cette équipe montre que l'activation d'astrocytes dans l'ARC active les neurones NPY/AgrP pour augmenter la prise alimentaire (Chen et al. 2016). Ils montrent aussi qu'une inhibition de ces mêmes astrocytes, via l'inhibition de la relâche de Ca^{++} intracellulaire, a un effet inverse et diminue la prise alimentaire. Ceci tend à suggérer l'implication de la sécrétion d'un gliotransmetteur.

Ces études séminales montrent l'implication des cellules gliales, particulièrement des astrocytes, dans la régulation du comportement alimentaire. Par contre, ces approches ne permettent pas de déterminer si différentes populations d'astrocytes sont impliquées dans ce contrôle différentiel de la prise alimentaire ou par quels stimuli ils seraient activés. Comme il a été mentionné dans les sections précédentes, les astrocytes sont fortement impliqués dans le transport des différents nutriments, tels le glucose, les acides gras et les corps cétoniques, dans le cerveau. De plus, il a été proposé que le métabolisme du glucose et des acides gras débute dans les astrocytes avant d'être acheminé vers les neurones, ce qui a été nommé l'hypothèse de la navette astrocyte-neurone. Il est alors envisageable que l'activation astrocytaire et la modulation de la prise alimentaire via la modulation de l'activité neuronale soit initiée par la détection de ces nutriments par les astrocytes. Dans la section suivante, nous allons donc introduire le rôle des astrocytes dans la détection des nutriments ainsi que l'action de ces nutriments dans le SNC, particulièrement les acides gras.

IV Détection astrocytaire des nutriments

Les astrocytes sont étroitement associés à la BBB, les capillaires sanguins dans le cerveau sont presque entièrement recouverts par des prolongements astrocytaires (Kacem et al. 1998), ce qui fait en sorte que les astrocytes sont les premières cellules à avoir accès à la circulation périphérique. Cette association fait des astrocytes des cellules idéales dans la détection des nutriments provenant de la circulation périphérique. De plus, les prolongements astrocytaires sont connectés à leurs extrémités via différentes molécules de jonction gap comme les CXN 30 et 43 pour former un réseau interconnecté capable d'acheminer le glucose vers les régions moins irriguées du parenchyme

cérébral (Rouach et al. 2008). Plusieurs données récentes suggèrent une plus grande importance des cellules gliales de l'hypothalamus, tels les tanocytes et les astrocytes, dans la détection des nutriments (Lee et al. 2012, Garcia-Caceres et al. 2013).

IV.1 Glucose

Dans le cerveau, le transport du glucose se fait majoritairement au niveau des pieds astrocytaires qui sont en contact direct avec l'endothélium de la BBB. Son passage à travers cette membrane est facilité par le transporteur de glucose (GLUT) 1, présent sous deux formes ayant différents poids moléculaires caractérisés par des niveaux différents de glycosylation (Birnbaum et al. 1986). Dans le cerveau, le variant 55 kDa est exprimé exclusivement dans l'endothélium de la BBB tandis que le variant 45 kDa est majoritairement exprimé dans les astrocytes, les épendymocytes ainsi que les membranes du plexus choroïde et de façon très limitée chez les neurones (Simpson et al. 2007). GLUT1 est un transporteur à haute affinité pour le glucose, soit environ 3 mM (Zhao and Keating 2007), il est donc saturé en conditions d'euglycémie ce qui permet un transport basal de glucose ininterrompu, et ce, même en période d'hypoglycémie. La haute affinité pour le glucose de GLUT1 fait de lui un mauvais candidat pour la détection du glucose. À l'opposé, GLUT2 a une faible affinité pour le glucose relative à celle de GLUT1. Ceci fait en sorte que ce transporteur n'est pas saturable à des concentrations de glucose physiologiques. La conséquence de ce transport non saturable est que le taux de transport du glucose est proportionnel à sa concentration extracellulaire. Dans les cellules β du pancréas, GLUT2 est un élément clé dans les mécanismes de détections du glucose (Thorens 2015). Dans le cerveau GLUT2 est exprimé dans les astrocytes au niveau du corps cellulaire, de leurs prolongements ainsi que dans le pied astrocytaire en contact avec les cellules endothéliales (Arluison, Quignon, Nguyen, et al. 2004, Arluison, Quignon, Thorens, et al. 2004). Les astrocytes sont donc idéalement positionnés et équipés la détection du glucose périphérique.

La réponse contre régulatrice à l'hypoglycémie est un mécanisme permettant de maintenir des niveaux suffisants de glucose en stimulant la sécrétion de glucagon. Cette réponse nécessite la détection d'une baisse de la glycémie dans le MBH et l'activation subséquente du noyau du tractus solitaire (NTS) (McDougal et al. 2013). Le groupe de Thorens a montré que ce mécanisme implique le

transporteur GLUT2 extra pancréatique (Burcelin and Thorens 2001). Uniquement la réexpression gliale de GLUT2, à l'opposé de la réexpression neuronale, restaure les mécanismes de détection de l'hypoglycémie. Ceci montre que les astrocytes sont impliqués dans la détection de l'hypoglycémie (Marty et al. 2005). Ces données sont en accord avec des observations suggérant que le métabolisme intracellulaire du glucose dans les astrocytes est nécessaire à la détection de l'hypoglycémie. En effet, l'administration d'inhibiteur du métabolisme astrocytaire du glucose bloque l'activation des neurones du NTS par le 2-déoxy glucose (2-DG), un analogue non métabolisable du glucose (Young et al. 2000). L'utilisation d'un autre inhibiteur métabolique spécifique aux astrocytes, le fluorocitrate, suggère que les astrocytes du NTS sont capables de détecter la baisse des niveaux de glucose via l'administration ICV de 2-DG ou par l'infusion systémique d'insuline (Hermann et al. 2014). De plus, dans un modèle d'explants du NTS, l'activation des astrocytes par la baisse des niveaux de glucose dans le milieu précède l'activation neuronale (McDougal et al. 2013). L'inhibition de la transmission synaptique ne prévient pas cette activation astrocytaire, confirmant que cette détection se fait premièrement dans les astrocytes.

En plus de détecter les baisses dans les niveaux de glucose pour initier la réponse contre régulatrice, les astrocytes sont aussi capables de détecter des augmentations des niveaux de glucose. L'infusion intra carotide dirigée vers le cerveau est une méthode de choix pour acheminer des molécules vers le cerveau d'une manière plus physiologique que l'injection en ICV. Ainsi, une infusion intra carotidienne de glucose entraîne une augmentation des niveaux centraux de glucose et une augmentation rapide et transitoire de la sécrétion périphérique d'insuline, sans affecter la glycémie (Guillod-Maximin et al. 2004). Cette administration de glucose vers le cerveau active diverses populations neuronales ainsi que plusieurs astrocytes dans l'ARC et le PVN. Le prétraitement avec un inhibiteur métabolique des astrocytes prévient à la fois la sécrétion d'insuline et l'activation neuronale dans l'ARC (Guillod-Maximin et al. 2004). Une étude plus récente suggère que les CXN exprimés aux extrémités des prolongements astrocytaires, sont essentiels à cette détection et à la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Allard et al. 2014). L'expression de la CXN 43 est régulée par le statut nutritionnel et les niveaux de glucose sanguin. Son expression est diminuée par le jeûne et augmentée lors d'une hyperglycémie. L'inhibition transitoire de son expression dans le MBH prévient l'effet d'une infusion intra carotide de glucose sur la sécrétion d'insuline (Allard et al. 2014). De plus, la surexpression du transporteur de glucose GLUT1 dans les astrocytes est suffisante pour restaurer la détection hypothalamique du glucose dans un modèle de rat diabétique (Chari et al. 2011).

Ces études suggèrent que la détection centrale du glucose nécessite la participation des astrocytes et est souvent initiée dans ces derniers. Ces observations sont aussi en accord avec l'hypothèse de la navette astrocyte neurone du lactate proposé par l'équipe de Magistretti et Pellerin qui a été décrite plus en détail dans les sections précédentes (Pellerin et al. 1998, Pellerin and Magistretti 2004).

IV.2 Acides gras

Contrairement au glucose, le transport des acides gras vers le cerveau ne semble pas impliquer des transporteurs membranaires. Ce transport serait plutôt effectué par diffusion passive à travers les membranes lipidiques et les acides gras seraient séquestrés via leur estérification en Acyl-CoA par différentes protéines comme les FATP et les ACS tel que décrit dans les sections précédentes. Ainsi, les astrocytes associés à la BBB seraient les premières cellules cérébrales à avoir accès aux acides gras en provenance de la circulation périphérique. De plus, ce sont les astrocytes qui métabolisent la grande majorité des acides gras et des corps cétoniques dans le CNS. Ils ont ainsi le potentiel d'être impliqués dans la détection des acides gras dans le cerveau (Yi, Habegger et al. 2011).

La consommation de diètes riches en gras peut induire une activation astrocytaire, gliose, caractérisée par une augmentation des niveaux d'expression du marqueur GFAP. Cette gliose n'est pas liée à la présence d'inflammation puisqu'une diète enrichie à 41 % en acides gras ne produit aucune activation de la microglie ou de troubles cognitifs qui sont associés à la consommation d'une diète enrichie à 60 % (Pistell et al. 2010). Ceci suggère que les astrocytes sont capables de détecter les effets d'une augmentation des acides gras, ou les acides gras eux-mêmes, avant le début de l'inflammation associé à ce type de diète.

Une des démonstrations les plus marquantes de la détection astrocytaire des acides gras est l'activation des astrocytes hypothalamiques 24 heures suivant le début de la prise de nourriture riche en gras (Thaler et al. 2012) et précèdent la prise de poids chez ces animaux. Cette activation astrocytaire, est transitoire et réapparaît après plusieurs semaines sur ces diètes riches en acides gras suivant la prise de poids. Cette activation transitoire suggère que les astrocytes sont sensibles aux changements rapides des concentrations centrales d'acides gras. De façon similaire, la consommation

de diète riche en gras induit le clivage de la caspase 3 dans les astrocytes hypothalamiques après uniquement 3 jours (Guyenet et al. 2013). L'activation de cette caspase est généralement associée à l'activation des voies apoptotiques, mais est aussi impliqué dans plusieurs voies non apoptotiques (Schwerk and Schulze-Osthoff 2003). La détection de différents types d'acides gras dans le cerveau est tout aussi importante, voir plus important, que la quantité. Le passage d'une diète riche en acide gras saturé à une diète enrichie en acides gras insaturés a pour effet de renverser l'inflammation induite par la diète (Cintra et al. 2012).

Les astrocytes en cultures peuvent aussi être activés par la présence de différents acides gras dans le milieu de culture. Des cultures primaires d'astrocytes exposées à des acides gras saturés, comme le palmitate, produit une réaction inflammatoire et une relâche dose dépendent de cytokines. Par contre, cette sécrétion de cytokine n'est pas observée suite à l'incubation avec des acides gras insaturés comme l'oléate (Gupta et al. 2012). De la même façon, le DHA, un acide gras polyinsaturé, peut diminuer de façon dose dépendent et même prévenir la sécrétion de ces cytokines induite par le palmitate (Gupta et al. 2012). Ces effets différents des acides gras saturés et insaturés suggèrent que les astrocytes en cultures sont capables de détecter, et même différentier, la présence de ces différents acides gras.

Les astrocytes du VMH sont capables de détecter les variations dans les niveaux d'acides gras circulants et d'augmentent la production de corps cétoniques en réponse à ces variations. La consommation à court terme de diète riche en gras produit une augmentation des niveaux des acides gras libres périphériques. Cette augmentation stimule la production de corps cétoniques par les astrocytes du VMH pour inhiber la prise alimentaire (Le Foll et al. 2014). Les auteurs suggèrent que les corps cétoniques ainsi produits peuvent altérer les mécanismes de détection neuronaux des nutriments dans le VMH, renforçant l'idée que la détection des nutriments dans le cerveau implique une coopération entre neurones et astrocytes. L'inhibition locale de cette production de corps cétoniques par les astrocytes abolit cette modulation de prise alimentaire (Le Foll et al. 2014, 2015). Ces données renforcent l'idée que les astrocytes sont capables de détecter les variations circulantes d'acides gras et sont capables, via la production de corps cétoniques qui sont acheminés vers les neurones, de moduler la prise alimentaire.

La modulation de la prise alimentaire par les acides gras n'est pas nouvelle, deux groupes différents ont montré que l'administration d'acides gras insaturés dans le cerveau permet de diminuer la prise

alimentaire (Obici et al. 2002, Schwinkendorf et al. 2011). De plus, l'inhibition dans le MBH de plusieurs enzymes du métabolisme intracellulaire des acides gras incluant l'ACS, l'acétyl-CoA carboxylase et « Carnitine Palmitoyl Transferase » (CPT)-1 ont pour effet d'abolir la détection des acides gras dans le cerveau et prévenir la diminution de la prise alimentaire et l'inhibition de la production hépatique de glucose (Obici et al. 2003, Pocai et al. 2006, Moulle et al. 2013). Bien que ceci ne permette pas de préciser la nature des cellules impliquées dans cette détection, les acides gras sont principalement utilisés et oxydés dans les astrocytes nous permet de supposer leur implication dans ce processus de détection (Guzman and Blazquez 2001, Escartin et al. 2007).

Les astrocytes matures expriment PPAR α et γ , deux facteurs de transcription ayant des rôles importants dans la détection des acides gras et la régulation de leur métabolisme (Berger and Moller 2002, Cristiano et al. 2005, Heneka and Landreth 2007). L'apolipoprotéine E (ApoE) est un transporteur de lipides majeur dans le cerveau (Chowen et al. 2016) et est considérée comme un facteur de satiété est principalement exprimé dans les astrocytes (Shen et al. 2008, Shen et al. 2009). Son administration en ICV produit une diminution de la prise alimentaire tandis que l'administration d'anticorps contre ApoE produit l'effet inverse (Shen et al. 2008).

Ces données suggèrent que la détection des acides gras dans le cerveau, tout comme pour le glucose, requiert une participation active des astrocytes. Toutefois, l'étroite association entre les astrocytes et les neurones complique l'évaluation de la détection « astrocytaires » ou « neuronale » des nutriments. Ces deux types cellulaires majeurs du cerveau ont probablement des rôles complémentaires dans la détection du glucose et des acides gras. Ainsi, lorsque l'on évalue l'action centrale du glucose ou des acides gras, il est important de garder en tête un rôle concerté des astrocytes et des neurones dans ces processus.

IV.3 Action centrale des acides gras

Les acides gras sont des molécules riches en énergie composée essentiellement d'un groupement carboxylique (acide) précédé d'une chaîne carbonée (gras). La longueur de cette chaîne varie généralement entre 4 et 26 carbones et peut être saturée ou insaturée à un ou plusieurs sites. Les acides gras sont classifiés selon la longueur de leur chaîne de carbone (courte, moyenne, longue ou

très longue), le degré de saturation de cette dernière (saturé, mono- ou polyinsaturé) ainsi que par la position de la première double liaison. La position de cette dernière est déterminée à partir du premier groupement CH₃ qui est identifié comme le carbone oméga (ω). Ces acides gras insaturés sont ainsi classifiés en tant qu'acides gras ω -3 ou n-3, ω -6 ou n-6 ainsi que ω -9 ou n-9 (Bazinet and Laye 2014). Différents acides gras sont représentés dans le Tableau 1 selon la longueur de leur chaîne et leur degré d'insaturation.

Tableau 1 : Classification de divers types d'acides gras libres.

Nom	Type	Longueur	Chaîne	Insaturations	Symbole
Caprylique (octanoïque)	Saturé	Moyenne	8	0	8:0
Caprique (décanoïque)	Saturé	Moyenne	10	0	10:0
Laurique	Saturé	Moyenne	12	0	12:0
Myristique	Saturé	Moyenne	14	0	14:0
Palmitique	Saturé	Longue	16	0	16:0
Palmitoléique	Insaturé	Longue	16	1	16:1
Stéarique	Saturé	Longue	18	0	18:0
Oléique	Insaturé	Longue	18	1	18:1n-9
Linoléique	Polyinsaturé	Longue	18	2	18:2n-6
α-Linoléique	Polyinsaturé	Longue	18	3	18:3n-3
Arachidonique	Polyinsaturé	Longue	20	4	20:4n-6
Eicosapentanoïque (EPA)	Polyinsaturé	Longue	20	5	20:5n-3
Docosahexanoïque (DHA)	Polyinsaturé	Longue	22	6	22:6n-3
Lignocérique	Saturé	Très longue	24	0	24:0
Cérotique	Saturé	Très longue	26	0	26:0

À l'exception du tissu adipeux, le cerveau est l'organe le plus riche en lipides de l'organisme, ceux-ci représentent de 50 % à 60 % de la masse sèche du cerveau. Une grande proportion des acides gras du cerveau sont des PUFA soit près de 35% (Liu et al. 2015). Plusieurs de ces PUFA sont considérés comme des acides gras essentiels puisqu'ils ne peuvent être synthétisés *de novo* à partir de l'Acétyl-CoA. Ils doivent ainsi provenir de l'alimentation ou être synthétisés à partir d'autres acides gras essentiels (Watkins et al. 2001, Benatti et al. 2004). L'acide arachidonique et le DHA sont les deux PUFA les plus abondant du cerveau et représentent respectivement 50 et 40% des PUFA totaux du CNS. Ces derniers sont considérés comme essentiels puisqu'ils sont synthétisés à partir de précurseurs qui sont eux-mêmes essentiels, l'acide linoléique (18:2) et α -linoléique (18:3) respectivement (Liu et al. 2015). Les acides gras, particulièrement les PUFA, sont essentiels à plusieurs processus centraux incluant le sommeil, la plasticité synaptique, le développement neuronal ainsi que le bon fonctionnement des synapses (Chen and Bazan 2005, Cao et al. 2009). De plus, des déficits de certains types d'acides gras ou dans leur transport sont associés à plusieurs maladies comme l'autisme, l'Alzheimer ainsi que la dépression majeure (Maekawa et al. 2015, Song et al. 2016). Ainsi, les acides gras, provenant de la circulation périphérique ou synthétisés localement, peuvent avoir plusieurs autres fonctions dans le CNS en plus de leurs rôles de substrats énergétiques.

IV.3.1 Contrôle de la prise alimentaire et homéostasie énergétique

Plusieurs études suggèrent que les acides gras, provenant de la circulation périphérique ou produit localement via la Fatty acid synthase (FAS), agissent au niveau de l'hypothalamus pour moduler la prise alimentaire, le métabolisme énergétique, ainsi que pour signaler l'état nutritionnel de l'organisme. C'est en 1975 que le lien entre les acides gras dans l'hypothalamus et la prise alimentaire a été évoqué pour la première fois dans une étude portant sur les effets des acides gras sur l'activité de neurones hypothalamiques (Oomura et al. 1975). C'est en se basant sur cette étude séminale que plusieurs ont proposé que les acides gras dans le cerveau, particulièrement le MBH, soient capables de diminuer la prise alimentaire. Plusieurs groupes, incluant celui de Rossetti, ont montré que l'augmentation des niveaux des acides gras dans le cerveau peut être considérée comme un signal anorexigène (Obici et al. 2002). Dans cette étude, les auteurs montrent que l'administration ICV d'oléate produit une diminution marquée des niveaux d'insuline et une diminution de la production

hépatique de glucose « Hepatic Glucose Production » (HGP), de la prise alimentaire ainsi que des niveaux d'expression de NPY. L'effet de l'administration de l'oléate n'a pas été reproduit par une administration équimolaire d'octanoate, un « Medium-Chain Fatty Acid » (MCFA) saturé, suggérant que l'action des acides gras ne dépend pas de la production d'ATP par leur oxydation et qu'elle puisse être spécifique à certains types d'acides gras ou au degré de saturation. Une étude similaire montre que l'effet anorexigène des acides gras est uniquement observé suite à l'administration ICV d'un acide gras mono-insaturé (oléate) ou polyinsaturé (DHA) (Schwinkendorf et al. 2011). Le groupe de Rossetti a suggéré que le métabolisme intracellulaire des acides gras est essentiel à leur action sur l'homéostasie du glucose et la prise alimentaire. L'inhibition pharmacologique de CPT-1 ainsi que la diminution de son expression par un ribozyme dans le MBH produit les mêmes effets que l'administration ICV d'oléate, soit une diminution de l'HGP ainsi que de la prise alimentaire, accompagnée d'une diminution de l'expression de NPY (Obici et al. 2003). L'inhibition de CPT-1 bloque l'entrée des Acyl-CoA dans la mitochondrie afin d'être oxydés et provoque leur accumulation dans le cytoplasme, d'une façon similaire à la diminution de la prise alimentaire par les inhibiteurs de FAS (Loftus et al. 2000). De plus, l'inhibition de l'estérification des acides gras libres en LCFA-CoA par l'inhibition de l'ACS dans le MBH provoque une augmentation de l'HGP et de la prise alimentaire. Ceci indique que cette accumulation intracellulaire de LCFA-CoA serait le signal responsable de l'effet anorexigène des acides gras dans le cerveau (Lam, Pocai, et al. 2005). Ce signal, passant par le nerf vague pour réguler la HGP, requiert l'activation des ATP-sensitive potassium channel (K_{ATP}), puisqu'une vagotomie ou l'inhibition des K_{ATP} abolissent les effets centraux des lipides (Lam, Pocai, et al. 2005). L'existence d'un système capable de détecter les acides gras dans le MBH suggère que cette région de l'hypothalamus est exposée aux variations des niveaux périphériques d'acides gras et peut agir de façon appropriée sur l'homéostasie du glucose et la prise alimentaire. En effet, l'infusion périphérique d'intralipide (émulsion de lipides, essentiellement TAG) provoque une augmentation des niveaux de LCFA-CoA dans le MBH (Pocai et al. 2006). En accord avec l'effet anorexigène de l'accumulation intracellulaire des LCFA-CoA, l'inhibition de l'estérification des NEFA en Acyl-CoA prévient l'effet anorexigène des acides gras (Mouille et al. 2013). Ceci suggère que l'augmentation des niveaux circulant de LCFA, sous forme de TAG, est détectée par les cellules du MBH suite à leur transport intracellulaire et leur estérification en LCFA-CoA.

L'infusion intra tissulaire d'acides gras dans le MBH, malgré le fait que ce soit une méthode moins physiologique, permet d'élever localement les niveaux d'acides gras. En utilisant cette méthode, le groupe de Schwartz a montré que la diminution de la HGP est spécifique à l'oléate puisque des administrations similaires d'acide palmitique (saturé) et linoléique (polyinsaturé) sont inefficaces pour moduler la HGP (Ross et al. 2010). D'autres études confirment le lien entre la détection des acides gras dans le MBH et le métabolisme énergétique en périphérie. L'infusion intra-MBH d'oléate inhibe la production et la sécrétion de TAG sous forme de « Very Low Density Lipoprotein » (VLDL) par le foie (Yue et al. 2015). Cette action hypothalamique de l'oléate sur le foie se fait indépendamment des niveaux circulants de glucose, d'insuline et d'acides gras libres. Comme pour la modulation de la HGP, la régulation de la sécrétion de VLDL implique les circuits neuronaux hypothalamiques vers le complexe dorso vagal.

L'axe hypothalamo-hypophysio surrénalien (HPA) est également sensible aux variations des d'acides gras circulants. En effet, la diminution des niveaux d'acides gras libres dans le plasma entraîne une activation de l'axe HPA et la sécrétion d'ACTH et de corticostérone pour rétablir les niveaux circulants d'acides gras (Oh et al. 2012). Contrairement à la régulation de la HGP et de la sécrétion des VLDL par les acides gras insaturés dans le cerveau, cette activation de l'axe HPA est due à une diminution des acides gras saturés plutôt qu'une diminution des niveaux totaux d'acides gras libres (Oh et al. 2014). Ceci semble confirmer l'existence de réseaux neuronaux sensibles à différents types d'acides gras. Cette action des acides gras saturés sur l'axe HPA est potentiellement médiée par l'inhibition de PPAR γ dans le PVN. En effet, ce facteur de transcription est impliqué dans diverses réponses aux acides gras et son antagonisme dans le PVN induit la sécrétion d'ACTH tandis que son activation produit l'effet inverse (Uchoa et al. 2014).

L'action anorexigène des acides gras peut paraître contre-intuitive puisque l'augmentation des niveaux circulants d'acides gras libres est associée à des déficits dans l'apport en nutriments, comme un jeûne prolongé, plutôt qu'à une grande disponibilité de nutriments. Par contre, la période postprandiale est accompagnée d'une élévation des niveaux de lipoprotéines riches en TAG. Plusieurs données récentes suggèrent que les protéines lipases comme la LPL sont impliquées dans la détection des acides gras circulants et dans leurs effets sur la prise alimentaire et les dépenses énergétiques (Wang and Eckel 2012, Libby et al. 2015). En effet, des études d'inactivation de la LPL montrent à la

fois une diminution du transport des acides gras vers l'hypothalamus ainsi qu'une diminution des dépenses énergétiques conduisant au développement de l'obésité chez le rongeur (Wang et al. 2011). Cette action de la LPL sur les dépenses énergétiques n'est pas uniquement observée dans l'hypothalamus. L'inhibition pharmacologique ou l'inactivation de la LPL dans l'hippocampe entraîne un gain de poids associé à une diminution des dépenses énergétiques sans modification sévère du comportement alimentaire (Picard et al. 2014). Les acides gras peuvent aussi agir sur les structures mésolimbiques du cerveau et moduler l'aspect motivationnel de la consommation de nourriture riche en gras. L'infusion intra carotidienne d'une émulsion lipidique riche en TAG réduit l'aspect récompensant de la consommation de nourriture riche en gras. Cet effet central des TAG serait médié par leur hydrolyse par la LPL puisque son inhibition dans le noyau accumbens, noyau impliqué dans le système de la récompense, augmente la préférence pour les diètes riches en gras (Cansell et al. 2014).

La consommation de diète riche en gras produit des changements dans la sensibilité à l'insuline du foie ainsi qu'une augmentation dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose (GIIS), et ce, même avant le développement de l'obésité. Ces changements dans la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques seraient dus à une diminution du tonus sympathique vers ces tissus en provenance du VMH (Cruciani-Guglielmacci et al. 2005). Ceci est aussi observé suite à une infusion chronique d'intralipide en périphérie (Magnan et al. 1999) ainsi qu'en ICV (Clement et al. 2002). Cette augmentation de la GIIS nécessite à la fois l'hydrolyse des TAG en NEFA ainsi que l'oxydation β de ces derniers dans le cerveau puisque l'inhibition de l'entrée des acides gras dans la mitochondrie par CPT-1 prévient l'augmentation de la GIIS lors d'une infusion intra carotidienne d'intralipide (Cruciani-Guglielmacci et al. 2004). Cette inhibition de l'oxydation mitochondriale des acides gras a aussi comme effet de diminuer la prise alimentaire de ces rats telle qu'observée précédemment par le groupe de Rossetti (Obici et al. 2003).

En plus de pouvoir détecter les niveaux d'acides gras, le MBH, particulièrement le VMH, est sensible aux augmentations de corps cétoniques comme le BHB. L'introduction d'une diète riche en gras provoque une augmentation transitoire de la prise alimentaire qui redescend à des niveaux normaux après trois jours. L'inhibition de la production de BHB par les astrocytes du VMH prévient cette diminution de la prise alimentaire (Le Foll et al. 2014). Cette inhibition de la production de BHB dans le VMH de rats résistants à la diète renverse cette résistance et augmente la prise alimentaire au même niveau que les rats sensibles à la diète (Le Foll et al. 2015). La

Figure 9 résume les différents effets périphériques de la détection des acides gras dans le cerveau.

La consommation de diètes riches en gras peut influencer ces divers mécanismes de détection des acides gras dans le cerveau. Ces altérations peuvent à leur tour augmenter la consommation de nourriture ainsi que la préférence pour des diètes riches en gras. Ceci peut ensuite exacerber la prise de poids due à la surconsommation de diète riche en gras. Effectivement, la surconsommation de diète riche en gras ou en sucre abolit la détection des acides gras dans le MBH et prévient leurs effets anorexigènes (Morgan et al. 2004, Pocai et al. 2006). Ces altérations dans la détection centrale des acides gras peuvent être avoir lieu relativement rapidement. Trois jours de consommation de diète riche en gras sont suffisants pour prévenir les effets de l'administration par ICV d'oléate sur la sécrétion hépatique de VLDL (Yue et al. 2015). Ces augmentations prolongées des niveaux de TAG circulants vont aussi conduire à augmenter la préférence pour les diètes riches en gras (Karatayev et al. 2009, Cansell et al. 2014).

Cellule du système nerveux central

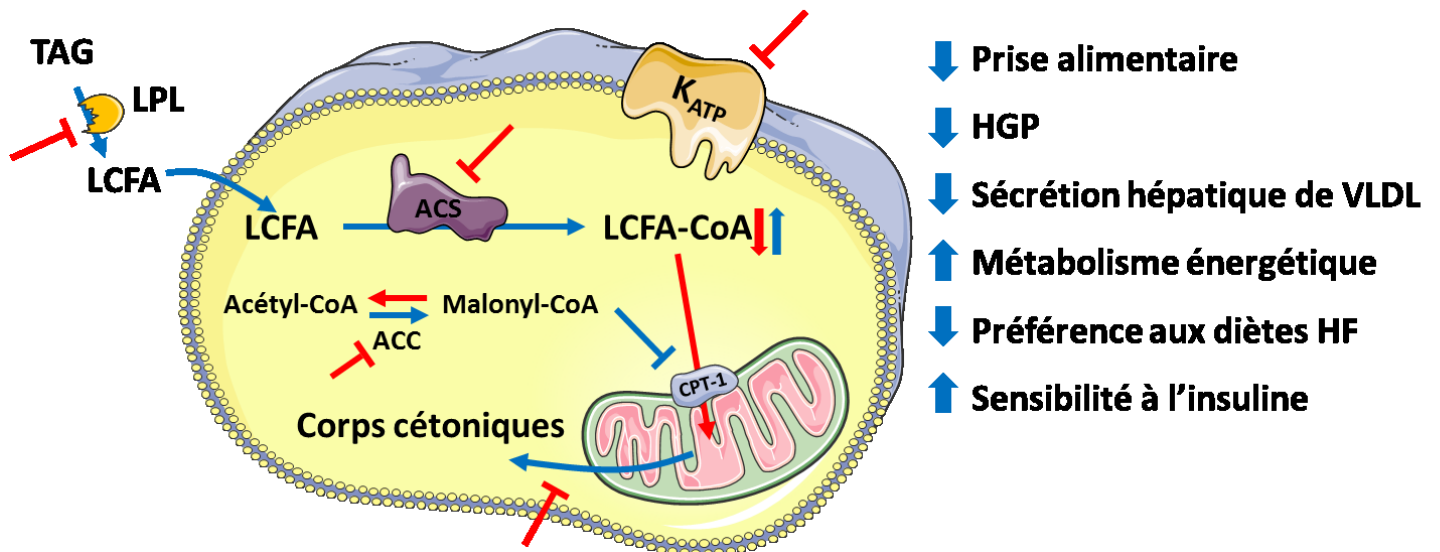


Figure 9 : Effet des acides gras à longue chaîne dans l'hypothalamus médiobasal.

En conditions normales dans l'hypothalamus médiobasal, les LCFA sont transportés à l'intérieur de la cellule puis sont estérifiés en LCFA-CoA par l'ACS. L'accumulation intracellulaire des LCFA-CoA est un signal anorexigène qui provoque une diminution de la prise alimentaire et l'HGP. L'accumulation des LCFA-CoA entraîne l'activation des K_{ATP} pour diminuer l'HGP. L'inhibition de l'ACS prévient l'accumulation de LCFA-CoA et la diminution de la prise alimentaire et de l'HGP. L'inhibition des K_{ATP} prévient la diminution de l'HGP. L'inhibition de CPT-1 permet l'accumulation des LCFA-CoA et diminue la prise alimentaire et l'HGP. La consommation d'une diète riche en gras inhibe l'ACC et prévient l'inhibition de CPT-1 par l'accumulation du malonyl-CoA, les LCFA-CoA entrent et sont oxydés dans la mitochondrie, prévenant leur accumulation et leurs effets sur la prise alimentaire et l'HGP. La détection des TAG entraîne une augmentation des dépenses énergétiques et une inhibition de la sécrétion de VLDL l'inhibition de la LPL prévient ces effets. La détection des TAG dans le noyau accumbens diminue la préférence aux diètes riches en gras. L'oxydation mitochondriale des LCFA-CoA entraîne la sécrétion de corps cétoniques vers les neurones du VMH pour diminuer la prise alimentaire. Abréviations : (ACC) Acétyl-CoA carboxylase, (ACS) Acétyl-CoA synthétase, (CPT-1) Carnitine palmitoyl transferase 1, (HF), High fat, (HGP) Production hépatique de glucose, (K_{ATP}) pompes de potassium ATP dépendante, (LCFA) acides gras à longue chaîne, (LPL) Lipoprotéine lipase, (TAG) Triglycérides, (VLDL) Lipoprotéine à très faible densité.

Les acides gras peuvent ainsi agir dans le CNS pour moduler plusieurs paramètres de l'homéostasie énergétique incluant la prise alimentaire, la HGP, la sécrétion de lipoprotéines par le foie ainsi que la modulation des dépenses énergétiques. Certains de ces effets centraux des acides gras peuvent être dépendants de l'oxydation tandis que d'autres nécessitent une accumulation intracellulaire sous forme d'Acyl-CoA. En effet, la modulation de l'activité des diverses enzymes impliquées dans le métabolisme des acides gras, tels la LPL, FAS, ACSL ainsi que CPT-1, de manière à augmenter les niveaux intracellulaires d'Acyl-CoA conduit à une diminution de la prise alimentaire. L'estérification et l'accumulation en Acyl-CoA dans l'hypothalamus seraient un signal anorexigène. Dans les tissus périphériques, les Acyl-CoA sont nécessairement liés à une protéine de liaison, Acyl-CoA Binding Protein (ACBP) qui les stabilise en les protège contre l'hydrolyse et permet leur accumulation intracellulaire. En permettant, ou en favorisant, l'accumulation des Acyl-CoA intracellulaire dans l'hypothalamus, ACBP pourrait donc faire partie de la réponse anorexigène des acides gras. De plus, ACBP est aussi impliqué dans d'autres aspects du métabolisme périphérique des acides gras qui, dans

le SNC, pourraient être importants dans la régulation de la prise alimentaire par les acides gras. Nous allons donc, dans la section suivante, introduire les différentes fonctions périphériques connues d'ACBP ainsi que ce qui est connu de ses fonctions dans le cerveau.

V Acyl-CoA Binding Protein (Diazepam Binding Inhibitor)

V.1 Identification

Avant d'introduire les fonctions périphériques d'ACBP reliées au métabolisme des acides gras, nous allons parler de l'identification de cette protéine et comment cette dernière a été identifiée dans différents tissus par différents laboratoires qui l'ont nommé différemment selon sa fonction présumée. Ceci est important puisque ces fonctions périphériques et au niveau du cerveau sont, en apparence, incompatibles et ont suscité une légère controverse parmi ces différentes équipes. ACBP a été identifié pour la première fois par le groupe de Costa en 1983 pour sa capacité à inhiber la liaison des benzodiazépines au récepteur GABA_A (Guidotti et al. 1983). Le groupe s'est basé sur deux observations pour suggérer l'existence d'un ligand endogène du récepteur des benzodiazépines sur le récepteur GABA_A. Ces observations ont été faites sur des préparations synaptiques en absence du neurotransmetteur GABA. Premièrement, l'affinité du diazépam radio-marqué au récepteur GABA_A est augmentée par le retrait des « facteurs inhibiteurs endogènes » par un lavage de ces membranes. Deuxièmement, l'ajout de ces « facteurs inhibiteurs endogènes », issu des lavages, diminue l'affinité du diazépam sur des préparations non traitées (Massotti and Guidotti 1980). Le groupe de Costa a donc purifié par HPLC ce facteur à partir d'extrait de cerveau de rat qu'ils ont nommé « Diazepam Binding Inhibitor » (DBI) puisqu'il était capable d'inhiber la liaison du diazépam au récepteur GABA_A et qu'il antagonise les effets anti conflit de ce dernier chez le rat (Guidotti et al. 1983).

Comme mentionnée plus haut, la découverte d'ACBP a été un évènement peu commun, non pas pour l'importance de cette protéine, mais dû au fait qu'elle a été identifiée séparément par cinq groupes de recherches différents sur la base de fonctions différentes dans un laps de temps relativement court de seulement cinq ans (Knudsen et al. 1993). Suite à sa première identification dans le cerveau de rat par (Guidotti et al. 1983), un autre groupe a isolé une protéine intracellulaire qu'ils ont

nommée endozépine qui avait des propriétés similaires à DBI en 1986 (Shoyab et al. 1986). En 1987 une protéine considérée comme un contaminant dans un extrait de FABP a été identifiée. En contraste avec FABP, cette protéine était incapable de lier les acides gras et semblait plutôt lier les Acyl-CoA et semblait possiblement impliqué dans l'oxydation β mitochondriale ou peroxisomale de ces derniers (Mogensen et al. 1987), cette protéine a ainsi été nommée ACBP. En 1988 un quatrième groupe a purifié, à partir d'extrait de cellules surrénaliennes bovines, une protéine impliquée dans la synthèse des stéroïdes possiblement par le transport du cholestérol à travers les membranes mitochondriales (Yanagibashi et al. 1988). Finalement, la même année, un peptide a été purifié à partir d'intestins de porc. Ce peptide avait la capacité d'inhiber partiellement la sécrétion d'insuline dans des préparations de pancréas perfusées. L'analyse de la structure de ce peptide a démontré qu'il était identique à DBI (Chen et al. 1988).

V.1.1 La controverse

Il n'aura pas fallu attendre longtemps aux différents groupes de chercheurs travaillant sur ACBP et DBI pour se rendre compte qu'ils étudiaient tous la même protéine. C'est dans le processus de révision d'un article, paru en 1989, portant sur l'isolation et la caractérisation d'ACBP provenant du foie de rat que l'identité des séquences entre ACBP, protéine périphérique, et DBI, protéine du CNS, a été remarquée pour la première fois (Knudsen et al. 1989). ACBP et DBI ont rapidement été acceptés comme étant la même protéine, mais cela n'a pas empêché l'émergence des débats sur la fonction « réelle » d'ACBP ou DBI entre les différents groupes de recherches. D'un côté le groupe du Dr Knudsen et Nielsen avance l'idée qu'ACBP ne peut être considéré comme un neurotransmetteur pour trois raisons, 1- ils n'ont pas été capable de répliquer les résultats originaux d'inhibition des effets du diazépam 2- la protéine est beaucoup plus fortement exprimé dans le foie que le cerveau et 3- sa séquence codante ne contient pas de séquence signal, ce qui serait attendu d'un neurotransmetteur (Knudsen and Nielsen 1990). De l'autre côté, le groupe du Dr Costa cite plusieurs sources montrant un effet antagoniste au diazépam, ainsi que des effets pro-conflits de DBI lorsqu'il est administré centralement. Ils notent aussi que les niveaux de DBI sont plus élevés dans le liquide céphalo-rachidien ou « Cerebro-spinal fluid » (CSF) de patients atteints de dépressions sévères et d'encéphalopathies hépatiques, condition où la transmission GABAergique est altérée, comme des

exemples de l'importance de DBI dans cette transmission (A. Guidotti 1990). Selon le Dr Costa, le fait d'être associé à de multiples fonctions physiologiques ne fait qu'augmenter l'attrait envers cette protéine et dénote de l'importance de cette dernière à la fois dans le CNS et en périphérie.

V.2 ACBP en périphérie

ACBP est une petite protéine de 86 acides aminés et d'environ 10 kDa. C'est une protéine hautement conservée dans tous les organismes, des protozoaires aux mammifères (Hansen et al. 2008). ACBP possède plusieurs caractéristiques propres aux « housekeeping genes », c'est-à-dire qu'ACBP est exprimé de façon ubiquitaire dans tous les tissus, quoique ses niveaux d'expressions peuvent grandement varier d'un tissu à l'autre (Burgi et al. 1999, Neess et al. 2006). Dans la cellule, ACBP se retrouve principalement dans le cytoplasme, mais peut aussi être associée à l'ER et l'appareil de Golgi ainsi que dans le noyau. Plusieurs études ont suggéré que la translocation d'ACBP dans l'appareil de Golgi, ainsi que son éventuelle sécrétion extracellulaire, requiert la liaison d'un Acyl-CoA (Hansen et al. 2008, Manjithaya et al. 2010). Dans le foie, il a été démontré que les niveaux d'expression d'ACBP diminuent d'environ 30% suite à un jeûne de 24h. Inversement, quelques jours sous une diète riche en gras sont suffisants pour augmenter les niveaux protéiques d'ACBP d'environ 40% (Bhuiyan et al. 1995). Pour élucider les rôles potentiels d'ACBP, plusieurs souris KO pour ACBP ont été générées. La première souris invalidée pour ACBP est en fait une délétion spontanée de 400 kb (nm1054) dans le chromosome 1 qui inclut, en partie ou en totalité, les séquences de six gènes, dont celle d'ACBP. Ces souris sont viables, mais développent un phénotype cutané particulier. Les souris ayant une délétion homozygote ont une fourrure rousse et d'apparence grasseuse (Lee et al. 2007). Étant donné que la délétion nm1054 affecte l'expression de six différents gènes, une seconde souris KO pour ACBP a été générée par recombinaison homologue pour supprimer la région promotrice ainsi que les exons 1 et 2 d'ACBP. Contrairement à la mutation nm1054, et de façon surprenante, cette invalidation à l'état homozygote d'ACBP est létale au stade embryonnaire préimplantation (Landrock et al. 2010). Finalement, un second groupe de recherche a généré une souris ayant une délétion spécifique du deuxième exon d'ACBP (ACBP Lox). À l'état homozygote, cette délétion compromet la capacité de ces souris à survivre l'étape du sevrage, par contre, l'addition de nourriture humide au fond de la cage durant cette période critique leur permet de survivre jusqu'à l'âge adulte (Neess et al. 2011). Tout

comme pour la mutation nm1054, les souris ACBP Lox homozygotes ont une fourrure rousse et d'apparence grasseuse due à des défauts de formation de la barrière épidermique. En plus de ces différentes souris KO, plusieurs modèles de souris et rats transgéniques surexprimant ACBP ont été générés et l'inactivation par des « small interference Ribonucleic Acid » (siRNA) chez le ver et dans la levure ont été utilisés. ACBP peut avoir de nombreuses fonctions en périphérie, de telles fonctions incluant le maintien des réserves intracellulaires d'Acyl-CoA, l'oxydation, l'estérification et la synthèse des acides gras ainsi que plusieurs autres. Sans être une liste exhaustive, ces différentes fonctions, reliées de près ou de loin au devenir métabolique des Acyl-CoA, seront abordées dans les sections suivantes.

V.2.1 Maintient des réserves intracellulaires d'Acyl-CoA

Comme son nom l'indique, ACBP est une protéine qui est capable de lier avec une grande affinité les Acyl-CoA. ACBP lie de préférence les MCFA- et LCFA-CoA, mais possède la plus grande affinité pour les LCFA-CoA dont la chaîne se situe entre 14 et 22 carbones. ACBP n'a pas ou très peu d'affinité pour les acides gras libres, le CoA libre ou les Acyl-carnitines, ce qui en fait une protéine qui lie exclusivement les Acyl-CoA. FABP, une protéine de liaison des acides gras libres, a une très haute affinité pour les acides gras libres et très peu d'affinité pour les Acyl-CoA, mais est quand même capable de les lier à de plus faibles niveaux qu'ACBP (Rosendal et al. 1993, Abo-Hashema et al. 2001). Des études *in vitro* ont montré qu'ACBP, dû à sa grande affinité pour les LCFA-CoA, était capable de déloger le palmitate de préparations membranaires et de le transporter vers la mitochondrie pour y être oxydé, et ce avec une beaucoup plus grande efficacité que FABP ou l'albumine (Rasmussen et al. 1993).

ACBP, en liant les Acyl-CoA, permet de stabiliser et de protéger les réserves intracellulaires contre l'hydrolyse. Des études chez la levure ont montré que le contenu en Acyl-CoA des levures où ACBP est surexprimé est presque doublé par rapport aux levures de type sauvage (Knudsen et al. 1994). La surexpression d'ACBP chez la souris produit un phénotype presque identique que celui observé chez la levure soit une augmentation de 70% des niveaux d'Acyl-CoA dans le foie (Huang et al. 2005). Cette surexpression d'ACBP dans le foie peut être considérée comme étant physiologique puisqu'elle ne dépasse pas les niveaux d'ACBP que l'on peut observer lorsque des souris WT sont soumises à des

diètes riches en gras, soit d'environ 30% (Bhuiyan et al. 1995). En plus d'augmenter le pool d'Acyl-CoA, la surexpression d'ACBP altère aussi leurs compositions. On peut observer une augmentation marquée des Acyl-CoA polyinsaturés ainsi qu'une augmentation plus modeste des Acyl-CoA saturés, par contre les niveaux d'Acyl-CoA mono-insaturés sont inchangés. Un phénotype similaire est aussi observé dans le tissu adipeux lorsqu'ACBP est surexprimé chez le rat (Oikari et al. 2008). Cette augmentation est tout aussi importante pour les Acyl-CoA saturés que mono-insaturée. À l'opposé des études de surexpression, l'inactivation d'ACBP dans la levure ne diminue pas les niveaux totaux d'Acyl-CoA, mais altère seulement leur composition. Les niveaux d'Acyl-CoA saturés sont augmentés tandis que les mono-insaturés sont diminués en conséquence (Gaigg et al. 2001).

La liaison des Acyl-CoA par ACBP permet de réduire leur concentration à l'état libre dans le cytosol, en plus de réduire leur effet détersif, cela permet de réduire les effets inhibiteurs qu'ils peuvent avoir sur plusieurs enzymes du métabolisme des acides gras. En liant les Acyl-CoA, ACBP est capable de renverser l'inhibition de plusieurs enzymes qui seraient inhibées par les Acyl-CoA, comme l'Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) et l'ACS mitochondriale (Faergeman and Knudsen 1997).

V.2.2 Oxydation des acides gras

En plus de pouvoir déloger les Acyl-CoA de préparations de membranes, ACBP est capable de les acheminer vers la mitochondrie où ils seront utilisés pour l'oxydation β . Le groupe du Dr Knudsen a montré que l'addition d'ACBP dans un système contenant des préparations membranaires radio-marquées et de mitochondries permet d'augmenter significativement les niveaux d'oxydation β . Cette augmentation due à l'addition d'ACBP est au moins quatre fois plus importante qu'avec l'addition de FABP ou d'albumine (Rasmussen et al. 1994). Dans cette même étude, les auteurs notent que l'augmentation du taux d'oxydation β est corrélée avec l'augmentation de la concentration d'Acyl-CoA lié à ACBP. À l'inverse le taux d'oxydation β diminue lorsque la concentration d'Acyl-CoA libre augmente. Ceci suggère que la mitochondrie, via CPT-1, reconnaîtrait le couple Acyl-CoA/ACBP plutôt que les Acyl-CoA libres. Cette observation est corroborée, plus récemment, par la mesure de l'affinité pour les Acyl-CoA d'ACBP et de CPT-1. Dans cette nouvelle étude, l'affinité d'ACBP pour l'oléyl-CoA est environ 170 à 1400 fois plus importante que celle de CPT-1. Son activité ne peut donc pas être expliquée par une simple compétition avec ACBP pour les Acyl-

CoA libres. Une relation linéaire entre l'activité de CPT-1 et la concentration d'Acyl-CoA peut seulement être observée lorsque l'on tient compte uniquement des Acyl-CoA liés à ACBP. CPT-1 est donc capable de reconnaître le couple ACBP/Acyl-CoA avec une plus grande affinité, suggérant un rôle pour ACBP dans l'acheminement vers la mitochondrie (Abo-Hashema et al. 2001).

L'implication d'ACBP dans l'oxydation des acides gras a aussi été observée *in vivo* dans le ver *C. elegans*. Il existe 6 paralogues d'ACBP chez le *C. elegans*, l'ablation d'un seul ou de plusieurs d'entre eux a pour effet de moduler les taux d'oxydation des acides gras tels le palmitate et l'oléate. L'inactivation d'ACBP1 augmente les taux d'oxydation de l'oléate tandis que l'inactivation d'ACBP2 a l'effet inverse. De plus, l'inactivation d'ACBP2 a pour effet d'augmenter, possiblement par un mécanisme compensatoire, l'oxydation du palmitate (Elle et al. 2011). Finalement, dans une lignée cellulaire dérivée de cellules pulmonaires cancéreuses humaines, l'inactivation d'ACBP par siRNA diminue les taux d'oxydation du palmitate d'environ 40% et compromet la survie de ces cellules, suggérant que l'implication d'ACBP dans ce processus est aussi importante chez les mammifères (Harris et al. 2014).

V.2.3 Estérification des acides gras

Le métabolisme intracellulaire des Acyl-CoA peut suivre deux voies distinctes, la voie catabolique, comme l'oxydation de ces derniers à des fins de production énergétique, et la voie anabolique, où les Acyl-CoA sont utilisés pour la synthèse lipides plus complexes. ACBP semble être impliqué, non seulement dans la voie catabolique, en fournissant des Acyl-CoA à la mitochondrie pour l'oxydation β , mais aussi dans la voie anabolique d'estérification en TAG, phospholipides et la synthèse d'Acyl-CoA à très longue chaîne (chaîne de carbone supérieure à 22). La surexpression d'ACBP chez la souris affecte l'estérification des Acyl-CoA en lipides complexes dans le foie. Une augmentation de l'expression d'ACBP d'environ 30% est suffisante pour augmenter les niveaux de TAG et de phospholipides membranaires dans le foie par rapport aux contrôles tout en diminuant les niveaux d'acides gras libres, ce qui suggère une augmentation de l'estérification (Huang et al. 2005). Dans cette étude les auteurs ont observé une augmentation de l'activité de la Glycerol-3-phosphate acyltransferase, une des enzymes clés de la synthèse des TAG et phospholipides. La surexpression

d'ACBP dans une lignée cellulaire hépatique a pour effet d'augmenter les niveaux de l'incorporation du palmitate extracellulaire dans les lipides complexes, plus précisément une augmentation de 71% de son incorporation dans les TAG (Yang et al. 2001). Des observations similaires sont faites chez le *C. elegans* où l'inactivation de certains paralogs d'ACBP réduit les niveaux de TAG dans cet organisme (Elle et al. 2011). Il a aussi été suggéré qu'ACBP puisse être impliqué dans l'élongation des acides gras puisque son inactivation dans la levure diminue les niveaux d'acide gras C26:0, une espèce qui provient probablement de l'élongation du palmitate (Gaigg et al. 2001).

V.2.4 Effets transcriptionnels

L'expression d'ACBP dans la cellule est majoritairement cytoplasmique, mais peut être trouvée dans l'ER et l'appareil de Golgi. Sa translocation vers ces deux organelles est dépendante de sa liaison à un ligand, dans ce cas-ci, un Acyl-CoA (Hansen et al. 2008, Manjithaya et al. 2010). ACBP peut aussi être retrouvé dans le noyau, sa présence dans le noyau est probablement liée à l'effet transcriptionnel des Acyl-CoA (Elholm et al. 2000). Il a été montré que, dans le noyau de cellules hépatiques, ACBP peut interagir directement avec le facteur de transcription Hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF-4 α). L'interaction directe est observée par le changement conformationnel d'HNF-4 α suite à son interaction avec ACBP, leur co-immunoprécipitation à partir d'extraits hépatiques, ainsi que leur colocalisation par immunofluorescence et microscopie électronique qui les place à 53 et 43 Å de distance (Petrescu et al. 2003). Le facteur de transcription HNF-4 α est un régulateur de plusieurs gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des lipides tels que plusieurs apolipoprotéines, microsomal triglyceride transfer protein, cholesterol 7 α hydroxylase, FABP et PPAR α (Hayhurst et al. 2001).

Il est aussi suggéré qu'ACBP puisse affecter l'expression d'autres gènes du métabolisme des lipides. Sa surexpression chez le rat entraîne une diminution des niveaux d'expression de PPAR γ et δ ainsi que SREBP-1 dans le foie et le tissu adipeux (Oikari et al. 2008). ACBP peut donc interagir directement avec certains facteurs de transcriptions pour réguler l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras. ACBP en plus d'être impliqué directement dans le métabolisme

intracellulaire des acides gras, semble aussi l'être de façon indirecte en agissant sur l'expression génique.

V.3 ACBP dans le système nerveux central

Comme mentionné plus haut, ACBP a été initialement identifié dans le cerveau, dans des préparations synaptiques, et a été nommé DBI pour sa capacité à inhiber la liaison du diazépam au récepteur GABA_A (Guidotti et al. 1983). Bien qu'ACBP et DBI soient en fait la même protéine, les fonctions qui lui sont attribuées en périphérie, concernant le métabolisme des Acyl-CoA, n'ont, jusqu'à ce jour, pas été étudiées dans le CNS. Dans le cerveau, ACBP ou DBI est exprimé majoritairement dans les astrocytes, les épendymocytes et les tanocytes (Lanfray et al. 2013), mais peut aussi être retrouvé dans les neurones (Alho et al. 1985). Des études de microscopie électronique ont montré qu'ACBP est enrichi dans le synaptosome et est associé aux vésicules synaptiques dans le cerveau de rat (Ferrarese et al. 1987). Dans le CNS, tout comme dans le foie, les niveaux d'expression d'ACBP peuvent être régulés par le statut nutritionnel. Les niveaux d'expression en ARN messager d'ACBP sont diminués d'environ 10 fois dans l'ARC et ailleurs dans le cerveau suite à un jeûne de 24h (Compere et al. 2010). Cette observation est compatible avec l'effet d'un jeûne sur l'expression d'ACBP dans le foie (Bhuiyan et al. 1995). La majorité des fonctions qui sont associées à ACBP dans le cerveau sont en lien avec le fait que cette protéine peut être sécrétée, puis clivée et agir sur d'autres populations de cellules cérébrales via deux types de récepteurs membranaires, le récepteur GABA_A, un récepteur ionotrope, ainsi qu'un GPCR, récepteur métabotrope (Guidotti et al. 1983, Patte et al. 1995). ACBP est ainsi impliqué dans la modulation du comportement d'anxiété, du comportement de conflit et de la prolifération neuronale via le récepteur « Central Benzodiazepine Receptor » (CBR), qui fait partie du récepteur GABA_A. ACBP est aussi impliqué dans la synthèse des neurostéroïdes via le récepteur périphérique des benzodiazépines (Do-Rego et al. 1998, Do-Rego et al. 2001). Finalement, ACBP est capable de moduler la prise alimentaire en agissant sur un récepteur métabotrope ou GPCR (do Rego et al. 2007).

V.3.1 Clivage et sécrétion

À l’instar de plusieurs autres neuropeptides comme POMC, ACBP peut être clivé pour produire différents peptides fonctionnels. La digestion trypsique d’ACBP génère les peptides Octadecaneuropeptide (ODN) et Triakontatétraneuropeptide (TTN). ACBP et l’ensemble de ses produits de clivage ont été nommés endozépines puisque ces peptides endogènes agissent sur le récepteur des benzodiazépines « endogenous benzodiazepine receptor ligand ». Ces endozépines sont associés aux synaptosomes dans les neurones et peuvent être sécrétés suite à la dépolarisation des membranes neuronales par le KCl (Ferrarese et al. 1987). Toutefois, les travaux récents montrant une localisation essentiellement gliale remettent en question l’expression neuronale décrite par le groupe de Costa. La sécrétion d’ACBP et/ou de ses produits de clivage a beaucoup été étudiée puisqu’elle est essentielle au rôle présumé d’ACBP en tant que neurotransmetteur. Plusieurs signaux incluant la voie de l’autophagie (Manjithaya et al. 2010), l’amyloïde β (Tokay et al. 2005) et le cortisol (Loomis et al. 2010) sont capables d’induire la sécrétion d’ACBP dans des cultures d’astrocytes. Les différents produits de clivages connus d’ACBP sont résumés dans la Figure 10

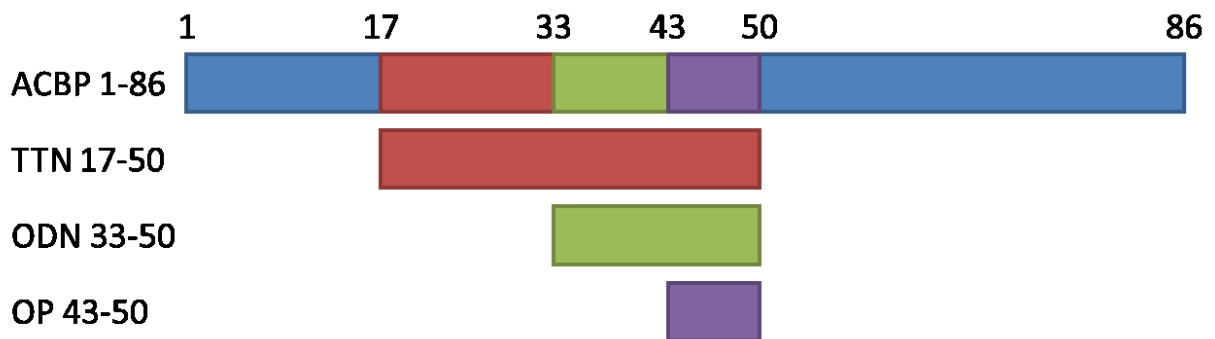


Figure 10 : Représentation schématique des différents produits de clivage d’ACBP.

ACBP (1-86) peut être clivé à plusieurs positions pour produire un ou plusieurs peptides considérés comme endozépines. Abréviations : (TTN) Triakontatétraneuropeptide (17-50), (ODN) Octadecaneuropeptide (33-50), (OP) Octapeptide (43-50).

V.3.1.1 Octadecaneuropeptide (ODN)

ODN est un des deux produits majeurs du clivage d'ACBP, comme son nom l'indique, ODN est un peptide de 18 acides aminés formé des acides aminés 33-50 d'ACBP. Tout comme ACBP, ODN a la capacité de lier le récepteur CBR faisant partie du complexe GABA_A et d'empêcher la liaison du diazépam, ainsi que des substances anxiogènes comme les β-carbolines. La capacité d'ODN à inhiber la liaison de ces substances au CBR est en fait supérieure à celle d'ACBP, ce qui suggérerait que l'action d'ACBP sur ce récepteur implique son clivage en ODN (Ferrero, Santi, et al. 1986). Ceci est corroboré par le fait que l'administration d'ODN en ICV produit les mêmes effets que l'administration de la protéine complète sur la prise alimentaire sur les comportements reliés à l'anxiété ainsi que le comportement de conflit. De plus, dans la plupart des cas, l'effet d'une administration d'ODN est plus rapide que l'administration d'ACBP (De Mateos-Verchere et al. 1998). ODN peut lui-même être clivé pour former un peptide biologiquement actif de 8 acides aminés, octapeptide (OP). Ce peptide, qui est composé des 8 derniers acides aminés C-terminal d'ODN, a les mêmes effets que ce dernier sur l'augmentation de la concentration en Ca⁺⁺, effet dépendant du récepteur GABA_A, ainsi que sur la prise alimentaire, effet dépendant du récepteur métabotrope (Leprince et al. 1998, do Rego et al. 2007).

V.3.1.2 Triakontatétraneuropeptide (TTN)

TTN, comme son nom l'indique, est un peptide de 34 acides aminés. Il est le premier produit de clivage d'ACBP (résumé à la Figure 10) et est formé des acides aminés 17-50 d'ACBP. À l'instar d'ODN, TTN est capable de se lier au site de reconnaissance des benzodiazépines. Par contre, le site d'action de TTN n'est pas sur le récepteur CBR, mais plutôt sur le « Peripheral Benzodiazepine Receptor » (PBR) (Slobodyansky et al. 1989). L'administration ICV de TTN produit des effets similaires sur l'anxiété qu'ODN. Ces effets peuvent être bloqués par des inhibiteurs spécifiques de PBR, mais pas par les inhibiteurs de CBR. De plus, l'augmentation de la concentration d'ions Ca⁺⁺ intracellulaire engendrée par TTN est additive à celle d'ODN et engendre une augmentation plus importante. Ceci suggère que ces deux peptides, quoique très similaires, agissent sur deux récepteurs différents (Gandolfo et al. 2001). Le récepteur PBR, contrairement à ce que son nom suggère, est aussi exprimé dans le cerveau au niveau de la membrane mitochondriale externe, il est aussi connu sous le nom de « Translocator protein » et est responsable de l'entrée du cholestérol dans la mitochondrie pour la

synthèse des stéroïdes (Krueger and Papadopoulos 1990). En accord avec la fonction de PBR dans le transport du cholestérol, TTN peut augmenter les niveaux de synthèse des neurostéroïdes (Do Rego et al. 2009).

V.3.1.3 Sécrétion

L'association d'ACBP aux synaptosomes, observée par microscopie électronique, est une des premières indications que cette protéine a la capacité d'être sécrétée. La sécrétion d'ACBP a été démontrée pour la première fois dans des préparations d'explants provenant de diverses régions du cerveau, hypothalamus, cortex, striatum hippocampe. Ces différents explants sont capables de sécréter ACBP à l'état basal et la dépolarisation membranaire de ces derniers par le KCl provoque une augmentation de la relâche d'ACBP dans le milieu de culture (Ferrarese et al. 1987). ACBP est plus fortement exprimé dans les cellules gliales que dans les neurones, sa sécrétion dans le milieu de culture provient probablement majoritairement des cellules gliales. D'autres études montrent qu'ACBP est surtout sécrété par les cellules gliales, plus précisément par les astrocytes (Lamacz et al. 1996, Gach et al. 2015). Les cellules de Müller, des cellules gliales radiales de la rétine, ou une lignée immortalisée de ces cellules gliales peuvent sécréter ACBP lorsqu'elles sont traitées au KCl. La sécrétion d'ACBP dans ces cellules est dépendante de sa phosphorylation par PKC. Le phorbol miristic acetate (PMA), un activateur de la PKC, augmente la sécrétion d'ACBP. ACBP possède deux résidus thréonines compatibles avec le motif de reconnaissance pour une phosphorylation par la PKC. Enfin, les deux thréonines phosphorylées par la PKC sont dans le peptide ODN qui, lorsqu'il est phosphorylé, a une plus forte affinité pour le récepteur GABA_A qu'ODN non phosphorylé (Qian et al. 2008). Comme pour les cellules gliales Müller, le traitement de cultures d'astrocytes primaires provenant du cerveau induit la sécrétion d'ACBP. Dans ce système, plusieurs stéroïdes, comme le cortisol et le pregnenolone, sont aussi capables d'induire cette sécrétion. Dans le cerveau, le pregnenolone est converti en pregnenolone sulfate qui est capable d'induire la sécrétion d'ACBP à de plus forts niveaux que le pregnenolone. Le pregnenolone sulfate peut être produit dans le cerveau où il a la capacité de diminuer la transmission GABAergique, une fonction qui est conséquente avec son implication dans la sécrétion d'ACBP, un agoniste inverse du récepteur GABA_A (Loomis et al. 2010). La sécrétion d'ACBP, sous forme d'ODN, par les astrocytes peut aussi être induite par l'accumulation d'amyloïde β . La présence d'agrégats peptidiques d'amyloïde β dans le milieu de culture d'astrocytes primaire induit à

la fois une augmentation de la production intracellulaire d'ACBP, augmentation à la fois de la transcription en ARN ainsi que de la synthèse de la protéine, et une augmentation dose dépendante de sa sécrétion (Tokay et al. 2005). Cette augmentation de la production et/ou de la sécrétion d'ACBP, liée à la présence d'amyloïde β , a aussi un effet positif sur la prolifération et la survie de ces astrocytes en culture. Bien que l'étude citée ne fasse pas le lien direct entre la sécrétion d'endozépine et la prolifération et survie cellulaire, ce rôle potentiel d'ACBP dans le CNS sera abordé plus en détail dans les sections suivantes.

L'analyse de la séquence d'ACBP soulève un problème majeur en ce qui a trait à sa sécrétion. ACBP ne possède pas de séquence N-terminale lui permettant d'être transloqué vers l'ER et l'appareil de Golgi pour être sécrété par la voie de sécrétion classique des protéines. Il est suggéré qu'ACBP, comme plusieurs autres protéines, puisse être sécrété par un mécanisme de sécrétion non conventionnel. Ceci est mis en évidence par le fait que la sécrétion d'ACBP par des astrocytes en culture n'est pas inhibée en présence de brefeldin A, un inhibiteur de l'assemblage des vésicules d'exocytose dites classiques (Lafon-Cazal et al. 2003). Plusieurs études chez la levure et chez l'amibe ont montré que les mécanismes de sécrétion d'ACBP impliquent plusieurs protéines de la voie de l'autophagie. Chez la levure et l'amibe, l'autophagie induite par une privation nutritionnelle augmente la sécrétion d'ACBP dans le milieu extracellulaire, cette sécrétion requiert les étapes initiales de la voie de l'autophagie. L'inactivation d'un seul ou plusieurs gènes impliqués cette voie inhibe complètement la sécrétion d'ACBP. L'étape finale de l'autophagie, la fusion des autophagosomes et endosomes avec les vacuoles et les lysosomes, n'est pas requise pour la sécrétion d'ACBP dans ce modèle. En effet, l'invalidation des gènes impliqués dans la fusion des autophagosomes aux vacuoles n'a pas d'effet sur la relâche d'ACBP dans le milieu extracellulaire (Duran et al. 2010, Manjithaya et al. 2010). Les vésicules contenant ACBP fusionnent directement avec la membrane plasmique pour sécréter leur contenu dans le milieu extracellulaire. Le transport de ces vésicules est effectué via un mécanisme qui dépend de la protéine de l'assemblage de l'appareil de Golgi GRASP et leur fusion avec cette dernière requiert le complexe SNARE (Kinseth et al. 2007). Une des étapes essentielles à l'inclusion d'ACBP dans ces vésicules sécrétoires semble être la liaison d'ACBP à un Acyl-CoA, plus précisément les MCFA-CoA. L'inhibition de leur production dans le peroxyosome inhibe la sécrétion d'ACBP (Manjithaya et al. 2010). La translocation d'ACBP dans l'ER et l'appareil de Golgi est un autre processus, possiblement relié à sa sécrétion, qui nécessite la liaison d'un Acyl-CoA (Hansen et al. 2008). La sécrétion d'ACBP, stimulé par l'amyloïde β , nécessite une augmentation des niveaux de « cyclic Adenosin

monophosphate » (cAMP) ainsi que l'activation de la PKA, une kinase activée par le cAMP. L'inhibition de l'adenylyl cyclase ou de la PKA a pour effet d'inhiber la sécrétion d'ACBP, mais n'affecte pas la relâche basale d'ACBP (Tokay et al. 2008). Ce mécanisme de sécrétion, cAMP et PKA dépendant, semble impliquer le transporteur ATP-binding cassette, ce transporteur membranaire est exprimé dans les astrocytes en culture et peut être phosphorylé par la PKA, de plus son inhibition prévient la sécrétion d'ACBP stimulée par l'amyloïde β (Tokay et al. 2005, Masmoudi-Kouki et al. 2006).

Une fois sécrété, ACBP est ensuite clivé et peut agir sur deux différents types de récepteur, ionotropique et métabotropique, et donc produire des réponses différentes. Jusqu'à ce jour, uniquement un de ces deux récepteurs d'ODN a été identifié, soit le récepteur GABA_A. Nous allons brièvement décrire ces différents récepteurs avant d'introduire les fonctions d'ACBP et d'ODN dans le SNC.

V.3.2 Action sur le récepteur GABA_A

ACBP, ou son produit de clivage ODN, agissent principalement via deux types de récepteurs membranaires, un GPCR qui n'a pas encore été identifié et le récepteur ionotropique GABA_A. Le site de liaison du GABA se situe entre les sous-unités α et β , et sa liaison entraîne l'ouverture du canal calcique pour permettre l'entrée d'ions Cl⁻ et causer une hyperpolarisation de la membrane, ce qui inhibe la transmission synaptique. En plus du GABA, ce récepteur possède différents ligands potentiels incluant les benzodiazépines, plusieurs barbituriques, l'éthanol ainsi que plusieurs anesthésiques stéroïdiens et plusieurs autres (Mehta and Ticku 1999). Ces différents ligands possèdent pour la plupart un site de liaison allostérique, c'est-à-dire un site de liaison différent du ligand principal et module l'effet de ce dernier. Par exemple, le site de liaison des benzodiazépines sur le récepteur GABA_A est situé à l'interface des sous-unités α et γ tandis que le site de liaison du GABA est situé entre les sous-unités α et β . Les benzodiazépines potentialisent l'effet du GABA sur l'entrée d'ions Cl⁻. Ils sont donc considérés comme des « Positive Allosteric Modulator » (PAM) du récepteur GABA_A puisqu'ils agissent sur un site de liaison différent pour augmenter l'effet du ligand principal sur son récepteur. Les différentes configurations possibles des sous-unités du récepteur GABA_A lui permettent d'être sensible à différents ligands. Différents récepteurs GABA_A peuvent même être

retrouvés à l'intérieur d'un même neurone et plusieurs mécanismes régulent l'acheminement de ces sous-unités fonctionnellement différentes vers différents sites. Des études d'immunofluorescence ont montré que certains neurones peuvent exprimer différents assemblages du récepteur GABA_A à des sites intra et extrasynaptiques. De plus la cinétique de l'activation de ces récepteurs suggère qu'ils sont fonctionnellement distincts les uns des autres (Koulen et al. 1996, Banks and Pearce 2000). Les dérégulations de la transmission GABAergique, qu'elles soient associées à un défaut du récepteur ou dans la relâche du neurotransmetteur, sont impliquées dans plusieurs troubles comportementaux comme la dépression majeure, les troubles bipolaires, l'anxiété ainsi que des maladies comme l'épilepsie (Crestani et al. 1999, Sanacora et al. 2004, Craddock et al. 2010, Galanopoulou 2010). Le récepteur GABA_A est ainsi une cible thérapeutique attrayante pour plusieurs de ces désordres, et ce, malgré la grande diversité des sous-unités de ce récepteur qui augmente les possibilités d'effets secondaires. Le diazépam est le parfait exemple de cette problématique, ses effets anxiolytiques sont accompagnés d'effets sédatifs et de risques de dépendance. Le site de reconnaissance des benzodiazépines sur le récepteur GABA_A est situé à l'intersection des sous-unités α et γ voir (Figure 10), ce site a été identifié comme le récepteur central de benzodiazépines ou CBR. Les différents effets du diazépam peuvent être attribuables aux différentes sous-unités α pouvant former le site $\alpha\gamma$ du récepteur GABA_A, l'effet anxiolytique est dépendant principalement de la sous-unité α_2 et à plus faible niveau α_3 , tandis que l'effet sédatif dépend d' α_1 (Braat and Kooy 2015).

V.3.2.1 Modulation allostérique du récepteur GABA_A par ACBP

ACBP ainsi que ses différents produits de clivages sont capables de se lier au site de reconnaissance des benzodiazépines. ACBP, ODN et OP lient CBR sur le récepteur GABA_A alors que TTN se lie à PBR comme démontré par leur administration avec des antagonistes sélectifs pour CBR et PBR (Mohler 2014). La liaison d'ACBP sur le récepteur CBR a pour effet d'inhiber la liaison des benzodiazépines, ACBP peut donc être considéré comme un « Negative Allosteric Modulator » (NAM) ou agoniste inverse du récepteur GABA_A (Farzampour et al. 2015).

Bien que la majorité des études sur la modulation du récepteur GABA_A par ACBP s'accordent pour dire qu'il agit en tant que NAM, une étude récente suggère qu'il puisse aussi agir comme PAM dans certaines conditions ou régions cérébrales. Dans cette étude, ACBP ou un de ses peptides, agit

comme PAM spécifiquement dans le noyau thalamique réticulaire. La potentialisation de l'activité du récepteur GABA_A dans ce noyau est absente si le site CBR est altéré, suite à l'ajout de l'antagoniste de GABA flumazenil ainsi que chez les souris ACBP KO, suggérant que ce dernier agisse effectivement comme PAM (Christian et al. 2013). Les auteurs suggèrent plusieurs mécanismes par lesquels ACBP puisse agir de façon non conventionnelle. Ils évoquent la possibilité d'un sous-type de récepteur GABA_A spécifique au noyau thalamique réticulaire, un effet différentiel dose dépendant d'ACBP et finalement une modification post traductionnelle d'ACBP spécifique à ce noyau. Bien que ces auteurs favorisent la troisième explication, il reste possible que la potentialisation de la transmission GABAergique par ACBP s'explique par un effet indirect impliquant les neurostéroïdes puisque l'inhibition locale de leur synthèse diminue l'activité du récepteur (Christian et al. 2013). En effet, TTN, par l'activation de PBR, augmente la synthèse des neurostéroïdes qui peuvent, à leur tour augmenter la transmission GABAergique (Farzampour et al. 2015). La majorité des données de la littérature s'accorde pour dire qu'ACBP est un NAM du récepteur GABA_A, il est cependant possible qu'il puisse agir comme un PAM dans certaines conditions ou régions spécifiques du CNS.

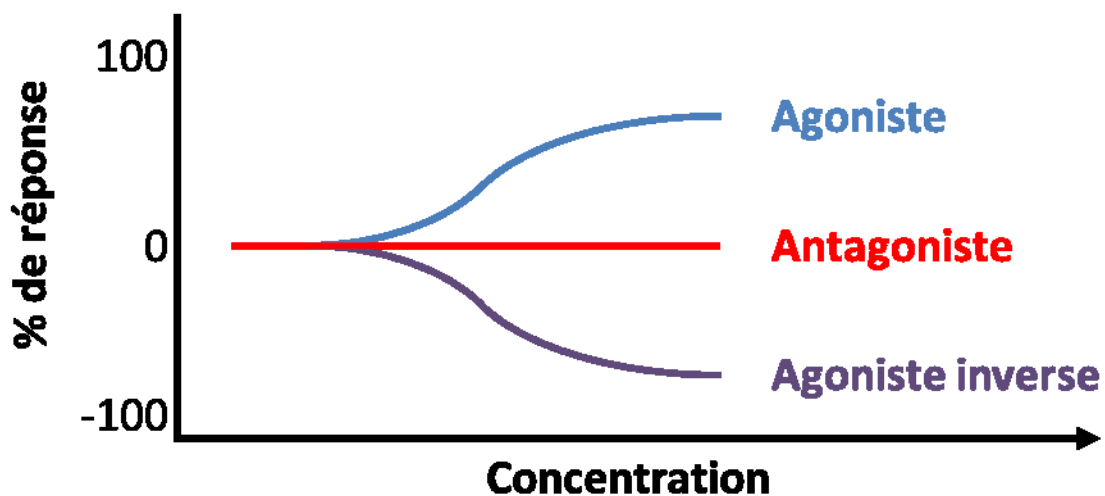


Figure 11 : Représentation du mode d'action de différentes substances sur un récepteur.

Un agoniste est une substance capable de lier un récepteur au même site que le ligand endogène et produit ainsi le même effet que ce dernier. Les agonistes peuvent être classifiés comme agoniste complets, capable d'activer le récepteur à un niveau identique au ligand endogène, ou agoniste partiel, capable d'activer le récepteur à un niveau inférieur au ligand endogène. L'agoniste inverse, comme son nom l'indique, produit un effet inverse à celui du ligand endogène. Les agonistes et

agonistes inverses, de façon générale, lient le récepteur au site de liaison du ligand endogène et ne requièrent pas la présence de ce dernier. Un antagoniste est une substance qui prévient l'effet du ligand endogène et, contrairement aux agonistes, ne peut produire un effet par lui-même et nécessite la présence du ligand.

V.3.3 Récepteur métabotrope

ODN est capable d'engendrer une augmentation rapide et transitoire de la concentration de calcium intracellulaire (Ca^{++}) dans les astrocytes (Lamacz et al. 1996). Cette activation ne résulte pas de l'activation du récepteur GABA_A puisque son activation ne produit pas d'augmentation du Ca^{++} et son inhibition ne prévient pas la mobilisation du calcium intracellulaire induite par ODN. L'inhibition du récepteur PBR n'a aucun effet sur l'augmentation du Ca^{++} intracellulaire induite par ODN, ce qui indique que cet effet d'ODN est indépendant des récepteurs des benzodiazépines (Gandolfo et al. 1997). De plus, plusieurs effets d'ACBP et d'ODN ne sont pas dépendent de l'activation du récepteur GABA_A . Ceci suggère que ces effets nécessitent potentiellement l'activation d'un second récepteur membranaire. Le second récepteur impliqué dans l'action d'ACBP, ou ses produits de clivages ODN et OP, est un récepteur métabotrope qui n'a pas encore été identifié. Plusieurs données suggèrent que ce récepteur membranaire est couplé à une activation de la phospholipase C (PLC) par une protéine G sensible à la toxine pertussique (Patte et al. 1995). L'administration d'ODN augmente rapidement et de façon transitoire les niveaux d'inositol triphosphate (IP_3) et diminue les niveaux de phosphatidylinositol biphosphate (PIP_2). L'activation du second messager IP_3 entraîne à son tour l'ouverture des canaux calciques au niveau de l'ER lisse pour élever la concentration de Ca^{2+} intracellulaire. Cette augmentation des niveaux d' IP_3 nécessite l'activation de la PLC ainsi que d'une protéine $\text{G}_{\alpha i}$ sensible à la toxine pertussique, puisque l'ajout de cette toxine bloque l'augmentation des niveaux d' IP_3 et la diminution de PIP_2 (Patte et al. 1995). Le récepteur métabotrope activé par ODN serait un GPCR couplé aux protéines $\text{G}_{\alpha i}$ et $\text{G}_{\alpha q}$ (sensible à la toxine pertussique et nécessitant l'activation de la PLC). Bien que l'identité de ce récepteur soit encore inconnue, le groupe de Tonon a été capable de synthétiser un agoniste ainsi qu'un antagoniste fonctionnel de ce récepteur. Pour la synthèse de l'antagoniste, ils se sont basé sur la forme active d'ODN la plus courte, le peptide OP, et ont modifié un à un les 8 acides aminés de ce peptide. Ils ont alors comparé la capacité des peptides modifiés à augmenter les niveaux de Ca^{++} comparée à ODN et OP. La substitution de la leucine en position 5 d'OP par une alanine abolit complètement l'effet du peptide. Ils ont donc synthétisé ces deux peptides sous forme cyclique pour produire l'agoniste cyclo OP (cOP) et l'antagoniste cyclo [D-

Leu5] OP (cdLOP). L'administration de cOP mime l'effet d'ODN et d'OP, confirmant son statut d'agoniste. L'administration seule de cdLOP n'a aucun effet tandis que son administration avec ODN ou OP abolit leurs effets, suggérant qu'il s'agit bien d'un antagoniste et non pas d'un agoniste inverse (Leprince et al. 1998, Leprince et al. 2001).

V.3.4 Synthèse des neurostéroïdes

Les hormones stéroïdiennes sont essentielles au fonctionnement du CNS et sont impliquées dans plusieurs processus comportementaux tels la réponse au stress, l'anxiété, le sommeil ainsi que dans la régulation de la prise alimentaire. Malgré ces fonctions essentielles dans le cerveau, il a pendant longtemps été assumé que leur synthèse était exclusivement périphérique. Plusieurs observations importantes ont remis cette croyance en question. La première est que certains stéroïdes, comme le pregnenolone, se retrouvent à de plus fortes concentrations dans le cerveau qu'en périphérie et que leurs niveaux restent plus élevés même après une adénectomie et castration. Finalement les variations circadiennes de leurs concentrations dans le cerveau ne sont pas synchronisées avec les variations périphériques. Ces observations suggèrent qu'il existe une source centrale de synthèse de neurostéroïdes (Do Rego et al. 2009).

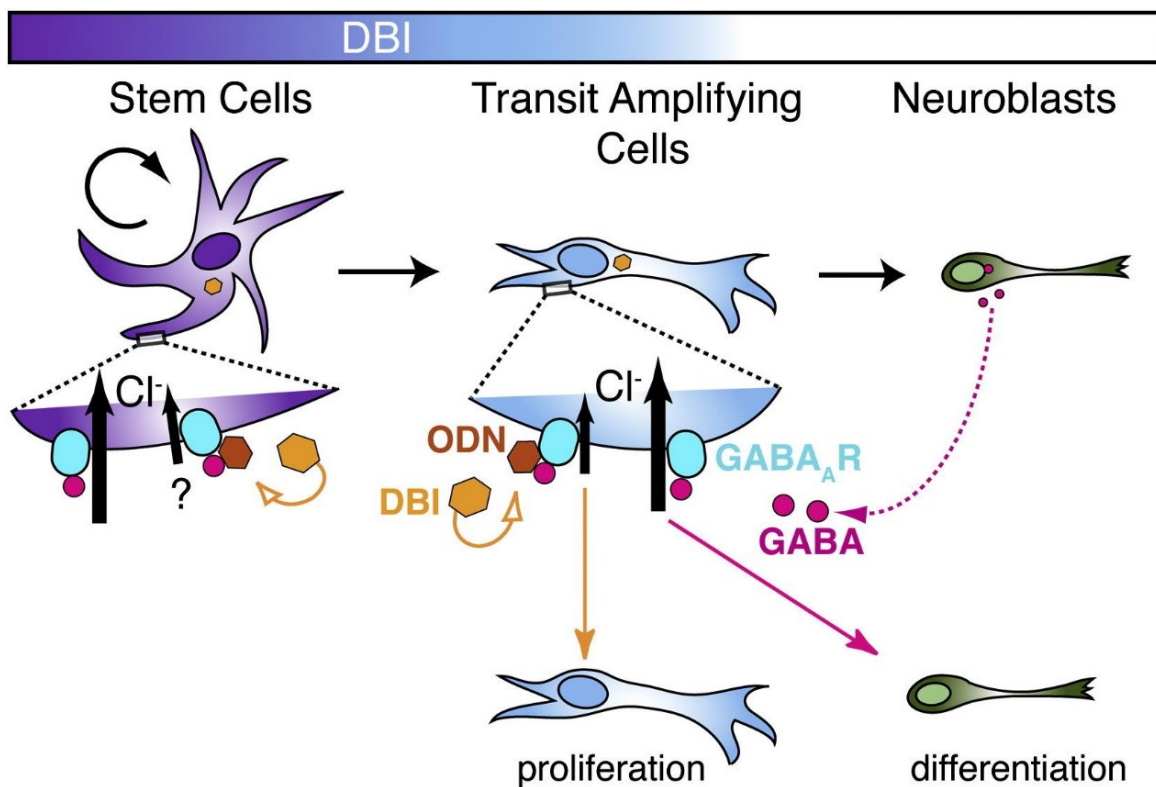
Plusieurs données suggèrent que le récepteur GABA_A est impliqué dans la synthèse des neurostéroïdes via son inhibition. ODN, un inhibiteur du récepteur GABA_A, pourrait alors stimuler la synthèse des neurostéroïdes (Do-Rego et al. 2000, Do-Rego et al. 2001). TTN, un autre peptide dérivé d'ACBP, est aussi capable d'induire la relâche de neurostéroïdes via son action sur PBR (Do-Rego et al. 1998). Les neurostéroïdes jouent des rôles dans plusieurs processus comportementaux comme le stress, l'anxiété, le comportement de conflit, la dépression ainsi que la prise alimentaire. Le fait qu'ODN et TTN soient impliqués dans la modulation centrale de ces processus ainsi que la synthèse des neurostéroïdes suggère que ces derniers puissent être les effecteurs en aval de ces deux endozépinines (Do Rego et al. 2009). PBR aussi connue comme translocator protein (TSPO), est responsable de l'entrée du cholestérol dans la mitochondrie pour la synthèse des stéroïdes en périphérie ainsi que dans le CNS et serait même essentielle à leur synthèse (Papadopoulos et al. 1997, Papadopoulos et al. 2006). Récemment, l'implication de TSPO dans la synthèse des stéroïdes a été

remise en question par deux études d'invalidation. Ces deux études, dont une utilisant un KO complet, montrent que l'ablation de TSPO ne produit pas de défauts développementaux ou de synthèse des stéroïdes en périphérie (Morohaku et al. 2014, Tu et al. 2014). Par contre, les auteurs de ces études n'ont pas vérifié si la synthèse ou les niveaux de stéroïdes sont altérés dans le cerveau. Bien que le rôle de PBR ou TSPO dans le transport du cholestérol la mitochondrie soit remise en doute, ceci n'exclue pas que les endozépines dérivées d'ACBP puissent être impliquées dans ce processus.

V.3.5 Prolifération et neuroprotection

Les benzodiazépines sont reconnues pour avoir un rôle potentiel dans la prolifération cellulaire, plusieurs études démontrent qu'elles peuvent inhiber la prolifération en périphérie (Wang et al. 1984, Morgan et al. 1985) ainsi que dans le CNS (Pawlikowski et al. 1988, Bruce et al. 1991). En tant qu'inhibiteur de la liaison des benzodiazépines, il est possible pour ACBP de jouer un rôle positif dans la prolifération cellulaire. Il a été démontré que les endozépines ODN et TTN peuvent augmenter, de façon dose dépendante, l'incorporation de la [³H]thymidine dans les cultures primaires d'astrocytes. Cette augmentation est dépendante de leurs récepteurs respectifs (Gandolfo et al. 1999, Gandolfo et al. 2000). L'implication d'ACBP dans la prolifération des astrocytes pourrait en fait être un effet neuroprotecteur. En effet, lorsqu'exposés à des agrégats d'amyloïde β , les astrocytes produisent et sécrètent ODN dans le milieu de culture et augmentent leurs niveaux de prolifération (Tokay et al. 2005). L'augmentation de la sécrétion d'ODN dans ces cultures d'astrocytes est aussi accompagnée par une augmentation de la relâche d'IL-1 β . L'addition d'ODN aux cultures d'astrocytes est suffisante pour induire les mêmes niveaux de sécrétion d'IL-1 β que l'amyloïde. De plus l'IL-1 β a par elle-même un effet positif sur la prolifération des astrocytes en culture (Parish et al. 2002). Ceci suggère qu'ODN peut être sécrété en réponse à un stress et augmenter la sécrétion d'interleukine ayant un effet sur la prolifération. Il est important de distinguer l'effet proliférateur d'ODN *in vitro* d'un effet sur des neurones postnataux *in vivo*. En effet, la majorité des neurones sont déjà formés dans le cerveau postnatal et la prolifération cellulaire est très restreinte, voire même absente dans la plupart des cas. Ceci n'est pas vrai pour toutes les populations neuronales postnatales, la SVZ est largement composée de cellules progénitrices capables de prolifération et vont en grande partie, migrer vers le

bulbe olfactif. Pour étudier l'implication d'ACBP dans cette population, Alfonso et al. ont injecté directement dans la SVZ, un virus exprimant soit un shRNA pour diminuer l'expression d'ACBP, ou la protéine ACBP dans le but de la surexprimer. Ces virus servent aussi à marquer les cellules infectées pour suivre leur migration vers le bulbe olfactif (Alfonso et al. 2012). L'inhibition de l'expression d'ACBP par cette approche réduit le nombre de cellules migrant vers le bulbe olfactif, indiquant une diminution de leur prolifération. À l'inverse, la surexpression d'ACBP à l'effet opposé soit d'augmenter le nombre de cellules en migration. Cette augmentation de la prolifération est due à l'action d'ODN via le récepteur CBR. L'inhibition de ce récepteur diminue les courants inhibiteurs GABA ce qui les empêche de quitter le cycle cellulaire pour amorcer le processus de différenciation (Alfonso et al. 2012). Au cours de leur migration, ces cellules progénitrices vont être exposées à de plus faibles niveaux d'expression d'ACBP et ainsi amorcer le processus de différenciation, ce processus est résumé dans la Figure 12.



Reproduit avec la permission de Alfonso et al. 2012

Figure 12 : Modèle décrivant la prolifération cellulaire induite par l'endozépine ODN.

ODN agit sur le récepteur GABA_A pour inhiber la transmission GABAergique sur les cellules progénitrices qui continuent à proliférer et à migrer vers leur destination finale. Durant leur migration, les cellules progénitrices qui sont exposées à de plus faibles concentrations d'ODN, redeviennent sensibles au neurotransmetteur GABA et quittent le cycle cellulaire pour amorcer le processus de différenciation et devenir des interneurons. Abréviations : (GABA) γ-aminobutyrique acid, (Cl⁻) Ion chlorure, (DBI) Diazepam Binding Inhibitor, (ODN) Octadecaneuropeptide.

ACBP peut aussi avoir un effet protecteur contre le stress oxydatif dans un système d'astrocytes en culture. L'exposition prolongée à un stress oxydatif via l'ajout de concentration croissante de peroxyde d'hydrogène ou H₂O₂, entraîne une diminution des niveaux d'enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase et la catalase. L'ajout d'ODN dans ces conditions, en plus de restaurer l'expression et l'activité de ces deux enzymes, réduit les niveaux d'apoptose. Ces effets d'ODN sont indépendants de son action sur CBR, ils dépendraient plutôt de l'activation du récepteur métabotropique d'ODN et à l'activation de la PKA (Hamdi et al. 2011, Hamdi et al. 2012, Hamdi et al. 2015). ODN, s'il est sécrété en réponse à un stress oxydatif, pourrait donc avoir un effet protecteur sur les astrocytes et possiblement sur les neurones avoisinants. Bien que les auteurs ne montrent pas que c'est bel et bien le cas, le même groupe a déjà montré qu'ACBP ou ODN peut être sécrété suite à l'accumulation d'amyloïde β (Tokay et al. 2005). Il n'est donc pas déraisonnable de croire qu'ACBP puisse aussi être sécrété en réponse à un stress oxydatif.

V.3.6 Comportements liés à l'anxiété

Les altérations de la transmission GABAergique sont étroitement liées à plusieurs troubles comportementaux comme la dépression et l'anxiété (Crestani et al. 1999, Sanacora et al. 2004, Craddock et al. 2010). Le récepteur GABA_A est le récepteur cible de plusieurs antidépresseurs, dont les benzodiazépines. ACBP, aussi connu comme DBI pour sa capacité à inhiber la liaison des benzodiazépines au récepteur GABA_A, est donc probablement impliqué, via l'inhibition de la transmission GABA, dans la modulation de l'anxiété. Dans le cadre de la toute première étude sur ACBP, portant sur son identification et sa caractérisation, il a été suggéré que l'administration ICV de cette protéine antagonise l'effet anti-conflit du diazépam et élicite un comportement de pro-conflit

(Guidotti et al. 1983). La plus forte capacité d'ODN à déplacer le diazépam de son récepteur (Ferrero, Costa, et al. 1986) suggère qu'il serait la forme active d'ACBP *in vivo*. L'administration d'ODN a donc été plus souvent employée que la protéine complète dans les études comportementales. Son administration ICV chez la souris augmente à la fois les comportements agressifs (nombre et intensité des agressions) que défensif (nombre de morsures reçues avant la soumission) (Kavaliers and Hirst 1986). En raison de ses propriétés anxiogéniques, certains groupes ont même surnommé ODN le peptide de l'anxiété (Bender and Hertz 1986). L'administration de faibles doses d'ODN augmente les comportements liés à l'anxiété dans un test de compartiment sombre/clair où le temps passé dans le compartiment clair et exposé est un signe de la diminution de l'anxiété. ODN augmente le temps requis pour explorer le compartiment clair et diminue la durée de la première visite, ce qui est généralement interprété comme un signe d'anxiété. Cette augmentation du comportement anxieux est dépendante de l'activation du récepteur GABA_A étant donné que son antagoniste, le flumazénil, atténue l'effet d'ODN. Finalement, l'administration d'un fragment plus court d'ACBP, le peptide OP, produit les mêmes effets, mais agit plus rapidement qu'ODN, suggérant que le clivage d'ODN en OP puisse être une étape requise à l'effet *in vivo* (De Mateos-Verchere et al. 1998). Le sevrage chez les patients alcooliques provoque un état d'anxiété qui s'atténue progressivement. On observe des niveaux sanguins élevés d'ACBP au jour 1 du sevrage chez des patients alcooliques et diminue trois semaines après le début du sevrage (Adinoff et al. 1996). Ceci est en accord avec le rôle anxiogène d'ACBP et suggère qu'il est aussi présent chez l'homme.

V.3.7 Prise alimentaire

Il a déjà été suggéré que la modulation de CBR chez les rongeurs est capable d'altérer la consommation de diète riche en gras. L'activation de ce récepteur entraîne une augmentation de la prise alimentaire tandis que l'administration d'agoniste inverse produit une diminution (Cooper et al. 1985). ACBP et ODN étant considérés comme agonistes inverses de CBR, on s'attendrait à voir un effet anorexigène suite à leur administration par ICV chez les rongeurs. En effet, l'administration de 100 ng d'ODN diminue la prise alimentaire chez le rat ainsi que chez la souris (de Mateos-Verchere et al. 2001, do Rego et al. 2007). De plus, cet effet anorexigène a aussi été démontré dans un modèle animal plus simple comme le poisson rouge (Matsuda et al. 2007). L'anxiété est un facteur connu

pouvant diminuer la prise alimentaire, étant donné l'activité anxiogène d'ODN, les auteurs ont aussi administré du diazépam et ont montré que l'effet d'ODN sur la prise alimentaire n'est pas altéré. Ils ont aussi observé que l'administration chronique d'ODN permet de réduire la prise alimentaire ainsi que le poids corporel de ces souris sur plusieurs jours (de Mateos-Verchere et al. 2001). De plus, l'utilisation d'antagonistes de CBR, comme le flumazénil, a permis de montrer que l'effet anorexigène d'ODN n'implique pas ce récepteur, et par conséquent, n'est pas un effet de l'augmentation de l'anxiété. L'effet d'ODN sur la prise alimentaire serait plutôt dû à l'activation de son récepteur métabotropique. L'administration de l'antagoniste du récepteur métabotropique abolit l'effet d'ODN sur la prise alimentaire (do Rego et al. 2007). L'inhibition de la prise alimentaire est largement associée à l'activation des neurones POMC et de la voie de la mélanocortine, l'effet anorexigène d'ODN pourrait alors être expliqué par l'activation de la voie anorexigène POMC/ α -MSH. L'injection ICV d'ODN augmente les niveaux d'ARNm de POMC chez la souris ainsi que le poisson rouge. L'inhibition du récepteur MC4R bloque les effets d'ODN sur la prise alimentaire, ce qui indique que la voie de signalisation POMC/MC4R est en aval de l'action d'ODN (Compere et al. 2003, Matsuda et al. 2010). Finalement, l'utilisation de l'antagoniste du récepteur métabotropique suggère qu'ODN ou OP serait lié à l'état basal à son récepteur, il y'aurait donc un tonus endozépinergique sur ce récepteur (do Rego et al. 2007). Bien qu'il soit suggéré que l'action d'ACBP et/ou d'ODN soit sur les neurones POMC, il reste encore à déterminer si ACBP est bel et bien sécrété par les astrocytes *in vivo* et sur quelle population de neurones il agit. De plus, le récepteur métabotropique ciblé par ODN reste encore inconnu.

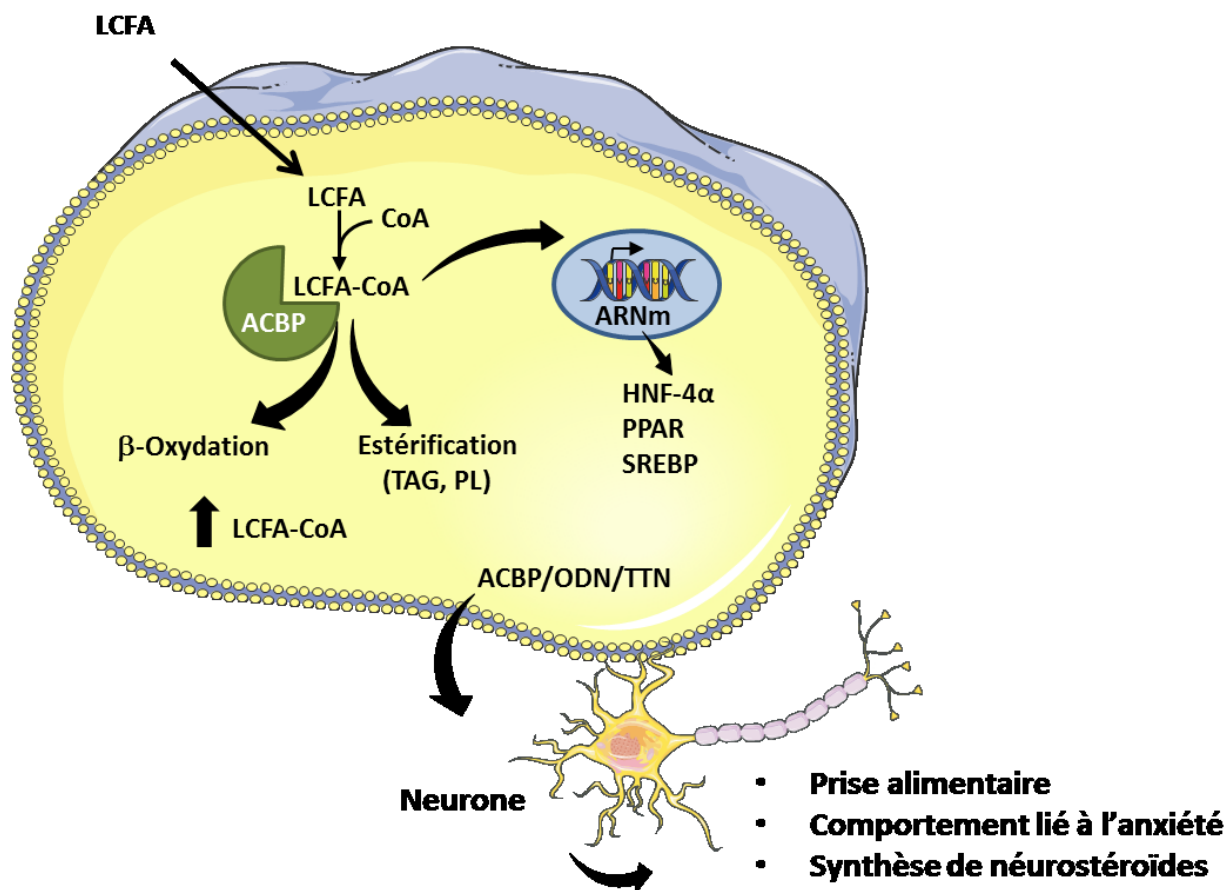


Figure 13 : Différents rôles connus d'ACBP dans le CNS et les tissus périphériques.

ACBP a plusieurs rôles proposés dans le CNS et dans divers tissus périphériques. ACBP en périphérie est impliqué dans l'accumulation des LCFA-CoA en les protégeant de l'hydrolyse, dans l'oxydation et dans l'estérification des LCFA-CoA, ainsi que dans la modulation de l'expression de gènes impliquée dans le métabolisme des lipides. Dans le CNS, ACBP peut être sécrété puis clivé pour moduler la prise alimentaire via un récepteur couplé aux protéines G, les comportements liés à l'anxiété via le récepteur GABA_A, ainsi que la synthèse des neurostéroïdes. Abréviations : (ACBP) Acyl-CoA Binding Protein, (ARNm) Acide ribonucléique messenger, (CoA) Coenzyme A, (HNF-4α) Hepatocyte Nuclear Factor 4α, (LCFA) Acide gras à longue chaîne, (ODN) Octadécaneuropeptide, (PL) Phospholipides, (PPAR) Peroxysome proliferator-activated receptor, (SREBP) Sterol regulatory element-binding proteins, (TAG) Triglycérides, (TTN) Triakontatétraneuropeptide.

L'implication d'ACBP dans le métabolisme des acides gras en périphérie est relativement bien étudiée. Cependant, ces divers rôles dans l'oxydation et l'estérification des acides gras au niveau du CNS restent encore méconnus. L'ensemble des données publiées sur les rôles centraux de cette protéine met l'accent sur son rôle en tant que protéine sécrétée et agissant sur le récepteur GABA_A et le récepteur métabotropique d'ODN. La possibilité que cette protéine puisse jouer un double rôle dans le cerveau, soit en tant que régulatrice du métabolisme intracellulaire des acides gras et en tant que protéine sécrétée potentiellement modulant l'activité neuronale, n'a pas encore été étudiée. De plus, plusieurs aspects de ce potentiel double rôle restent encore inconnus. Est-ce qu'ACBP est impliqué dans le métabolisme intracellulaire astrocytaire des lipides de la même manière qu'en périphérie, quel signal régule la sécrétion d'ACBP *in vivo*, le métabolisme intracellulaire des acides gras est-il requis pour cette sécrétion, quelle population neuronale est modulée par cette sécrétion et via quel type de récepteur? Dans le cadre de cette thèse, je vais adresser plusieurs de ces questions dans le but de mieux comprendre le ou les mécanismes par lesquels les acides gras agissent pour moduler la prise alimentaire et la balance énergétique.

Objectifs

Dans un contexte où le taux d'obésité est en forte hausse, causé en partie par la consommation excessive de nourriture riche en gras, il est essentiel de mieux comprendre et caractériser les effets des acides gras, notamment sur la régulation de la prise alimentaire et du métabolisme énergétique. Plusieurs données suggèrent que les acides gras, particulièrement les acides gras insaturés, peuvent être détectés au niveau de l'hypothalamus pour moduler la prise alimentaire. De plus, plusieurs indications suggèrent que leur métabolisme intracellulaire, notamment leur accumulation sous forme d'Acyl-CoA, est un composant important dans leur action sur la régulation de la prise alimentaire et de l'homéostasie glucidique. Malgré ces différentes données, plusieurs aspects cruciaux de la détection centrale des acides gras ainsi que de leurs effets sur l'homéostasie énergétiques restent encore méconnus. Parmi ces aspects non résolus, les mécanismes intracellulaires ainsi que le ou les différents types cellulaires impliqués dans leur détection ne sont pas identifiés. Ainsi nous proposons de caractériser le métabolisme des acides gras dans le MBH afin d'identifier le ou les types cellulaires impliqués, les mécanismes de régulation de leur métabolisme ainsi que leurs effets potentiels sur l'homéostasie énergétique *in vivo*. Ainsi, les travaux réalisés au cours de ma thèse peuvent être divisés en trois objectifs principaux ayant conduit à la publication de deux articles en co-premiers auteurs ainsi qu'à la soumission prochaine d'un troisième en premier auteur.

Étude 1 :

Le premier objectif de mes travaux de thèse, visant à caractériser la régulation du métabolisme hypothalamique des acides gras par le glucose, a été abordé dans l'étude 1. Ce premier objectif peut être divisé en quatre objectifs : 1) déterminer si le métabolisme des acides gras dans l'hypothalamus est régulé par le glucose, 2) identifier le mécanisme par lequel le glucose régule le métabolisme des acides gras et déterminer l'implication de l'AMPK dans cette régulation, 3) identifier le ou les types cellulaires impliqués dans cette régulation et 4) déterminer si les acides gras saturés (palmitate) ou insaturés (oléate) sont régulés différemment par le glucose. Pour répondre à ces questions, nous avons mesuré les taux d'oxydation et d'estérification du palmitate et de l'oléate dans des modèles de neurones hypothalamiques, d'astrocytes ainsi que des explants hypothalamiques et corticaux.

Étude 2 :

La deuxième étude s'inscrit dans la continuité de l'étude 1, dans laquelle nous nous sommes focalisés sur une protéine potentiellement impliquée dans le métabolisme astrocytaire des acides gras. Ayant

déterminé dans le cadre de la première étude que le métabolisme des acides gras était régulé par le glucose et que les astrocytes avaient la plus grande capacité à oxyder les acides gras (comparé aux neurones), nous nous sommes intéressés au métabolisme et à la détection des acides gras dans les astrocytes. Bien que les mécanismes de la détection des acides gras ne soient pas aussi bien caractérisés que pour la détection du glucose, un certain consensus se dégage montrant que l'accumulation intracellulaire sous forme d'Acyl-CoA est essentielle à l'effet anorexigène des acides gras.

En périphérie, les acides gras sont transportés dans la cellule et sont rapidement estérifiés en Acyl-CoA et se lient à Acyl-CoA Binding Protein ou ACBP qui les stabilise en les protégeant de leur dégradation par hydrolyse. ACBP peut alors diriger ces Acyl-CoA, principalement les LCFA-CoA, vers les différentes étapes de leur métabolisme intracellulaire telles que l'oxydation et l'estérification. Dans le CNS, ACBP est connue en tant que Diazepam Binding Inhibitor ou DBI pour son action inhibitrice de la liaison des benzodiazépines sur le récepteur GABA_A et pour son action anorexigène. Malgré les différentes études sur le rôle d'ACBP/DBI dans le cerveau, aucune donnée n'existe sur son implication potentielle dans le métabolisme des acides gras dans le cerveau, et particulièrement dans les astrocytes. C'est pour cette raison que nous avons voulu évaluer la possibilité qu'ACBP joue un double rôle dans le CNS, soit dans le métabolisme astrocytaire des acides gras en plus de son rôle en tant que gliotransmetteur pour moduler l'activité neuronale.

Les objectifs de cette deuxième étude visent donc à 1) caractériser l'expression d'ACBP dans le cerveau relatif aux types cellulaires dans lequel il est exprimé, 2) évaluer l'implication d'ACBP dans la modulation du profil intracellulaire des Acyl-CoA, 3) son implication dans le métabolisme intracellulaire des acides gras, notamment l'oxydation et l'estérification et 4) déterminer si le métabolisme des acides gras est régulé de façon différentielle par ACBP selon leur saturation. Nous avons donc mesuré différents paramètres, incluent l'oxydation et l'estérification de différents acides gras saturés et insaturés, dans des modèles hypothalamiques et corticaux d'astrocytes primaires et d'explants provenant de souris ACBP WT et KO.

Étude 3 :

Suite aux données obtenues dans la deuxième étude, nous avons voulu déterminer si ACBP, via son double rôle dans le métabolisme des acides gras insaturés ainsi qu'en tant que protéine sécrétée

ayant une action anorexigène, pouvait être impliqué dans la régulation de la balance énergétique. Plusieurs études ont établi l'action anorexigène des acides gras insaturés dans l'hypothalamus. De plus, ODN, le peptide issu du clivage d'ACBP inhibe la prise alimentaire lorsqu'administré par injection ICV. Par contre, le rôle de la protéine endogène dans cette régulation de la prise alimentaire n'est toujours pas connu. Ceci nous a donc poussés à évaluer, via l'ablation génique astrocyte spécifique, le rôle d'ACBP dans la régulation de la prise alimentaire et des dépenses énergétiques ainsi qu'à explorer le ou les mécanismes par lesquels il agit.

Le but de cette troisième étude est ainsi de caractériser l'implication d'ACBP in vivo dans la régulation de la balance énergétique. Pour répondre à cette question, nous allons 1) déterminer si ACBP astrocytaire est impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire et la régulation du poids corporel, 2) déterminer si l'action anorexigène d'ODN implique l'activation des neurones anorexigène POMC et de la voie de la mélanocortine et 3) clarifier les rôles des récepteurs GABA_A et du récepteur métabotrope dans l'activation des neurones POMC par ODN.

Résultats

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

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

Publié dans le Journal of Biological Chemistry, 2013

Contribution des auteurs :

***Coauteurs principaux à contribution égale**

Khalil Bouyakdan : Coauteur principal, participé à la conception et la réalisation d'au moins la moitié des expériences ayant contribué à des figures, notamment les mesures du métabolisme in vitro et l'étude du profil génique des enzymes du métabolisme.

Bouchra Taïb : Coauteur principal, a élaboré les hypothèses et à la conception des expériences, et a réalisé au moins la moitié des expériences ayant contribué à des figures dans le présent papier. A analysé les données et rédigé le manuscrit.

Cécile Hryhorczuk : Coauteur, a apporté de l'aide pour la mise en place du modèle d'explants hypothalamiques

Demetra Rodaros : Coauteur, a apporté de l'aide technique à la mise en culture des astrocytes et a contribué à la mise au point des explants *ex vivo*.

Stephanie Fulton : Coauteur et collaborateur, contribution intellectuelle.

Thierry Alquier : Directeur de thèse des coauteurs, a dirigé le projet et rédigé le manuscrit.

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

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

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

¹Authors contributed equally to this work.

Running title: Glucose regulates fatty acid metabolism in the hypothalamus

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

Capsule

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

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

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

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

Abstract

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

Introduction

The hypothalamus controls energy homeostasis by integrating hormonal and nutrient signals such as long-chain fatty acids (LCFA) and glucose (Morton et al. 2006). The modulation of glucose homeostasis and food intake by glucose and LCFA relies on the intracellular metabolism of these nutrients. Esterification and oxidative metabolism of LCFA has been shown to mediate the effects of LCFA on glucose and energy homeostasis (Cruciani-Guglielmacci et al. 2004, Lam, Pocai, et al. 2005, Pocai et al. 2006, Benani et al. 2007), and the actions of glucose in the brain mainly involve changes in the AMP/ATP ratio (Jordan et al. 2010). In peripheral tissues, glucose regulates the partitioning of LCFA-CoA between oxidation and esterification, a process fundamental to glucose regulation of insulin release by the pancreatic beta cell (Prentki et al. 2013). Despite this knowledge, it is not known if glucose and LCFA metabolism is coupled in the hypothalamus, nor which cell types and intracellular signalling pathways are involved.

The coupling of glucose and LCFA metabolism in peripheral tissues is known to require specific glucose-derived metabolites and enzymes (Ruderman et al. 2003). Intracellular metabolism of glucose inhibits the activity of a key energy sensing enzyme, AMP-activated kinase (AMPK). Several studies have established the importance of AMPK in the medio-basal hypothalamus (MBH) in glucose sensing (Claret et al. 2007, Murphy et al. 2009), action (Yang et al. 2010) and the counterregulatory response to hypoglycemia (Alquier et al. 2007, McCrimmon et al. 2008). Glucose inhibition of hypothalamic AMPK leads to the activation of acetyl-CoA carboxylase (ACC), thereby leading to the generation of malonyl-CoA from glucose-derived acetyl-CoA (Hu et al. 2003, Wolfgang et al. 2007). In peripheral tissues it is known that malonyl-CoA inhibits LCFA-CoA mitochondrial oxidation via inhibition of carnitine palmitoyl transferase-1a (CPT-1a), the isoform expressed in the liver, and CPT-1b, the muscle isoform (Ruderman et al. 2003). In the hypothalamus, CPT-1a and CPT-1c, the brain-specific isoform, are expressed but only CPT-1a possesses the prototypical mitochondrial acyltransferase activity (Gao, Moran, et al. 2013). While inhibition of CPT-1a and LCFA-CoA oxidation by malonyl-CoA has been suggested in the brain (Hu et al. 2005, He et al. 2006, Wolfgang et al. 2007, Andrews et al. 2008, Lopez et al. 2008), this model is not consistent with the results of some studies showing that increased malonyl-CoA do not affect LCFA-CoA levels in the hypothalamus (Gao et al. 2007, Gao, Keung, et al. 2011, Gao, Casals, et al. 2013).

However, LCFA-CoA oxidation rates in response to glucose have never been measured in the hypothalamus.

Beyond changes in oxidative flux, it is also not known whether or not glucose affects LCFA-CoA partitioning between oxidation and esterification in the hypothalamus and if this process depends on AMPK. Hypothalamic neurons (Mountjoy and Rutter 2007) and glia (Guillod-Maximin et al. 2004, Lam, Gutierrez-Juarez, et al. 2005, Marty et al. 2005, Orellana et al. 2012, Lanfray et al. 2013) are both able to sense glucose, and the importance of astroglia in central nutrient sensing has been recently emphasized (Yi et al. 2011). It is unclear if glucose modulation of LCFA-CoA metabolism occurs in neurons and/or astrocytes and whether or not such a feature distinguishes hypothalamic nuclei from other brain regions. Finally, it remains to be elucidated if the type of LCFA (carbon chain length and saturation degree) differentially affects glucose-regulated LCFA metabolism. The goal of the present study was to: (1) determine whether or not glucose regulates LCFA metabolism in the hypothalamus; (2) establish if oleate and palmitate metabolism are differentially modulated by glucose; (3) identify the role of AMPK in glucose-regulated LCFA metabolism, and (4) identify which hypothalamic cell type(s) are involved. To this end, we have employed combination of *in vitro* models consisting of hypothalamic neurons, hypothalamic and cortical astrocytes cultures as well as *ex vivo* MBH and cortical slices to measure glucose metabolism, LCFA oxidation and esterification rates in response to glucose and pharmacological AMPK manipulation.

Experimental procedures

Reagents

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

Animals

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

Neuronal cell lines culture

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

Primary astrocytes culture and immunocytochemistry

Primary cultures of hypothalamic and cortical astrocytes were prepared from 1-day-old C57Bl/6 pups using a protocol adapted from the group of Magistretti (Gavillet et al. 2008). Briefly, after decapitation the brains were removed, the hypothalami and cortices were dissected and transferred into 6 well plates containing 2 ml of DMEM. The tissues were dissociated by passing through syringe needles of decreasing diameter (22G followed by 25G) 6 times. The cells were plated in poly-ornithine-coated T25 flasks and maintained in DMEM containing 25 mM glucose and supplemented with 44 mM NaHCO₃, 1% antibiotic-antimycotic and 10% FBS at 37°C in 95% O₂-5% CO₂. Astrocytes were cultured for 14 to 21 days before use (~70% confluence).

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

RNA and real-time quantitative PCR

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

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

Hypothalamic and cortical slices

The slice protocol was adapted from a protocol previously described (Kawashima et al. 2012). Following decapitation, the brain was rapidly removed and immersed in ice-cold cutting solution of the following composition (in mM): NaH₂PO₄-H₂O, 1.25; KCl, 2.5; MgCl₂-6H₂O, 7; CaCl₂-2H₂O, 0.5; NaHCO₃, 28; D-glucose, 8; L(+)-Ascorbate, 1; Na-Pyruvate, 3; HEPES, 5 and sucrose 200, pH 7.25 and osmolarity 310-320

mOsM, oxygenated with 95% O₂-5% CO₂. Four 300 µm thick sections containing the hypothalamus were cut from each rat using a Vibratome while being continuously immersed in ice-cold cutting solution. The MBH, which includes the arcuate nucleus plus the ventro- and dorso-median hypothalamus, and the medio-lateral area of the motor and somatosensory cortex were dissected on each section as previously described (Alquier et al. 2007, Kawashima et al. 2012).

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

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

Muscle and liver slices

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

LCFA oxidation in cultured neurons and astrocytes

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

Glucose utilization and oxidation in cultured neurons and astrocytes

Neurons and primary astrocytes grown in T25 flasks were starved in DMEM 1mM glucose for 2h and pre-incubated in DMEM 1 mM glucose containing 0.5% BSA during 30 min as described for LCFA oxidation. Cells were then incubated in presence of different glucose concentrations (1, 8 and 15mM), 0.3 mM palmitate pre-complexed to 0.5% BSA, D-[U-¹⁴C]-glucose (0.2 μCi/ml) and D-[5-³H]-glucose (0.5 μCi/ml). The reaction was stopped by the addition of 0.2 ml of 40% perchloric acid. ¹⁴CO₂ generated was counted to estimate glucose oxidation while ³H₂O was counted to estimate glucose utilization. The results were normalized by cell protein content.

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

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

LCFA esterification in cells and brain slices

Oleate and palmitate esterification into neutral lipids was measured using ^{14}C -labeled tracers and thin layer chromatography (TLC). Cells (neurons and astrocytes) grown in T25 flasks were starved for 2 h in DMEM 1 mM glucose followed by a pre-incubation of 30 min in the same media plus 0.5% BSA. Cells were then incubated during 2 h in presence of different glucose concentrations (1 and 15 mM), 0.3 mM palmitate or oleate pre-complexed to 0.5% BSA, [1- ^{14}C]-Palmitate or [1- ^{14}C]-Oleate (0.1 $\mu\text{Ci/ml}$). MBH slices were pre-incubated in aCSF 1 mM glucose for 30 min and then incubated during 2 h with different concentrations of glucose (1 and 10mM), 0.1 mM palmitate or oleate pre-complexed to 0.13% BSA and [1- ^{14}C]-Palmitate or [1- ^{14}C]-Oleate (2 $\mu\text{Ci/ml}$) at 37°C under constant bubbling with 95 % O_2 -5 % CO_2 .

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

Treatment for Western Blot analysis

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

with an AMPK or ACC primary antibody (1:1000, Cell Signaling). Chemiluminescence (Western Lightning, PerkinElmer Life Sciences) was quantified on scanned films using densitometry.

Statistics

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

Results

Glucose and LCFA oxidation are coupled via AMPK in hypothalamic neurons

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

Palmitate oxidation was measured in response to increasing glucose concentrations in both GT1-7 and N46 hypothalamic neurons. First, the CPT-1 inhibitor etomoxir significantly decreased palmitate oxidation by 38% and 70% in GT1-7 and N46 neurons respectively (Fig 2A and D). Second, increasing

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

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

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

Astrocytes are the most abundant cells in the central nervous system and are well known to oxidize LCFA (Edmond 1992). Therefore, we decided to investigate whether glucose regulates LCFA oxidation in astrocytes and whether there are potential differences in glucose action depending on the nature of the

astrocytes. To this end, we developed and validated mouse astrocyte cultures generated from cortices or hypothalami isolated from newborn mice (P1).

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

Palmitate oxidation was measured in response to glucose in hypothalamic and cortical astrocytes as described for hypothalamic neurons. Oxidation rates were decreased by ~ 75% in response to etomoxir in both astrocyte cultures (Fig 4A). No differences were observed in basal palmitate oxidation between hypothalamic and cortical astrocytes. However, palmitate oxidation was inhibited by glucose specifically in hypothalamic astrocytes (Fig 4A). Interestingly, the differential response to glucose was not related to differences in glucose utilization and oxidation in hypothalamic vs. cortical astrocytes (Fig 4B and C). To determine the implication of AMPK in glucose inhibition of palmitate oxidation, cortical and hypothalamic astrocytes were treated with AICAR in presence of high glucose (15 mM). Western blot analysis revealed that glucose decreased P-AMPK and P-ACC in hypothalamic astrocytes compared to low glucose conditions, an effect that was prevented by AICAR (Fig 4D and E). In cortical astrocytes, P-AMPK and P-ACC levels remained unchanged in response to glucose. In contrast, AICAR increased both P-AMPK and P-ACC in cortical astrocytes (Fig 4D and E). The inhibitory effect of glucose on palmitate oxidation was prevented by AICAR treatment in hypothalamic astrocytes whereas AICAR had no effect on palmitate oxidation in cortical astrocytes (Fig 4F).

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

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

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

To determine whether inhibition of LCFA oxidation translates into increased LCFA esterification, the incorporation of LCFA into neutral lipids was measured in N46 neurons, hypothalamic astrocytes

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

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

Discussion

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

Importantly, the effect of glucose was specific to the hypothalamus since phosphorylation of AMPK and palmitate oxidation in cortical astrocyte cultures or slices remained unchanged in response to glucose. The absence of glucose effect on cortical P-AMPK is in agreement with previous reports showing that high glucose, hypoglycemia or neuroglucopenia does not modulate AMPK activity in cortical areas (Minokoshi et al. 2004, Han et al. 2005, Alquier et al. 2007). Interestingly, the lack of response to glucose was not related to a lower capacity to metabolize glucose since the fold increase in glucose utilization and oxidation rates in response to glucose were similar in hypothalamic vs. cortical astrocytes and in MBH vs. cortical slices. This suggests a dissociation between glucose metabolism and AMPK activity that may involve differences in ATP generation and/or in the expression of the α 1-AMPK isoform in cortical vs. hypothalamic regions which is less sensitive to glucose compared to the α 2 isoform (Kim et al. 2004, Minokoshi et al. 2004, Alquier et al. 2007). Although it is difficult to speculate on mRNA levels, there is also a possibility that the increased expression of FAS and MCD in cortical astrocytes translates into lower levels of malonyl-CoA generated in response to glucose in cortical vs. hypothalamic astrocytes. Additional studies aimed at measuring glucose-derived metabolites in astrocytes will be required to address this hypothesis.

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

Our study also highlights important differences in palmitate oxidation rates between hypothalamic neurons vs. astrocytes as well as MBH vs. cortical slices. In agreement with previous reports suggesting that LCFA oxidation in the brain mainly occurs in astrocytes (Edmond et al. 1987, Edmond 1992), we found that palmitate oxidation is significantly higher in astrocytes compared to GT1-7 and N46 neurons. Interestingly, despite higher CPT-1a expression level in cortical astrocytes, palmitate oxidation rate was similar in hypothalamic and cortical astrocytes and was decreased to the same extent by etomoxir suggesting a similar oxidative capacity at low glucose concentration. In agreement with the literature (Gao, Moran, et al. 2013), we found that CPT-1a and 1c were the most abundant CPT-1 isoforms expressed in brain cells. However, the expression of CPT-1c in cultured astrocytes is not consistent with earlier studies showing a neuronal localization in the adult mouse brain (Dai et al. 2007, Sierra et al. 2008). This discrepancy could be related to the age of the animals used to generate astrocytes (P1) and/or the culture conditions.

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

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

In addition, in slices preparation, palmitate oxidation was about 3 fold higher in the MBH compared to cortical slices suggesting a higher LCFA oxidative capacity. In line with this finding, we observed a similar difference in palmitate oxidation between MBH and cortical slices obtained from mouse brain (data not shown). While the reason for this difference is unknown, this could be related to a lower number of

astrocytes in cortical vs. hypothalamic areas (Emsley and Macklis 2006) and/or differences in the expression of protein and enzymes involved in LCFA metabolism (LCFA transporters, acyl-CoA synthase and CPT-1) that may affect LCFA uptake. Nonetheless, our results are consistent with previous reports showing regional differences in palmitate oxidation and incorporation in rat (Kimes et al. 1983, Beverly and Martin 1991) or human brain (Karmi et al. 2010) and high level of palmitate incorporation in the arcuate nucleus compared to non-hypothalamic areas (Kimes et al. 1983) after systemic administration of radiolabeled palmitate tracers. In addition, in agreement with the former study *in vivo* (Kimes et al. 1983), we found here that palmitate oxidation rate in MBH and cortical slices was proportional to the rate of glucose utilization.

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

The degree of saturation and carbon chain length of LCFA are known to affect their metabolic fate, thus we hypothesized that oleate metabolism might be different compared to palmitate. In N46 neurons, we found that oleate oxidation at low glucose was significantly lower than palmitate oxidation. However, oleate oxidation was inhibited by glucose similarly to palmitate. These findings were not replicated in MBH slices where basal oleate oxidation was similar to palmitate oxidation and remained unchanged in response to glucose suggesting that oleate oxidation is not regulated by glucose and AMPK in MBH slices. This hypothesis was confirmed by experiments showing that palmitate but not oleate oxidation was significantly decreased by CpC in MBH slices. Importantly, oleate oxidation remained unchanged in response to CPT-1 inhibition by etomoxir. This strongly suggest that palmitate oxidation is mainly mitochondrial and CPT-1 dependent while oleate is preferentially oxidized in peroxisomes where oxidation is CPT-1 independent (Islinger et al. 2012) and therefore not altered by changes in glucose concentration or AMPK activity.

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

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

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

Our findings demonstrate that glucose-induced LCFA esterification is dependent on both LCFA and cell type. To our knowledge, this is the first study showing that glucose acutely increases LCFA esterification into DAG and TAG in hypothalamic neurons and slices. This suggests that chronic hyperglycemia and/or hyperlipidemia could lead to accumulation of lipids that may have deleterious effect on insulin sensitivity. This hypothesis is supported by recent studies showing that high-fat feeding increases hypothalamic DAG and TAG content in mice (Borg et al. 2012) and that palmitate induces insulin resistance in the arcuate nucleus (Benoit et al. 2009) and in N44 hypothalamic neurons (Mayer and Belsham 2010). Interestingly, activation of AMPK by AICAR prevented the deleterious effect of palmitate on insulin signalling in N44 neurons (Sierra et al. 2008). In light of our findings in a similar neuronal cell line, it is tempting to speculate that AMPK activation might increase palmitate oxidation while inhibiting

intracellular accumulation of lipid thereby protecting neurons from palmitate-induced lipotoxicity as already demonstrated in pancreatic beta cells (El-Assaad et al. 2003).

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

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

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

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

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

References

- Alquier, T.**, J. Kawashima, Y. Tsuji and B. B. Kahn (2007). "Role of hypothalamic adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase in the impaired counterregulatory response induced by repetitive neuroglucopenia." *Endocrinology* **148**(3): 1367-1375.
- Andrews, Z. B.**, Z. W. Liu, N. Wallingford, D. M. Erion, E. Borok, J. M. Friedman, M. H. Tschop, M. Shanabrough, G. Cline, G. I. Shulman, A. Coppola, X. B. Gao, T. L. Horvath and S. Diano (2008). "UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals." *Nature* **454**(7206): 846-851.
- Beall, C.**, D. L. Hamilton, J. Gallagher, L. Logie, K. Wright, M. P. Soutar, S. Dadak, F. B. Ashford, E. Haythorne, Q. Du, A. Jovanovic, R. J. McCrimmon and M. L. Ashford (2012). "Mouse hypothalamic GT1-7 cells demonstrate AMPK-dependent intrinsic glucose-sensing behaviour." *Diabetologia* **55**(9): 2432-2444.
- Benani, A.**, S. Troy, M. C. Carmona, X. Fioramonti, A. Lorsignol, C. Leloup, L. Casteilla and L. Penicaud (2007). "Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: redox regulation of food intake." *Diabetes* **56**(1): 152-160.
- Benoit, S. C.**, C. J. Kemp, C. F. Elias, W. Abplanalp, J. P. Herman, S. Migrenne, A. L. Lefevre, C. Cruciani-Guglielmacci, C. Magnan, F. Yu, K. Niswender, B. G. Irani, W. L. Holland and D. J. Clegg (2009). "Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents." *J Clin Invest* **119**(9): 2577-2589.
- Beverly, J. L.** and R. J. Martin (1991). "Influence of fatty acid oxidation in lateral hypothalamus on food intake and body composition." *Am J Physiol* **261**(2 Pt 2): R339-343.
- Blazquez, C.**, A. Woods, M. L. de Ceballos, D. Carling and M. Guzman (1999). "The AMP-activated protein kinase is involved in the regulation of ketone body production by astrocytes." *J Neurochem* **73**(4): 1674-1682.
- Borg, M. L.**, S. F. Omran, J. Weir, P. J. Meikle and M. J. Watt (2012). "Consumption of a high-fat diet, but not regular endurance exercise training, regulates hypothalamic lipid accumulation in mice." *J Physiol* **590**(Pt 17): 4377-4389.
- Claret, M.**, M. A. Smith, R. L. Batterham, C. Selman, A. I. Choudhury, L. G. Fryer, M. Clements, H. Al-Qassab, H. Heffron, A. W. Xu, J. R. Speakman, G. S. Barsh, B. Viollet, S. Vaulont, M. L. Ashford, D. Carling and D. J. Withers (2007). "AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons." *J Clin Invest* **117**(8): 2325-2336.
- Coleman, R. A.** and D. P. Lee (2004). "Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation." *Prog Lipid Res* **43**(2): 134-176.
- Cruciani-Guglielmacci, C., A.** Hervalet, L. Douared, N. M. Sanders, B. E. Levin, A. Ktorza and C. Magnan (2004). "Beta oxidation in the brain is required for the effects of non-esterified fatty acids on glucose-induced insulin secretion in rats." *Diabetologia* **47**(11): 2032-2038.
- Dai, Y.**, M. J. Wolfgang, S. H. Cha and M. D. Lane (2007). "Localization and effect of ectopic expression of CPT1c in CNS feeding centers." *Biochem Biophys Res Commun* **359**(3): 469-474.
- Edmond, J.** (1992). "Energy metabolism in developing brain cells." *Can J Physiol Pharmacol* **70 Suppl**: S118-129.
- Edmond, J.**, R. A. Robbins, J. D. Bergstrom, R. A. Cole and J. de Vellis (1987). "Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture." *J Neurosci Res* **18**(4): 551-561.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Islinger, M., S. Grille, H. D. Fahimi and M. Schrader (2012). "The peroxisome: an update on mysteries." *Histochem Cell Biol* **137**(5): 547-574.

Jordan, S. D., A. C. Konner and J. C. Bruning (2010). "Sensing the fuels: glucose and lipid signaling in the CNS controlling energy homeostasis." *Cell Mol Life Sci* **67**(19): 3255-3273.

Karmi, A., P. Iozzo, A. Viljanen, J. Hirvonen, B. A. Fielding, K. Virtanen, V. Oikonen, J. Kempainen, T. Viljanen, L. Guiducci, M. Haaparanta-Solin, K. Nagren, O. Solin and P. Nuutila (2010). "Increased brain fatty acid uptake in metabolic syndrome." *Diabetes* **59**(9): 2171-2177.

Kasser, T. R., R. B. Harris and R. J. Martin (1985). "Level of satiety: fatty acid and glucose metabolism in three brain sites associated with feeding." *Am J Physiol* **248**(4 Pt 2): R447-452.

Kawashima, J., T. Alquier, Y. Tsuji, O. D. Peroni and B. B. Kahn (2012). "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase is not involved in hypothalamic AMP-activated protein kinase activation by neuroglucopenia." *PLoS One* **7**(5): e36335.

Kim, M. S., J. Y. Park, C. Namkoong, P. G. Jang, J. W. Ryu, H. S. Song, J. Y. Yun, I. S. Namgoong, J. Ha, I. S. Park, I. K. Lee, B. Viollet, J. H. Youn, H. K. Lee and K. U. Lee (2004). "Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase." *Nat Med* **10**(7): 727-733.

Kimes, A. S., D. Sweeney, E. D. London and S. I. Rapoport (1983). "Palmitate incorporation into different brain regions in the awake rat." *Brain Res* **274**(2): 291-301.

Lam, T. K., R. Gutierrez-Juarez, A. Pocai and L. Rossetti (2005). "Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism." *Science* **309**(5736): 943-947.

Lam, T. K., A. Pocai, R. Gutierrez-Juarez, S. Obici, J. Bryan, L. Aguilar-Bryan, G. J. Schwartz and L. Rossetti (2005). "Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis." *Nat Med* **11**(3): 320-327.

Lanfray, D., S. Arthaud, J. Ouellet, V. Compere, J. L. Do Rego, J. Leprince, B. Lefranc, H. Castel, C. Bouchard, B. Monge-Roffarello, D. Richard, G. Pelletier, H. Vaudry, M. C. Tonon and F. Morin (2013). "Gliotransmission and brain glucose sensing: critical role of endozepines." *Diabetes* **62**(3): 801-810.

Le Foll, C., B. G. Irani, C. Magnan, A. A. Dunn-Meynell and B. E. Levin (2009). "Characteristics and mechanisms of hypothalamic neuronal fatty acid sensing." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **297**(3): R655-664.

Levin, B. E., C. Magnan, A. Dunn-Meynell and C. Le Foll (2011). "Metabolic sensing and the brain: who, what, where, and how?" *Endocrinology* **152**(7): 2552-2557.

Lopez, M., R. Lage, A. K. Saha, D. Perez-Tilve, M. J. Vazquez, L. Varela, S. Sangiao-Alvarellos, S. Tovar, K. Raghay, S. Rodriguez-Cuenca, R. M. Deoliveira, T. Castaneda, R. Datta, J. Z. Dong, M. Culler, M. W. Sleeman, C. V. Alvarez, R. Gallego, C. J. Lelliott, D. Carling, M. H. Tschop, C. Dieguez and A. Vidal-Puig (2008). "Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin." *Cell Metab* **7**(5): 389-399.

Madadi, G., P. S. Dalvi and D. D. Belsham (2008). "Regulation of brain insulin mRNA by glucose and glucagon-like peptide 1." *Biochem Biophys Res Commun* **376**(4): 694-699.

Marty, N., M. Dallaporta, M. Foretz, M. Emery, D. Tarussio, I. Bady, C. Binnert, F. Beermann and B. Thorens (2005). "Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors." *J Clin Invest* **115**(12): 3545-3553.

Mayer, C. M. and D. D. Belsham (2010). "Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons: rescue of resistance and apoptosis through adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase activation." *Endocrinology* **151**(2): 576-585.

McCrimmon, R. J., M. Shaw, X. Fan, H. Cheng, Y. Ding, M. C. Vella, L. Zhou, E. C. McNay and R. S. Sherwin (2008). "Key role for AMP-activated protein kinase in the ventromedial hypothalamus in regulating counterregulatory hormone responses to acute hypoglycemia." *Diabetes* **57**(2): 444-450.

Meegalla, R. L., J. T. Billheimer and D. Cheng (2002). "Concerted elevation of acyl-coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) activity through independent stimulation of mRNA expression of DGAT1 and DGAT2 by carbohydrate and insulin." *Biochem Biophys Res Commun* **298**(3): 317-323.

Minokoshi, Y., T. Alquier, N. Furukawa, Y. B. Kim, A. Lee, B. Xue, J. Mu, F. Fougelle, P. Ferre, M. J. Birnbaum, B. J. Stuck and B. B. Kahn (2004). "AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus." *Nature* **428**(6982): 569-574.

Morgan, K., S. Obici and L. Rossetti (2004). "Hypothalamic responses to long-chain fatty acids are nutritionally regulated." *J Biol Chem* **279**(30): 31139-31148.

Morton, G. J., D. E. Cummings, D. G. Baskin, G. S. Barsh and M. W. Schwartz (2006). "Central nervous system control of food intake and body weight." *Nature* **443**(7109): 289-295.

Mountjoy, P. D. and G. A. Rutter (2007). "Glucose sensing by hypothalamic neurones and pancreatic islet cells: AMPle evidence for common mechanisms?" *Exp Physiol* **92**(2): 311-319.

Murphy, B. A., K. A. Fakira, Z. Song, A. Beuve and V. H. Routh (2009). "AMP-activated protein kinase and nitric oxide regulate the glucose sensitivity of ventromedial hypothalamic glucose-inhibited neurons." *Am J Physiol Cell Physiol* **297**(3): C750-758.

Obici, S., Z. Feng, K. Morgan, D. Stein, G. Karkanias and L. Rossetti (2002). "Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake." *Diabetes* **51**(2): 271-275.

Orellana, J. A., P. J. Saez, C. Cortes-Campos, R. J. Elizondo, K. F. Shoji, S. Contreras-Duarte, V. Figueroa, V. Velarde, J. X. Jiang, F. Nualart, J. C. Saez and M. A. Garcia (2012). "Glucose increases intracellular free Ca(2+) in tanycytes via ATP released through connexin 43 hemichannels." *Glia* **60**(1): 53-68.

Pocai, A., T. K. Lam, S. Obici, R. Gutierrez-Juarez, E. D. Muse, A. Arduini and L. Rossetti (2006). "Restoration of hypothalamic lipid sensing normalizes energy and glucose homeostasis in overfed rats." *J Clin Invest* **116**(4): 1081-1091.

Prentki, M., F. M. Matschinsky and S. R. Madiraju (2013). "Metabolic Signaling in Fuel-Induced Insulin Secretion." *Cell Metab.*

Price, N., F. van der Leij, V. Jackson, C. Corstorphine, R. Thomson, A. Sorensen and V. Zammit (2002). "A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I." *Genomics* **80**(4): 433-442.

Ramirez, S., L. Martins, J. Jacas, P. Carrasco, M. Pozo, J. Clotet, D. Serra, F. G. Hegardt, C. Dieguez, M. Lopez and N. Casals (2013). "Hypothalamic ceramide levels regulated by CPT1C mediate the orexigenic effect of ghrelin." *Diabetes* **62**(7): 2329-2337.

Roduit, R., C. Nolan, C. Alarcon, P. Moore, A. Barbeau, V. Delghingaro-Augusto, E. Przybykowski, J. Morin, F. Masse, B. Massie, N. Ruderman, C. Rhodes, V. Poitout and M. Prentki (2004). "A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli." *Diabetes* **53**(4): 1007-1019.

Routh, V. H. (2002). "Glucose-sensing neurons: are they physiologically relevant?" *Physiol Behav* **76**(3): 403-413.

Ruderman, N. B., A. K. Saha and E. W. Kraegen (2003). "Minireview: malonyl CoA, AMP-activated protein kinase, and adiposity." *Endocrinology* **144**(12): 5166-5171.

Sanz, C., I. Roncero, P. Vazquez, M. A. Navas and E. Blazquez (2007). "Effects of glucose and insulin on glucokinase activity in rat hypothalamus." *J Endocrinol* **193**(2): 259-267.

Schwinkendorf, D. R., N. G. Tsatsos, B. A. Gosnell and D. G. Mashek (2010). "Effects of central administration of distinct fatty acids on hypothalamic neuropeptide expression and energy metabolism." *Int J Obes (Lond)* **35**(3): 336-344.

Sierra, A. Y., E. Gratacos, P. Carrasco, J. Clotet, J. Urena, D. Serra, G. Asins, F. G. Hegardt and N. Casals (2008). "CPT1c is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyltransferase activity." *J Biol Chem* **283**(11): 6878-6885.

Takeuchi, K. and K. Reue (2009). "Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**(6): E1195-1209.

Wang, R., C. Cruciani-Guglielmacci, S. Migrenne, C. Magnan, V. E. Cotero and V. H. Routh (2006). "Effects of oleic acid on distinct populations of neurons in the hypothalamic arcuate nucleus are dependent on extracellular glucose levels." *J Neurophysiol* **95**(3): 1491-1498.

Wolfgang, M. J., S. H. Cha, A. Sidhaye, S. Chohnan, G. Cline, G. I. Shulman and M. D. Lane (2007). "Regulation of hypothalamic malonyl-CoA by central glucose and leptin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(49): 19285-19290.

Wolfgang, M. J., T. Kurama, Y. Dai, A. Suwa, M. Asami, S. Matsumoto, S. H. Cha, T. Shimokawa and M. D. Lane (2006). "The brain-specific carnitine palmitoyltransferase-1c regulates energy homeostasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(19): 7282-7287.

Yang, C. S., C. K. Lam, M. Chari, G. W. Cheung, A. Kokorovic, S. Gao, I. Leclerc, G. A. Rutter and T. K. Lam (2010). "Hypothalamic AMP-activated protein kinase regulates glucose production." *Diabetes* **59**(10): 2435-2443.

Yi, C. X., K. M. Habegger, J. A. Chowen, J. Stern and M. H. Tschop (2011). "A role for astrocytes in the central control of metabolism." *Neuroendocrinology* **93**(3): 143-149.

Acknowledgements

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

Foot notes

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

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

Figure legends

Figure 1: Neuropeptides and metabolic enzymes expression profiles in GT1-7 and N46 hypothalamic neurons. Neuropeptides (A) and enzymes (B) expression was determined by qPCR and mRNA levels were normalized to 18S levels. Agouti-related Protein (AgRP), Neuropeptide Y (NPY), proopiomelanocortin (POMC), carnitine-palmitoyl transferase 1 (CPT-1), Acetyl-CoA carboxylase (ACC), Fatty acid synthase (FAS), Malonyl-CoA decarboxylase (MCD), Pyruvate dehydrogenase 1 (PDH1). Results are shown as means \pm SEM. N= 3 to 5 performed in duplicate. Statistical analyses were performed with one-way ANOVA with Bonferroni post-tests. *, ** and ***, $p < 0.05$, 0.01 and 0.001 respectively.

Figure 2: Glucose inhibits LCFA oxidation via AMPK in hypothalamic neuronal cell lines. Palmitate oxidation (A), glucose utilization (B) and oxidation (C) in response to increasing glucose concentrations or etomoxir (200 μ M) in GT1-7 neurons. Palmitate oxidation (D), glucose utilization (E) and oxidation (F) in response to increasing glucose concentrations or etomoxir (200 μ M) in N46 neurons. Western blot (G), quantitation of Thr172 Phospho-AMPK levels (H) and palmitate oxidation (I) in N46 neurons treated with glucose \pm Compound C (CpC, 25 μ M) or AICAR (1 mM). Oleate oxidation (J) in response to glucose in N46 neurons. Results are shown as means \pm SEM. N= 3 to 6 independent experiments with each condition performed in duplicate for intracellular metabolism measurements. N= 3-4 independent experiments for western blot analyses. Statistical analyses were performed with one-way ANOVA with Bonferroni post-tests except for oleate oxidation (unpaired Student *t*-test). *, ** and ***, $p < 0.05$, 0.01 and 0.001 respectively vs. 1mM Glucose. ##, $p < 0.01$ vs. 15 mM glucose.

Figure 3: Glial Fibrillary Acidic Protein and metabolic enzymes expression profiles in hypothalamic and cortical astrocytes. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) and DAPI immunostaining (A) in cortical (left) and hypothalamic (right) astrocytes. (B) Enzymes expression was determined by qPCR and mRNA levels were normalized to 18S levels. Carnitine-palmitoyl transferase 1 (CPT-1), Acetyl-CoA

carboxylase (ACC), Fatty acid synthase (FAS), Malonyl-CoA decarboxylase (MCD), Pyruvate dehydrogenase 1 (PDH1). Results are shown as means \pm SEM. N= 5 performed in duplicate. Statistical analyses were performed with one-way ANOVA with Bonferroni post-tests. *, ** and ***, $p < 0.05$, 0.01 and 0.001 respectively. ###, $p < 0.001$ vs. CPT-1a and 1b.

Figure 4: Glucose decreases palmitate oxidation via AMPK in hypothalamic but not cortical astrocytes. Palmitate oxidation (A), glucose utilization (B) and oxidation (C) in response to glucose or etomoxir (200 μ M) in hypothalamic and cortical astrocyte cultures. Western blot (D) and quantitation of Thr172 P-AMPK and Ser79 P-ACC levels (E) in hypothalamic and cortical astrocytes. Palmitate oxidation (F) in response to glucose \pm AICAR (1 mM) in hypothalamic and cortical astrocytes. Results are shown as means \pm SEM. N= 4 to 7 independent experiments with each condition performed in duplicate for intracellular metabolism measurements. N= 3 independent experiment for western blot analyses. Statistical analyses were performed with one-way ANOVA with Bonferroni post-tests. *, ** and ***, $p < 0.05$, 0.01 and 0.001 respectively vs. 1mM Glucose.

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

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

Figure 7: Glucose increases the expression of esterification enzymes in N46 neurons. Gene expression was determined by qPCR in N46 neurons following 24 h exposure to 1 or 15 mM glucose. mRNA levels were normalized to 18S levels. Glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT), 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase (AGPAT) and diacylglycerol acyltransferase (DGAT). Results presented are means \pm SEM from 3 separate studies performed in duplicate. Statistical analyses were performed with unpaired Student *t*-test. * and ***, $p < 0.05$ and 0.001 respectively vs. 1mM Glucose.

TABLE 1 Primers used for real-time quantitative PCR

Gene	Forward	Reverse
NPY	<i>ctccgctctgcgacactaca</i>	<i>aatcagtgtctcagggctgga</i>
AgRP	<i>tgctactgccgcttcttcaa</i>	<i>ctttgcccaacaacatcca</i>
POMC	<i>aggcctgacacgtggaagat</i>	<i>aggcaccagctccacacat</i>
Cpt-1a	<i>gaggaccctgaggcatctat</i>	<i>gaatgctctgcgtttatgcc</i>
Cpt-1b	<i>ccggaaggtatggccactt</i>	<i>gaagaaaatgcctgtcgccc</i>
Cpt1-c	<i>tccgatggggcagaagtaga</i>	<i>agtcattccagacacgccag</i>
Acc1	<i>atgtccgactgactgtaacc</i>	<i>tccatagccgacttccatagc</i>
Acc2	<i>tctgatgaggaccctagtgc</i>	<i>acatgctgggctcatagtag</i>
Fasn	<i>gtgatagccggatgtcggg</i>	<i>tagagcccagccttccatct</i>
Mcd	<i>agaagatcagcaggtgtgagg</i>	<i>agtcagagccacatgcagaac</i>
Gk	<i>atcttctgttcacggagagg</i>	<i>gatgtaaggatctgccttcg</i>
Glut2	<i>ccaggccaatcccttggtt</i>	<i>cccaaggaagtccgcaatgt</i>
Pdha1	<i>accagagaggatgggctcaa</i>	<i>aggcttctgaccatcacac</i>
Pdha2	<i>atcagcaacaacctagcaat</i>	<i>ggttctggatcagtcgtagca</i>
Dgat1	<i>ggatctgaggtgccatcgtc</i>	<i>atcagcatcaccacacacca</i>
Dgat2	<i>catcatcgtggtgggaggtg</i>	<i>tgggaaccagatcagctccat</i>
Gpat1	<i>cggaaactgaactggagaagtg</i>	<i>gatgaattgctggtgctcctt</i>
Gpat2	<i>aagactgagccggcatgttc</i>	<i>gtgacaggaccacacccttt</i>
Agpat1	<i>gacagagatacagccagccg</i>	<i>gctccattctggtcacctca</i>
Agpat2	<i>tacgccaaggtcggctctcta</i>	<i>accagctgatgatgctcatgt</i>
Agpat3	<i>aggaaaacacctgtccacgg</i>	<i>actgagaacagccgtccaag</i>
Agpat4	<i>gtgcttgcgagatggtgtcc</i>	<i>atggggatcctccgaacgta</i>
Agpat5	<i>accggggtccagatattgct</i>	<i>gcatgtccgaacaatccag</i>
Agpat6	<i>ctactacgccatggtgggac</i>	<i>ggtggcgatctttcacctca</i>
Agpat7	<i>cccggcgctactcaaagttct</i>	<i>ttggcataaagggtggggtc</i>
Agpat8	<i>gcggtgtcagaatcatggtg</i>	<i>cggctgctaataccagcgata</i>

FIGURE 1

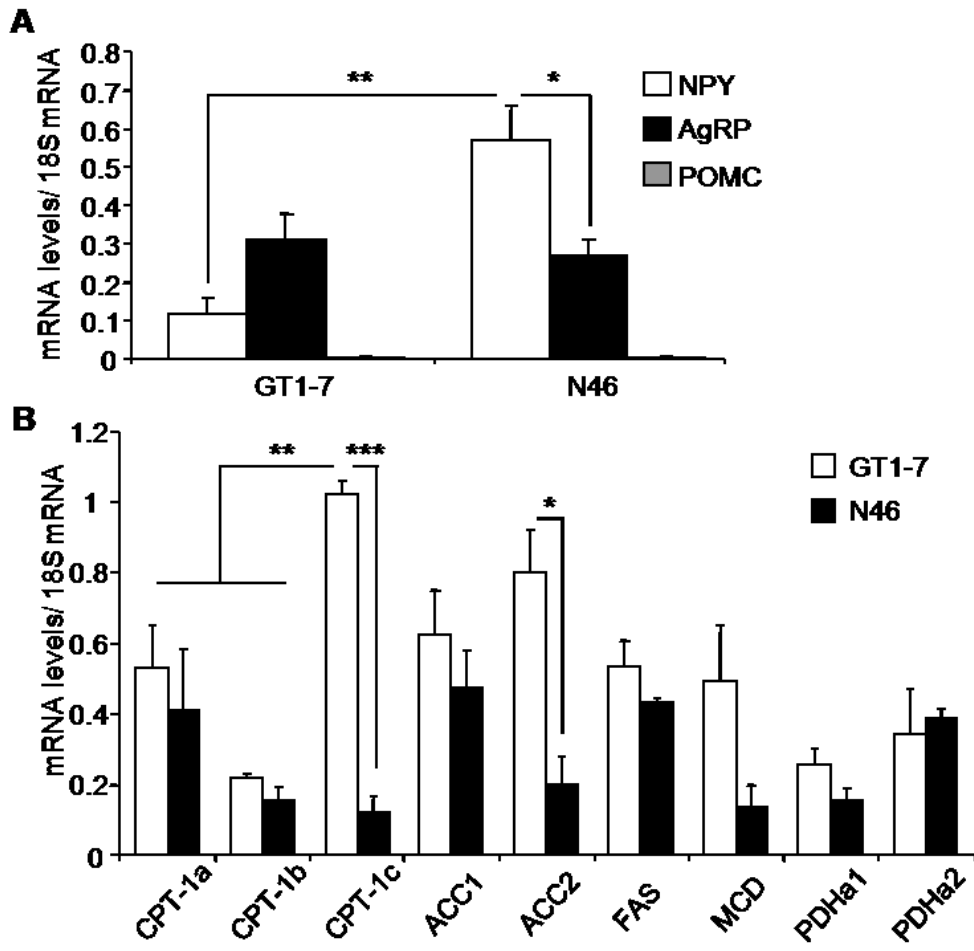


FIGURE 2

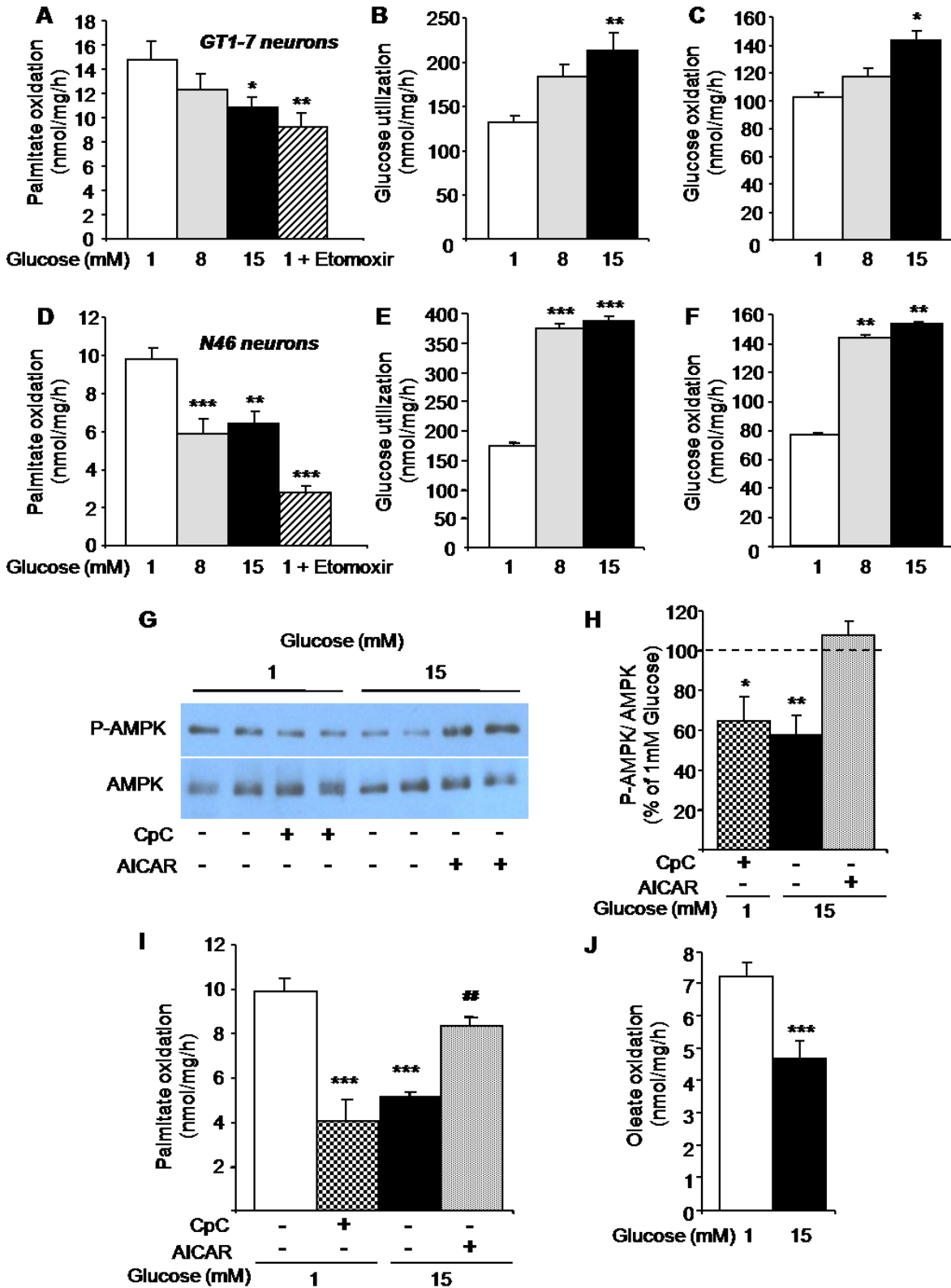


FIGURE 3

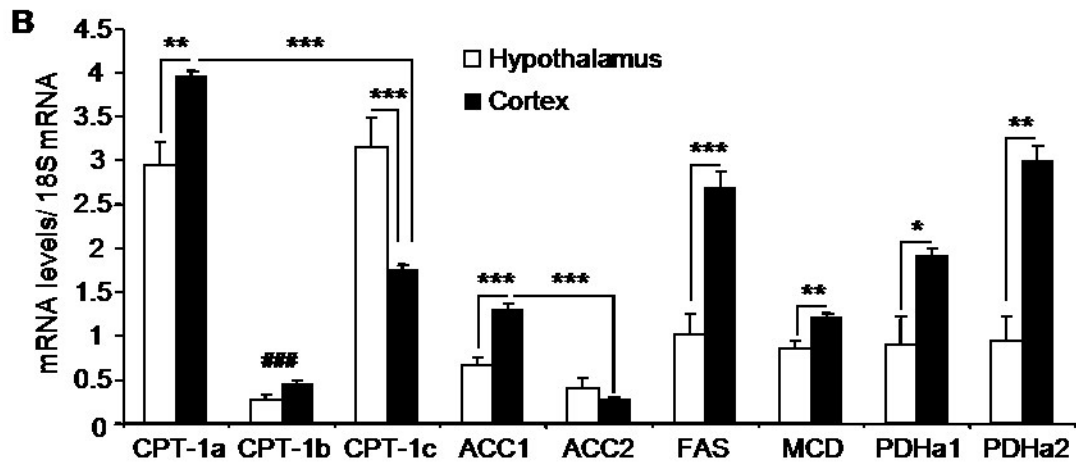
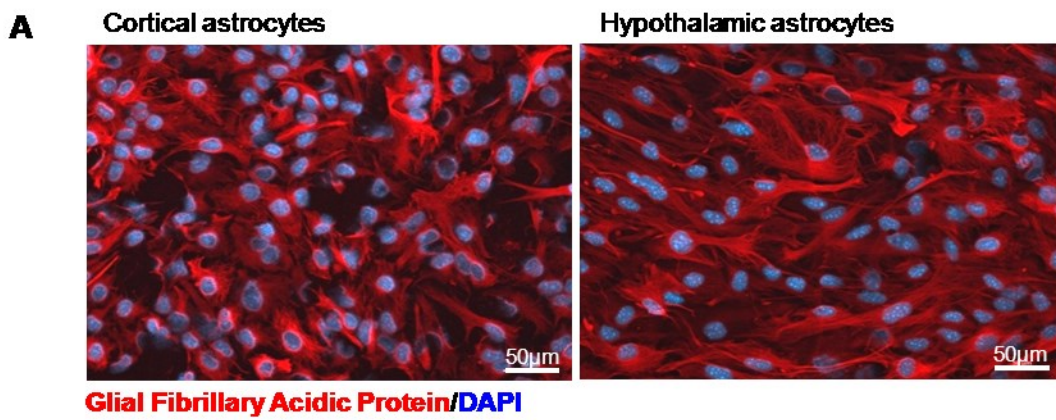
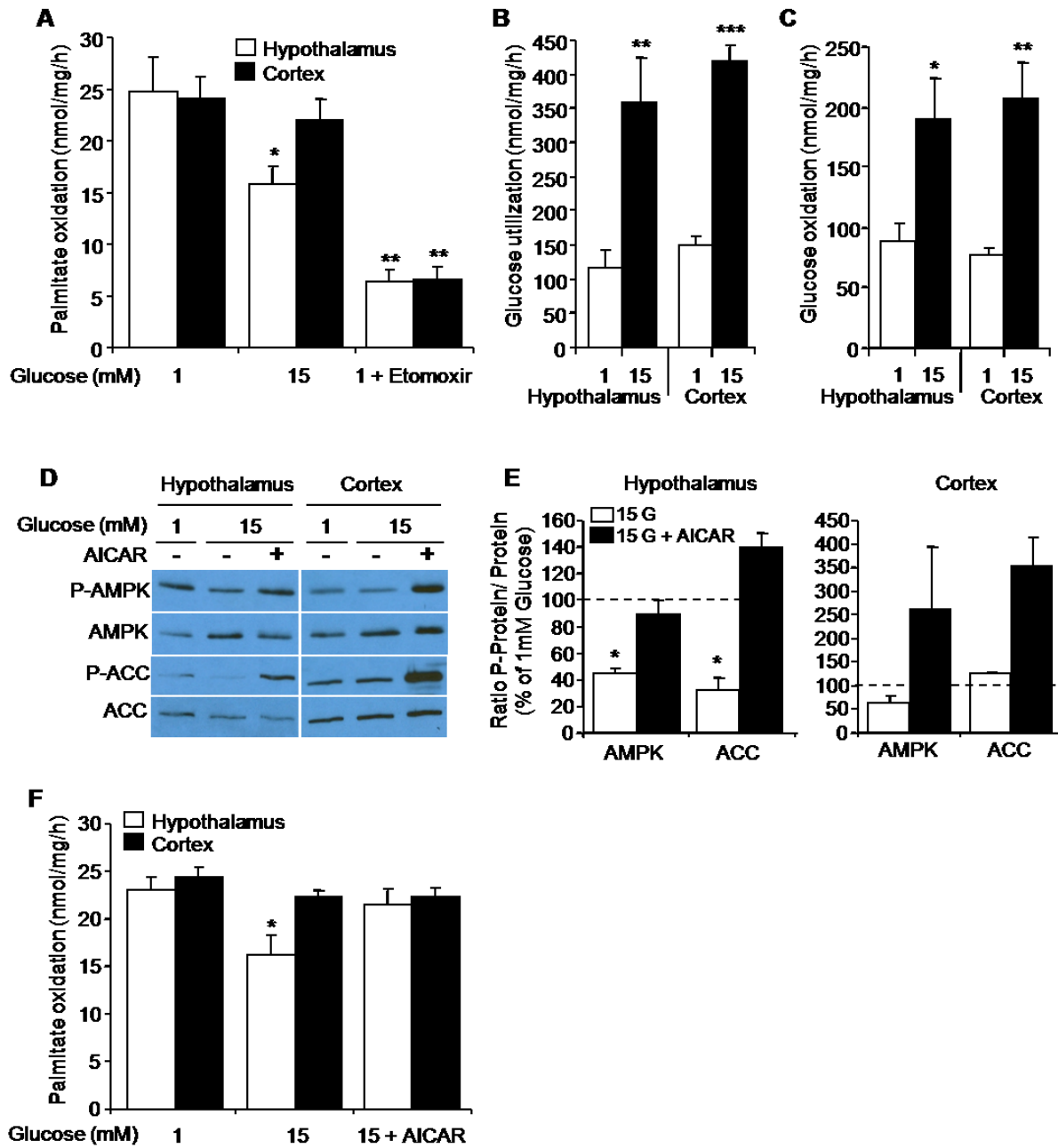


FIGURE 4



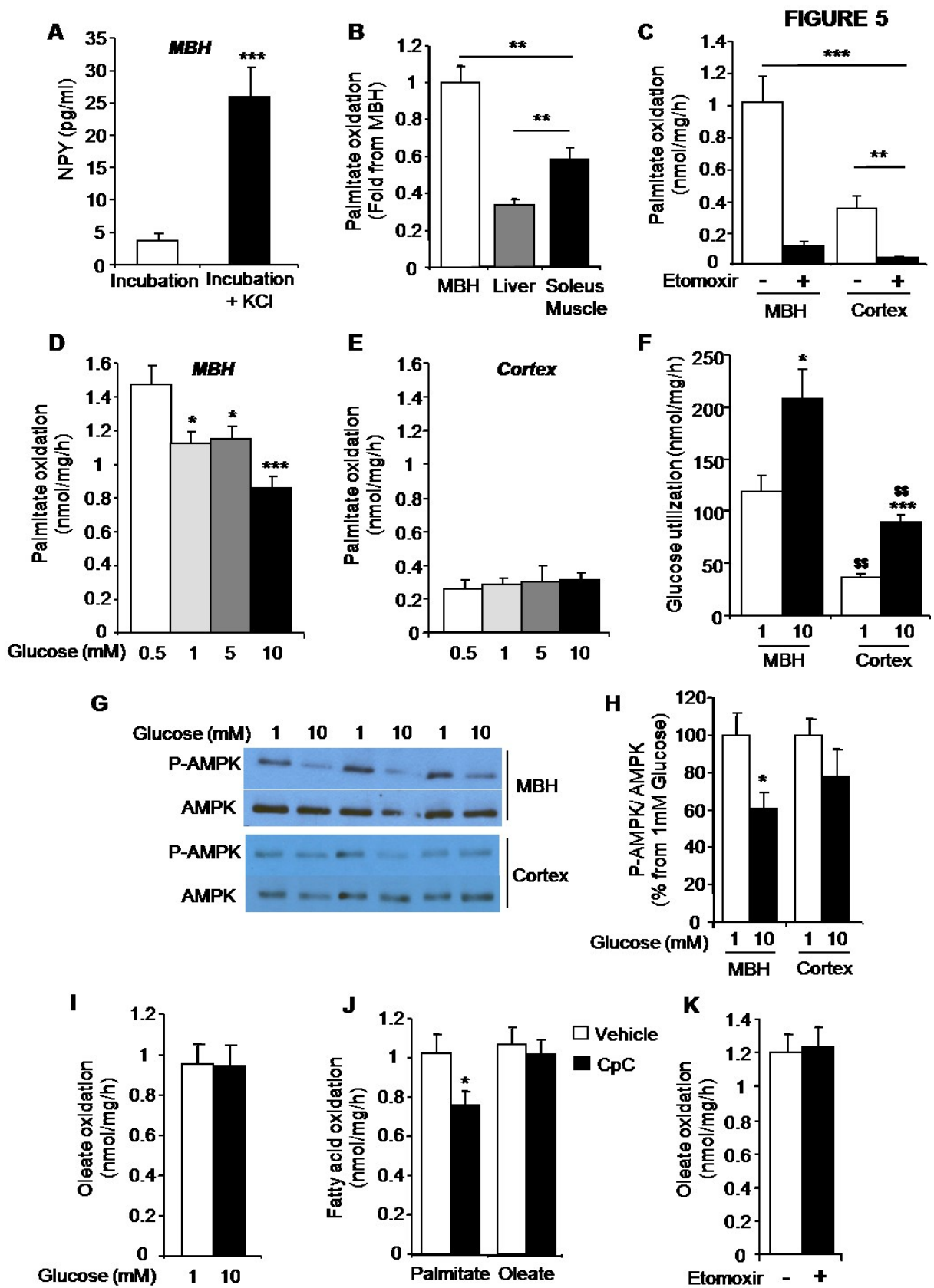


FIGURE 6

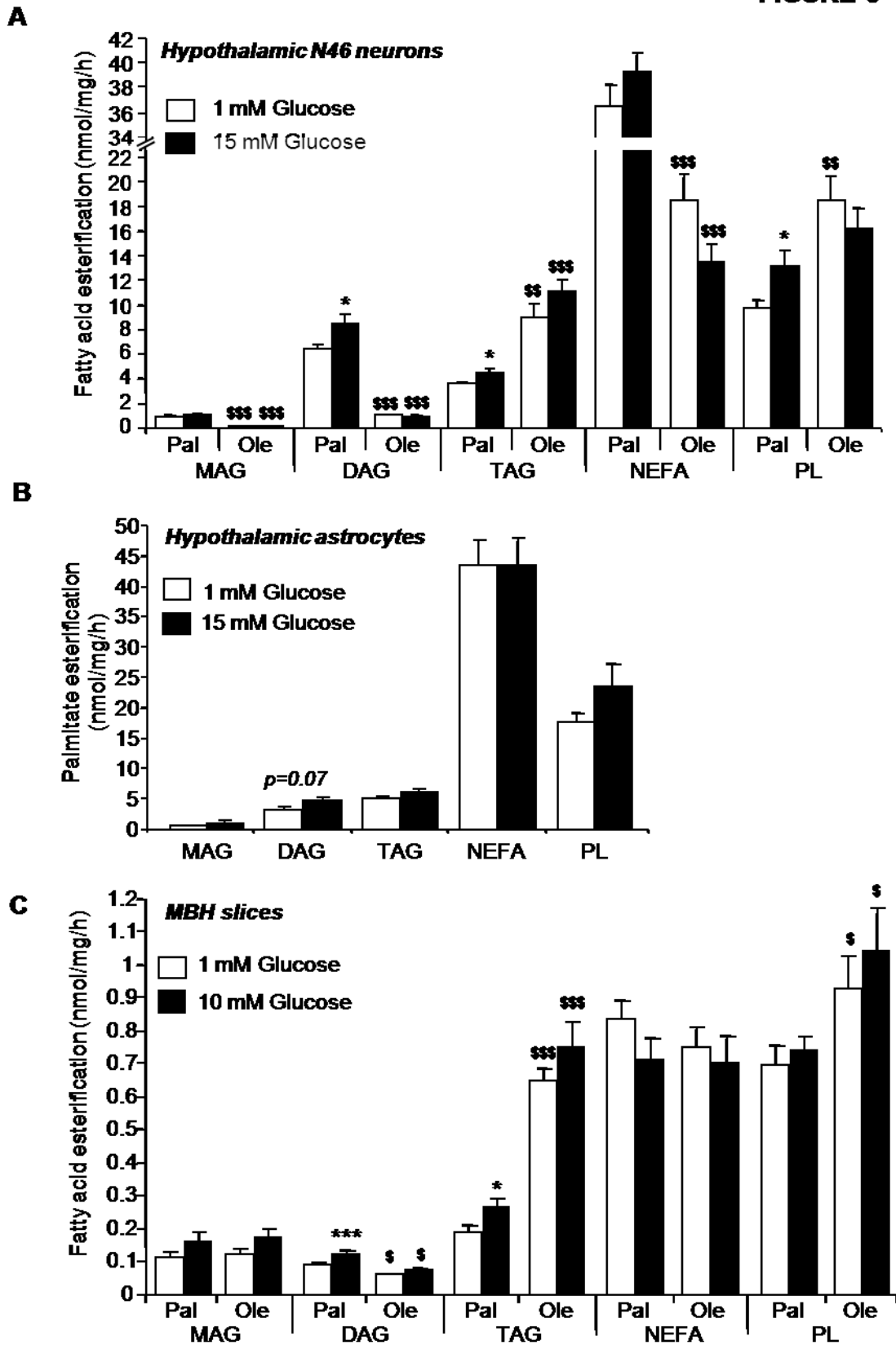
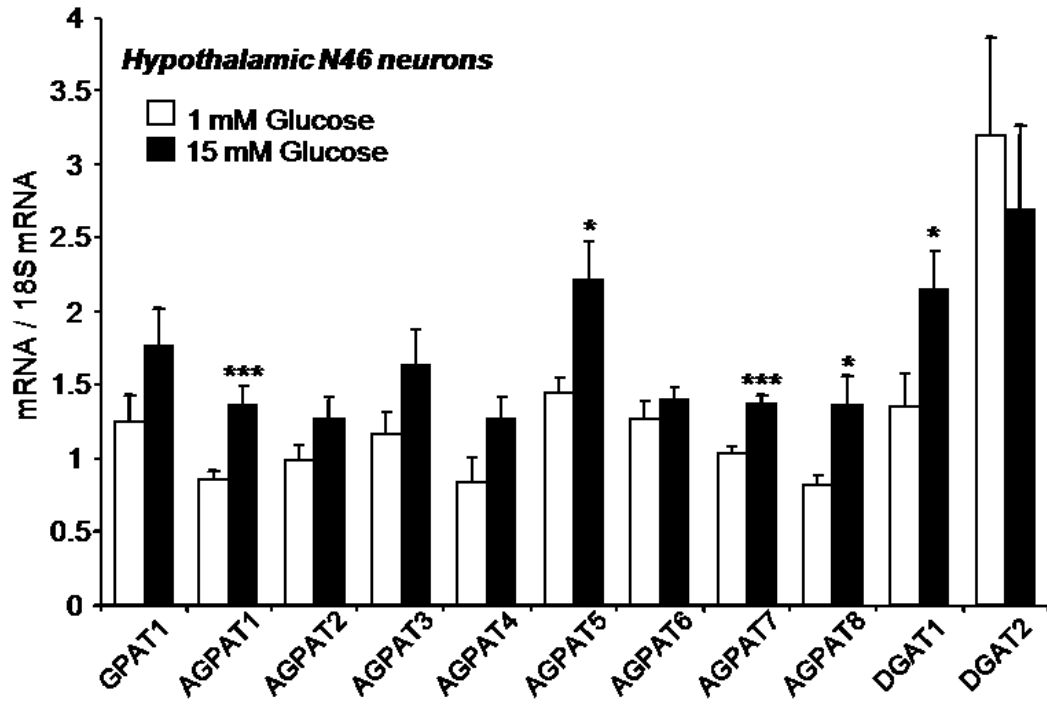


FIGURE 7



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

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

Publié dans le Journal of Neurochemistry, 2015

Contribution des auteurs :

***Coauteurs principaux à contribution égale**

Khalil Bouyakdan : Auteur principal, a élaboré les hypothèses, conçu et réalisé la majorité des expériences ayant contribué à des figures. A analysé les données et rédigé le manuscrit.

Bouchra Taïb : Coauteur principal, a participé à la réalisation des mesures métaboliques *ex vivo*.

Lionel Budry : Coauteur, a réalisé les marquages par immunofluorescence.

Shangang Zhao : Coauteur, a apporté de l'aide technique pour les mesures d'estérification.

Demetra Rodaros : Coauteur, a apporté de l'aide technique à la mise en culture des astrocytes et le maintien de la lignée de souris invalidés pour ACBP.

Ditte Neess : Coauteur, a participé aux mesures des niveaux d'Acyl-CoA par HPLC.

Susanne Mandrup : Coauteur et collaborateur, a fourni les souris invalidés pour ACBP.

Nils. J. Faergeman : Coauteur et collaborateur, a contribué aux mesures et à l'analyse des niveaux d'Acyl-CoA.

Thierry Alquier : Directeur de thèse des coauteurs, a dirigé le projet et rédigé le manuscrit.

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

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

^aMontreal Diabetes Research Center, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), and Departments of ^bPathology and Cell Biology, ^cBiochemistry, and ^dMedicine, University of Montreal, Montreal, QC, Canada H3T 1J4. ¹Villum Center for Bioanalytical Sciences, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Southern Denmark University, DK-5230 Odense M, Denmark.

FOOT NOTES:

[#]Authors contributed equally to this work.

²To whom correspondence should be addressed: Thierry Alquier, CRCHUM-Tour Viger, 900 Saint-Denis, Montreal, QC, Canada, H2X0A9. Tel.: (1)514-890-8000#23628; Fax: (1)514-412-7648; E-mail: thierry.alquier@umontreal.ca

ABBREVIATIONS: ACBP, Acyl-CoA binding protein; ACC, Acetyl-CoA carboxylase; AGPAT, acylglycerol-phosphate acyltransferase; CD36, Cluster of differentiation 36; CERS, Ceramide synthase; CPT, Carnitine palmitoyl transferase; DAG, Diacylglycerol; DBI, Diazepam Binding Inhibitor; DGAT, diacylglycerol acyltransferase; FA, Fatty acids; FABP, Fatty acid binding protein; FAS, Fatty acid synthase; FATP, fatty acid transport protein; GFAP, Glial Fibrillary Acidic Protein; GPAT, Glycerol-3-phosphate acyltransferase; Het, Heterozygous knockout; KO, Homozygous knockout; LCFA, Long-chain fatty acids; MBH, mediobasal hypothalamus; MCFA, Medium-chain fatty acids; NEFA, non-esterified fatty acid; NeuN, Neuronal nuclei; ODN, octadecaneuropeptide; PL, phospholipids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; SCD1, Stearoyl-CoA desaturase 1; SPTLC, Serine palmitoyltransferase long-chain; TAG, triacylglycerol; VLCFA, very long-chain fatty acids; WT, wild-type.

KEYWORDS: Hypothalamus, endozepines, astrocytes, fatty acid oxidation, fatty acid esterification, acyl-CoA.

Abstract

Acyl-CoA-binding protein (ACBP) is a ubiquitously expressed protein that binds intracellular acyl-CoA esters. Several studies have suggested that ACBP acts as an acyl-CoA pool former and regulates long-chain fatty acids (LCFA) metabolism in peripheral tissues. In the brain, ACBP is known as Diazepam-Binding Inhibitor, a secreted peptide acting as an allosteric modulator of the GABA_A receptor. However, its role in central LCFA metabolism remains unknown. In the present study, we investigated ACBP cellular expression, ACBP regulation of LCFA intracellular metabolism, FA profile, and FA metabolism-related gene expression using ACBP-deficient and control mice. ACBP was mainly found in astrocytes with high expression levels in the mediobasal hypothalamus. We demonstrate that ACBP deficiency alters the central LCFA-CoA profile and impairs unsaturated (oleate, linolenate) but not saturated (palmitate, stearate) LCFA metabolic fluxes in hypothalamic slices and astrocyte cultures. In addition, lack of ACBP differently affects the expression of genes involved in FA metabolism in cortical versus hypothalamic astrocytes. Finally, ACBP deficiency increases FA content and impairs their release in response to palmitate in hypothalamic astrocytes. Collectively, these findings reveal for the first time that central ACBP acts as a regulator of LCFA intracellular metabolism in astrocytes.

Introduction

The neural regulation of energy homeostasis mainly relies on the hypothalamus and its capacity to detect circulating nutritional signals such as glucose and long-chain fatty acids (LCFA) (Morton et al. 2006). Hypothalamic action of LCFA to modulate glucose homeostasis and food intake is dependent

on LCFA esterification in LCFA-CoA but the metabolic pathways and cell type(s) involved remain elusive (Lam et al. 2009).

Once transported into the cell, LCFA are esterified in LCFA-CoA and bound to acyl-CoA-binding protein (ACBP), a highly conserved 10 kDa protein (Burton et al. 2005). ACBP is ubiquitously expressed, with high expression levels in tissues with an active lipid metabolism such as the liver and adipose tissues (Faergeman et al. 2007), and has a high affinity and specificity for medium to LCFA-CoAs (Rosendal et al. 1993). In agreement with its biochemical properties, ACBP deficiency decreases the intracellular LCFA-CoA pool while ACBP over-expression has the opposite effect in yeast (Knudsen et al. 1994) and mouse (Huang et al. 2005). In addition, gain- and loss-of-function studies have shown that ACBP is required for LCFA esterification into triglycerides and phospholipids (PL) (Gaigg et al. 2001; Huang et al. 2005; Elle et al. 2011) and oxidation (Harris et al. 2014). Furthermore, functional loss of ACBP decreases very long-chain FA (VLCFA) content, suggesting that ACBP regulates LCFA elongation and hence VLCFA levels (Gaigg et al. 2001; Bloksgaard et al. 2012; Neess et al. 2013). Finally, ACBP null mice have a delayed metabolic adaptation to weaning and impaired epidermal barrier because of altered lipid composition in the skin stratum corneum (Neess et al. 2011, 2013; Bloksgaard et al. 2012). Collectively, these studies support a key role for ACBP in LCFA-CoA pool formation and metabolism in peripheral tissues.

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

At the cellular level, ACBP expression has been reported in neurons (Alho et al. 1985) and glial cells (Lanfray et al. 2013) and its secretion is induced by several stimuli in cultured astrocytes (Tokay et al. 2008; Loomis et al. 2010). ACBP and its fragments stimulate neurosteroids synthesis (Do Rego et al.

2012) and neurogenesis (Alfonso et al. 2012) by acting as negative allosteric modulators of the GABA_A receptor. In addition, central administration of octadecaneuropeptide induces anxiety, proconflict behavior (Guidotti et al. 1983), and inhibits feeding (Lanfray et al. 2013). Together, these studies and others (Christian and Huguenard 2013; Christian et al. 2013) suggest that endozepines act as gliotransmitter-modulating neuronal activity by targeting GABA_A. Despite this knowledge, whether or not endogenously expressed ACBP regulates LCFA-CoA levels and metabolic fate in the brain and astrocytes remains unknown.

Importantly, astrocytes are known to be the main cell type metabolizing LCFA in the brain (Guzman and Blazquez 2001) and to generate and release unsaturated LCFA (oleate) and polyunsaturated FA (PUFA, arachidonate, and docosahexaenoate) that play important roles in central nervous system function (Moore 2001; Taberero et al. 2001; Camargo et al. 2009). In addition, a mounting body of evidence suggests that hypothalamic astrocytes play a key role in the regulation of energy balance by detecting circulating metabolic signals (Chowen et al. 2013) including LCFA (Le Foll et al. 2014). We recently showed high LCFA oxidative capacity in hypothalamic astrocytes and a glucose-dependent regulation of LCFA oxidation in hypothalamic but not cortical astrocytes (Taib et al. 2013). This supports the idea that hypothalamic astrocytes are metabolically equipped to sense nutrients and that ACBP may play a role in LCFA sensing by regulating their metabolism in astrocytes.

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

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents

Culture media and serum were from Wisent (Saint-Jean-Baptiste, QC, CA). Radioactive tracers were from PerkinElmer Life Sciences (Waltham, MA, USA) and all other reagents were from Sigma (St Louis, MO, USA) unless otherwise noted.

Animals

ACBP homozygous knockout (KO) mice were kindly donated by Dr Susanne Mandrup (Nees et al. 2011) from University of Southern Denmark (Odense, Denmark). Animals were housed two per cage on a 12-h light/dark cycle at 21°C with free access to water and standard chow diet. All procedures were approved by the Institutional Committee for the Protection of Animals (CIPA) at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. ACBP heterozygous knockout (Het) mice were crossed to generate ACBP wild-type (WT), Het and homozygous knockout (KO) animals. For primary astrocyte cultures, 1- to 2-day-old pups were genotyped from tail clippings. For brain slices and acyl-CoA measurement, mice were genotyped by PCR at weaning as described previously (Bloksgaard et al. 2012).

Immunohistochemistry

Male mice were perfused intracardially with 4% formaldehyde under anesthesia. The brains were post-fixed in 4% formaldehyde, cryopreserved in 20% sucrose, and cut into 14 µm serial sections with a cryostat. Sections were blocked and incubated with primary antibodies overnight at 4°C followed by incubation for 1 h at 22°C with secondary antibodies. Sections were mounted and imaged with a Zeiss

fluorescent microscope (Carl Zeiss AG, Jena, Germany). Primary antibodies used were anti-ACBP (1 : 100; kind gift from Dr Mandrup), anti- glial fibrillary acidic protein (GFAP, Mab360, 1 : 100; Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) and anti-NeuN (Mab377, 1 : 100; Millipore). Secondary antibodies were Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG and Alexa Fluor® 546 Goat Anti-Mouse IgG (1 : 150; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Immunocytochemistry on cultured astrocytes was performed as previously described (Taib et al. 2013). Briefly, after fixation in 4% formalin and blocking with 5% bovine serum albumin (BSA) and 0.05% Triton, astrocytes were incubated with the anti-GFAP (1 : 1000) and anti-ACBP (1 : 1000) antibodies in 5% BSA and 0.05% Triton overnight at 4°C followed by secondary antibody incubation (1 : 1000, Alexa Fluor® 568, A-11004; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The coverslips were mounted onto glass slides with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) containing 4',6-diamidino-2-phenylindole DAPI (1.5 µg/mL). Cells were observed with a Zeiss fluorescent microscope. Our cortical and hypothalamic cultures contain ~ 90% of GFAP-positive cells (Taib et al. 2013).

Primary astrocyte cultures

Primary cultures of hypothalamic and cortical astrocytes were prepared from 1- to 2-day-old ACBP WT, Het, and KO pups as previously described (Taib et al. 2013). Briefly, after decapitation and brain removal, hypothalami and cortices were dissected and mechanically dissociated by passing through syringe needles of decreasing diameter. The cells were plated in poly-l-ornithine-coated six-well plates or T25 and T12.5 flasks and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 25 mm glucose and supplemented with 44 mm NaHCO₃, 1% antibiotic-antimycotic, and 10% FBS (Fetal Bovine Serum) at 37°C in 95% O₂, 5% CO₂. Astrocytes were cultured for 14–20 days before use (at ~ 70% confluence).

Western blot analysis

Total protein (25 µg) from ACBP WT, Het, and KO mice was resolved on a 12.5% acrylamide gel and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) blocked with 5% non-fat milk in Tris-buffered saline containing 0.2% Tween 20 for 1 h. Blots were then incubated with an ACBP primary antibody (1 : 1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or Actin primary antibody (1 : 200 000) overnight at 4°C followed by secondary antibody incubation horseradish peroxidase-donkey anti-goat (1 : 10 000; Santa Cruz Biotechnology) or goat anti-mouse (1 : 10 000; Bio-Rad) for 2 h at 22°C. Chemiluminescence (Western Lightning, PerkinElmer Life Sciences) was quantified on scanned films using densitometry.

Brain LCFA-CoA levels

LCFA-CoA analysis was performed by HPLC as previously described (Just et al. 2006). Hypothalami and cortices were rapidly dissected from ACBP WT and KO fed mice (4–5 weeks old) at the onset of the light cycle and immediately frozen. Heptadecanoyl-CoA (5–8 pmol/mg of tissue) internal standard was added prior to addition of chloroform/methanol (2 : 1). Tissue was then homogenized with an Ultra-turrax homogenizer. Chloroform and H₂O were added and vortexed. After centrifugation, the interphase was recovered and dried under a stream of N₂. The LCFA-CoA were further extracted and derivatized to fluorescent acyl-etheno-CoA esters using 0.5 M chloroacetaldehyde, 0.5% sodium dodecyl sulfate, 0.15 M citrate, pH 4 (200 µL). Acyl-CoA derivatives were separated and analyzed by reverse phase HPLC (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) equipped with a 5-µm LUNA C18 column and a C18 guard column (both from Phenomenex, Torrance, CA, USA) maintained at 40°C. LCFA-CoA were eluted with a constant flow of 0.4 mL/min using solvent A (80% acetonitrile, 20% 20 mM ammoniumacetate) and solvent B (95% 20 mM ammoniumacetate, 5% acetonitrile) with the same gradient as described in (Just et al. 2006). Peaks were detected and quantified relatively to the internal heptadecanoyl-CoA standard using the same parameters used in (Just et al. 2006).

Identification of individual LCFA–CoA was performed using standard LCFA–CoA mixtures derivatized as above-mentioned. The detection level of our methods was 0.5 pmol acyl-CoA/mg protein.

Determination of fatty acid profile in astrocytes

Intracellular free medium-chain fatty acids (MCFA) and LCFA levels as well as MCFA and LCFA released into the incubation media by hypothalamic astrocytes were quantified using HPLC. Hypothalamic astrocytes grown in six-well plates were washed with Krebs-Ringer bicarbonate HEPES (pH 7.4) and cultured during 2 h with Krebs-Ringer bicarbonate HEPES containing 15 mM glucose with 0.5% FA-free BSA or 0.3 mM palmitate complexed to 0.5% FA-free BSA. Cultures were washed with cold phosphate-buffered saline (PBS) prior to MCFA and LCFA extraction. Extraction and HPLC measurements were performed as previously described (Zhao et al. 2014). Briefly, FA accumulated in the cells and released into the medium were extracted by Dole–Meinertz extraction procedure (Puttmann et al. 1993). The dried FA were derivatized with phenacylbromide and quantified by reverse phase HPLC using a Zorbax Eclipse plus XDB analytical C18 column (4.6.250 mm; 5 µm; Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA). FA were eluted using methanol/water (92.5 : 7.5) at a flow rate of 1.5 mL/min and detected at 242 and 254 nm and quantified by the internal standard method. This setup did not allow us to discriminate the signal corresponding to linoleate (C18:2) from docosahexaenoate (C22:6). Results were normalized by cell protein content.

Hypothalamic slices

Hypothalamic slices were generated from ACBP WT and KO mice using modification of a protocol previously used to generate brain slices from rat (Taib et al. 2013). Briefly, brains were rapidly removed and immersed in ice-cold cutting solution. Three 300-µm-thick sections containing the hypothalamus were cut from each mouse using a Vibratome (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL, USA) while being continuously immersed and oxygenated in ice-cold cutting solution. The mediobasal

hypothalamus (MBH), which includes the arcuate nucleus and the ventro- and dorso-median hypothalamus, was dissected on each section as previously described (Taib et al. 2013). MBH slices were allowed to recover for 1 h at 22°C in artificial cerebrospinal fluid (aCSF). Then, slices were pre-incubated at 37°C for 30 min in aCSF containing 1 mM glucose before treatment under constant oxygenation.

Oleate transport in astrocytes

Oleate uptake was assessed using radiolabeled oleate. Hypothalamic astrocytes were serum starved during 2 h in DMEM containing 1 mM glucose followed by a 30-min pre-incubation in the same media plus 0.5% FA-free BSA. Cells were then incubated 15 min in presence of 1 mM glucose and 0.3 mM oleate pre-complexed to 0.5% FA-free BSA, 0.2 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ [1- ^{14}C]-oleate, and 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ [1- $^3\text{H}(\text{N})$]-d-manitol. Cells were washed twice with cold PBS and processed for protein extraction and counted to measure [1- ^{14}C]-oleate and [1- $^3\text{H}(\text{N})$]-d-manitol level. Non-specific oleate binding was accounted for by the binding of d-manitol. The results were normalized by cell protein content.

LCFA oxidation in astrocytes and slices

The measurement of LCFA oxidation in primary astrocytes cultures was performed as previously described (Taib et al. 2013). Briefly, cells were starved for 2 h in DMEM containing 1 mM glucose followed by a 30-min pre-incubation in the same media plus 0.5% FA-free BSA. Cells were then incubated 2 h in presence of 1 mM glucose and either 0.3 mM palmitate, oleate, α -linolenate, or 0.22 mM stearate pre-complexed to 0.5% FA-free BSA with 0.1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ [1- ^{14}C]-palmitate, 0.1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ [1- ^{14}C]-oleate, 0.1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ [1- ^{14}C]- α -linolenate, or 0.1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ [1- ^{14}C]-stearate. The incubation was stopped by the injection of 0.2 mL of 40% perchloric acid. After overnight isotopic equilibration at 22°C, $^{14}\text{CO}_2$ and ^{14}C acid-soluble products generated by the oxidation of [^{14}C]-palmitate, [^{14}C]-

oleate, [1-14C]- α -linolenate, or [1-14C]-stearate were counted to calculate total oxidation. The results were normalized by cell protein content.

Since brain slices have to be constantly oxygenated, ¹⁴C-labeled LCFA tracers could not be used to measure LCFA oxidation via the release of ¹⁴CO₂. Therefore, ³H-tracers were employed to estimate the amount of ³H₂O generated and released in the media as previously described (Taib et al. 2013). Briefly, after pre-incubation in aCSF containing 1 mM glucose and 0.1% BSA for 30 min, MBH slices from ACBP WT and KO mice were incubated during 2 h with 1 mM glucose, 0.1 mM palmitate, or oleate pre-complexed to 0.13% BSA, [9,10(n)-³H]-palmitate or [9,10(n)-³H]-oleate (2 μ Ci/mL) at 37°C under constant oxygenation with 95% O₂, 5% CO₂. Incubation media samples were placed in scintillation vials containing cold water and incubated for 24 h at 50°C under constant agitation. After equilibration, ³H₂O was counted to calculate palmitate or oleate oxidation. The results were normalized by slice protein content.

LCFA esterification in astrocytes

Oleate and palmitate esterification into neutral lipids was measured using ¹⁴C-labeled tracers and thin layer chromatography (TLC) in cultured astrocytes as previously described (Taib et al. 2013). Astrocytes grown in T25 flasks were starved for 2 h in DMEM 1 mM glucose followed by a pre-incubation of 30 min in the same media plus 0.5% FA-free BSA. Cells were then incubated during 2 h with 15 mM glucose and 0.3 mM palmitate or oleate pre-complexed to 0.5% FA-free BSA, [1-¹⁴C]-palmitate or [1-¹⁴C]-oleate (0.1 μ Ci/mL).

At the end of the incubation, cells were collected, washed with cold PBS, and rapidly frozen in 0.5 mL methanol: HCl (100 : 1) in liquid nitrogen. Total lipids were extracted using the Folch method. Briefly, samples were homogenized using a pestle and loaded into pre-chilled glass tubes containing 2 mL chloroform then washed with 0.5 mL methanol and HCl. Water with 0.9% NaCl was added and

samples were vigorously vortexed for 15 s and centrifuged at 900 g during 15 min at 4°C. After centrifugation, the lower phase (organic) was transferred into pre-chilled glass tubes and dried under N₂. Each sample was suspended in 50 µL chloroform and loaded on the TLC plates (Whatman, Maidstone, Kent, UK). The samples were delivered by small drops and 10 µL of the esterification mix was loaded to quantify total palmitate or oleate tracer radioactivity. Total lipids were separated using a solvent for neutral lipids (petroleum ether/ether/acetic acid; 70 : 30 : 1) for separation of total PL from di- and triacylglycerols (TAG). Plates were imaged using a phosphor screen (GE Healthcare) after 9–10 days exposure and the signal quantified using a Typhoon scanner (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Results were normalized by cell protein content.

Real-time PCR

Real-time PCR was performed as previously described (Taib et al. 2013). Briefly, primary astrocytes grown in six-well plates were rinsed with ice-cold PBS before RNA extraction using the TRIzol method (Invitrogen). RNA concentration was quantified spectrophotometrically. About 900 ng of total RNA was reverse-transcribed by M-MuLV reverse transcriptase (Invitrogen) with random hexamers following the manufacturer's conditions. The reaction mix was then diluted fivefold before use. Quantitative gene expression was measured from 1 : 10 cDNA dilutions. Real-time PCR was performed using the QuantiFast SYBR Green PCR kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's guidelines on a Corbett Rotor-Gene 6000. Data were analyzed using the standard curve method and normalized to cyclophilin expression levels.

Statistics

Data are expressed as the means ± SEM. Intergroup comparisons were performed by anova analysis with Bonferroni post-tests or by Student's t-test when appropriate. $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Expression pattern of ACBP

The initial studies of Costa demonstrated that ACBP is expressed in neurons of the rodent brain (Alho et al. 1985). In contrast, recent studies reported either an exclusive expression in glial cells and ependymocytes (Lanfray et al. 2013) or expression in both neurons and astrocytes (Christian and Huguenard 2013). We took advantage of the ACBP KO mice to assess the cellular pattern of ACBP expression in the MBH. First, ACBP expression in the MBH is reduced by ~ 50% in ACBP Het and absent in KO mice as expected (Fig. 1a). Second, ACBP protein level is significantly higher in the MBH compared to cortical regions (Fig. 1b). Third, at the cellular level, while ACBP immunofluorescence was observed in scattered neurons of the MBH (NeuN-positive cells, Fig. 1d), most of the signal was detected in GFAP-positive cells in the MBH, median eminence and tanycytes and ependymocytes lining the third ventricle (Fig. 1c). ACBP immunofluorescence was absent in MBH slices from ACBP KO mice (Fig. 1d). In cortical regions, a similar pattern was observed with ACBP expressed in GFAP-positive cells and scattered neurons (data not shown). Finally, in cultured hypothalamic astrocytes, ACBP was detected in ~ 90% of GFAP-positive cells (Fig. 1e). Thus, while ACBP is expressed in few MBH and cortical neurons, its expression is mainly localized in astrocytes and ependymocytes in agreement with previous studies (Christian and Huguenard 2013; Lanfray et al. 2013).

ACBP deficiency alters LCFA-CoA profile and unsaturated LCFA metabolism

Given the suggested role of ACBP as a LCFA-CoA pool former (Faergeman et al. 2007), we assessed the impact of ACBP deficiency on LCFA-CoA levels in the brain using HPLC. Unlike what was observed in the liver of ACBP KO mice (Nees et al. 2011), no general decrease in LCFA-CoA levels was detected in cortical and hypothalamic regions of these mice (Fig. 2a and b). While palmitoyl- (C16) and oleyl-CoA (C18:1) levels were similar in WT and KO brain regions, stearoyl-CoA (C18) level was significantly increased in the cortical and hypothalamic regions of ACBP KO mice.

Since LCFA-CoA levels do not necessarily reflect changes in LCFA metabolic fluxes, we measured oxidation and esterification rates of different type of LCFA, saturated, palmitate (C16), and stearate (C18), as well as unsaturated oleate, (C18:1) and α -linolenate (C18:3), in hypothalamic slices and/or cultured astrocytes. Palmitate, stearate, and oleate were chosen because they are the most abundant circulating LCFA (Takahashi et al. 2013). In addition, we previously reported a differential metabolic fate of palmitate and oleate in the hypothalamus (Taib et al. 2013). Alpha-linolenate is an essential omega-3 PUFA, the precursor of eicosapentaenoate, (20:5) and docosahexaenoate (22:6) synthesis.

In hypothalamic astrocytes derived from ACBP WT, Het, and KO mice, palmitate and stearate oxidation were not affected by the deletion of ACBP (Fig. 2c). In contrast, oleate and α -linolenate oxidation were significantly decreased by $\sim 40\%$ in hypothalamic astrocytes (Fig. 2d). A similar pattern was observed in cortical astrocytes in which oleate but not stearate oxidation was decreased by the lack of ACBP (Fig. 2e). To assess whether these results were representative of *in vivo* conditions, oxidation rates were measured in MBH slices derived from 4 to 5 weeks old ACBP WT and KO mice. Similarly to what was observed in astrocytes, oleate but not palmitate oxidation was affected by lack of ACBP in slices (Fig. 2f).

To determine whether alteration of unsaturated LCFA oxidation translates into changes in esterification, we measured the incorporation of oleate and palmitate into neutral lipids including diacylglycerol (DAG), TAG, non-esterified FA, and PL using TLC in MBH slices and astrocyte cultures derived from ACBP WT and KO mice. Oleate was mainly esterified into TAG and PL in astrocytes with higher incorporation into PL in hypothalamic versus cortical astrocytes (Fig. 3a). In cortical astrocytes, oleate esterification was not affected by ACBP deficiency (Fig. 3a) whereas its esterification into TAG and PL was significantly decreased in ACBP KO hypothalamic astrocytes. Importantly, oleate transport was similar in WT and KO hypothalamic astrocytes (3.45 ± 0.7 vs. 3.42 ± 0.4 nmol/mg/h, $n = 3-4$). In contrast to oleate, palmitate esterification was not affected in MBH slices (data not shown) and hypothalamic astrocytes derived from ACBP KO animals (Fig. 3b). Thus, ACBP deficiency specifically affects unsaturated LCFA metabolism in astrocytes.

ACBP deficiency alters the expression of genes involved in LCFA metabolism

We assessed the impact of ACBP deficiency on the expression profile of genes involved in FA transport (cluster of differentiation 36, CD36; fatty acid transport protein 1 and 4), intracellular binding (fatty acid binding protein 7; FABP7), synthesis (acetyl-CoA carboxylase, ACC; fatty acid synthase, FAS), desaturation (stearoyl-CoA desaturase 1), oxidation (carnitine palmitoyl transferase-1a), esterification (glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT; 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase, AGPAT; diacylglycerol acyltransferase), and in ceramide synthesis (ceramide synthase, CERS; serine palmitoyltransferase long-chain, SPTLC) in cortical and hypothalamic astrocytes. Only the AGPAT and CERS isoforms showing significant level of expression were studied. FABP7, the predominant FABP isoform in astrocytes (Liu et al. 2010), was significantly decreased in cortical and hypothalamic KO astrocytes (Fig. 4a and b). Interestingly, we observed a differential alteration of the gene expression profile in cortical versus hypothalamic astrocytes. In cortical cells, ACBP deficiency led to a decreased expression of genes involved in FA synthesis including ACC1 and FAS, whereas the expression of genes coding for the esterification enzymes AGPAT 1 and 4 was increased in KO astrocytes (Fig. 4a). In hypothalamic astrocytes, the genes mostly affected by ACBP deficiency were those involved in ceramide synthesis, CERS5 and 6, and SPTLC2 (Fig. 4b).

The fatty acid profile is altered in ACBP KO hypothalamic astrocytes

To assess more globally the impact of ACBP deficiency on FA profile in astrocytes, we quantified by HPLC the intracellular and extracellular levels of MCFA and LCFA in WT and KO hypothalamic astrocytes in basal and palmitate-treated conditions. Since palmitate partitioning between oxidation and esterification was not affected by lack of ACBP (Figs 2 and 3), we reasoned that palmitate would be a good candidate to test if palmitate desaturation and/or elongation might be affected in ACBP KO cells, and to test the overall impact of palmitate on FA content and release. In WT hypothalamic astrocytes in control conditions, myristate (C14), palmitate (C16), stearate (C18), and oleate (C18:1) were the most abundant intracellular FA (Fig. 5a). Interestingly, the intracellular level of several FA,

with the exception of arachidonate (C20:4), was significantly increased in ACBP KO astrocytes (Fig. 5a). The total amount of MCFA and LCFA was significantly increased by ~ 1.4 fold in KO versus WT astrocytes (Fig. 5b). As expected palmitate treatment led to a ~ 1.85 and ~ 1.75 fold increase in intracellular palmitate levels in WT and KO astrocytes, respectively (Fig. 5a). Palmitate significantly increased palmitoleate (C16:1) levels in WT but not KO astrocytes and tended to increase octanoate (C8), myristate and oleate levels in WT astrocytes (Fig. 5a). The total amount of FA was significantly increased in response to palmitate in WT and KO astrocytes with KO cells showing the highest level of FA (Fig. 5b). Thus, ACBP deficiency leads to increased FA levels in astrocytes.

We next investigated whether the capacity of astrocytes to release FA was altered by the lack of ACBP. Octanoate, myristate, palmitate, stearate, and oleate were the most abundant FA found in the media (Fig. 5c). Octanoate level in the media was increased, whereas decanoate (C10), palmitoleate, and arachidonate release was decreased in KO astrocytes in control conditions. The total amount of FA released was not significantly affected by ACBP deficiency in basal conditions (Fig. 5d). Palmitate increased media levels of octanoate, myristate, and stearate. The level of palmitate in the media of palmitate-treated cells is not represented in Fig. 5c for scale reasons. The total amount of FA released in the media (without including palmitate) was significantly increased by palmitate in WT but not ACBP KO astrocytes (Fig. 5d). Thus, ACBP deficiency increases intracellular FA levels but decreases FA release from astrocytes.

Discussion

The main objective of this study was to examine the role of ACBP in central LCFA metabolism. Using complementary models derived from ACBP KO mice, we demonstrate that ACBP is mainly expressed in astrocytes *in vivo* and *in vitro* and establish that ACBP deficiency alters LCFA metabolic fluxes (oxidation and esterification) in a LCFA-dependent manner in hypothalamic slice preparations and cultured astrocytes. Furthermore, lack of ACBP differently impacts LCFA esterification and gene expression profile in cortical versus hypothalamic astrocytes. The modifications of LCFA metabolic fluxes in ACBP KO astrocytes were associated with changes in intracellular content and release of

different FA species in hypothalamic astrocytes. Taken together, these findings demonstrate for the first time that ACBP is a regulator of LCFA metabolism in astroglial cells.

ACBP has been proposed to act as an acyl-CoA pool former. As a result, the increase in stearoyl-CoA levels observed in the hypothalamus and cortex of ACBP KO mice could seem paradoxical. However, a similar increase has been observed after depletion of ACBP in yeast (Gaigg et al. 2001). The reason is unclear but the present observation may have resulted from a central compensatory mechanism and/or changes in circulating LCFA in ACBP KO mice. Plasma FA levels are similar in 3-week-old WT and KO mice (data not shown), however this does not preclude changes in specific LCFA species. Also, we cannot rule out that other acyl-CoA species or total acyl-CoA level are decreased in ACBP KO brains. Nevertheless, these results show that ACBP deficiency perturbs LCFA-CoA profile in the brain.

Since LCFA-CoA levels do not necessarily reflect changes in LCFA metabolic fluxes, we measured oxidation and esterification rates of different types of LCFA in hypothalamic slices and astrocytes. Our results demonstrate that ACBP deficiency reduces the oxidation of monounsaturated (oleate) and polyunsaturated (α -linolenate) LCFA while saturated LCFA oxidation (palmitate and stearate) is not affected.

The unchanged palmitate and stearate oxidation contrasts with a recent report showing decreased palmitate oxidation in response to ACBP down-regulation in cancer cells (Harris et al. 2014). The reason for this discrepancy is unclear but may be explained by differences in the cell type. ACBP has a lower affinity for saturated versus unsaturated LCFA, which is consistent with the specific decrease in oleate and α -linolenate oxidation. In addition, our previous study suggests that oleate oxidation is peroxisomal rather than mitochondrial compared to palmitate in hypothalamic slices (Taib et al. 2013). Thus, ACBP might shuttle oleyl-CoA to the peroxisome to undergo oxidation. Alternatively, it is possible that ACBP deficiency in astrocytes interferes with the activity of enoyl-CoA isomerase and dienoyl-CoA reductase, two enzymes required for the oxidation of unsaturated LCFA (Kunau et al. 1995).

The notion that ACBP specifically regulates unsaturated LCFA oxidative fluxes was supported by the alteration of oleate but not palmitate esterification into neutral lipids in ACBP KO astrocytes. Interestingly, the decrease in oleate esterification was only observed in hypothalamic astrocytes. Although the reason for this difference between cortical and hypothalamic astrocytes is unclear, the increased expression of the esterification enzymes AGPAT1 and 4 (involved in DAG formation) specifically in cortical astrocytes may contribute to maintaining normal oleate esterification rates in cortical KO cells. Nonetheless, the decreased oleate esterification in ACBP-deficient hypothalamic astrocytes is in agreement with previous studies showing that ACBP down-regulation in *C. elegans* led to a decreased TAG content (Elle et al. 2011) while its over-expression increased LCFA esterification into TAG and PL in mouse liver (Huang et al. 2005). Importantly, fatty acid transporter expression (CD36 and fatty acid transport proteins) and oleate transport were similar in WT and KO hypothalamic astrocytes, ruling out the possibility that decreased oleate metabolism results from alteration of its uptake.

In line with the idea that loss of ACBP differently impacts cortical versus hypothalamic astrocytes, we found differences in the gene expression profile when comparing cortical and hypothalamic astrocytes lacking ACBP. Indeed, ACBP deficiency resulted in down-regulation of genes coding for enzymes of de novo FA synthesis, ACC, and FAS, in cortical astrocytes. This is in agreement with the previous results showing decreased expression of ACC and FAS in the liver of pre-weaned ACBP KO mice (Nees et al. 2011). In hypothalamic astrocytes, CERS5 and 6 and SPTLC2 were increased in KO hypothalamic astrocytes suggesting that ACBP might regulate ceramide levels in these cells. Additional studies will be necessary to validate if changes in gene expression translate into changes in FA and/or ceramide synthesis but these findings support the concept that astrocytes from different brain regions have specific FA metabolic features (Taib et al. 2013). Of importance, only FABP7 expression was similarly affected by ACBP KO in both cell types. FABP7 is the brain isoform and several lines of evidence support its role in central FA metabolism and action (Liu et al. 2010). FABPs are well known to bind FA but are able to bind acyl-CoA as well, though at a much lower affinity compared to ACBP (Knudsen et al. 2000). Our gene expression results suggest that ACBP deficiency is not compensated for by increased level of FABP7. On the contrary, lack of ACBP may reduce the overall cellular FA and acyl-CoA binding capacity.

Taken together, our results showing altered expression of endoplasmic reticulum (ER)-associated enzymes (AGPAT, CERS, and SPTLC) and decreased oleate esterification support the role of ACBP in ER function. This is in agreement with the reported localization of ACBP in the ER (Chao et al. 2003; Hansen et al. 2008). Whether or not ACBP regulates other functions such as ER stress or cholesterol synthesis in astrocytes remains to be determined.

Importantly, our results indicate that intracellular metabolism of unsaturated LCFA is not entirely dependent on ACBP. This is consistent with the expression of other proteins that bind FA and/or acyl-CoA in astrocytes including FABP5 (Liu et al. 2010), α -synuclein (Castagnet et al. 2005) and Sterol carrier protein-2 (Frolov et al. 1996; Micevych et al. 2007). Interestingly, the alterations in LCFA metabolic fluxes and FA content observed in KO cells in our study are reminiscent of the changes described in α -synuclein KO astrocytes. Indeed, α -synuclein loss-of-function in cultured astrocytes affects FA uptake, incorporation and distribution in specific lipid pools in a FA-type-dependent manner (Castagnet et al. 2005). Similarly, FABP7 loss-of function specifically affects palmitate and arachidonate levels in the brain (Owada et al. 2006). Together, these observations suggest that different types and/or isoforms of binding proteins regulate the metabolic fate of specific FA species. Our findings on the FA profile in hypothalamic astrocytes highlight a number of important points.

First, the intracellular content of several LCFA species in astrocytes is in agreement with the levels reported in the brain in which palmitate, stearate, and oleate are the most represented LCFA (Arsenault et al. 2012; Camargo et al. 2012). The combined levels of linoleate (C18:2) and docosahexaenoate are relatively low in cultured astrocytes compared to brain levels, which is consistent with the fact that docosahexaenoate is highly enriched in neurons.

Second, ACBP loss-of-function alters the intracellular content of specific MCFA and LCFA in basal conditions leading to an overall increase in the total intracellular FA level. These results are consistent with the reduction in unsaturated LCFA oxidation and esterification rates observed in KO astrocytes (Figs 2 and 3) that may favor FA accumulation. Of interest, FABP7 loss-of-function increases the levels

of palmitate and arachidonate in brain lipids (Owada et al. 2006). Thus, we cannot rule out that the increased FA content observed in our study results in part from decreased FABP7 expression in ACBP KO cells (Fig. 4). In addition, there is a possibility that ACBP deficiency leads to incomplete unsaturated LCFA oxidation which, in turn, favors the accumulation of MCFA such as octanoate and laurate (Kunau et al. 1995). Finally, the increased FA levels found in KO astrocytes may result from decreased LCFA elongation processes. This idea is supported by recent findings showing that lack of ACBP decreases VLCFA content while it increases specific species of LCFA in the skin stratum corneum (Bloksgaard et al. 2012).

In terms of palmitate effect on the FA profile, we observed, as expected, that palmitate treatment led to a 1.85-fold increase in intracellular palmitate content in WT astrocytes. The fold increase in palmitate level was similar in KO astrocytes (~ 1.75 fold). We were expecting to detect increased stearate and oleate levels in response to palmitate in WT astrocytes since both LCFA can be generated from palmitate by elongation and elongation plus SCD1-mediated desaturation. Oleate levels tended to be higher in palmitate-treated WT astrocytes but they did not reach statistical significance, making it difficult to determine if oleate content is modulated by palmitate or lack of ACBP. It is conceivable that longer treatment (> 2 h) might be required to modulate stearate and oleate intracellular levels. Interestingly, palmitate-induced accumulation of palmitoleate (monounsaturated palmitate) was impaired in ACBP KO astrocytes, suggesting that ACBP regulates desaturation processes. While the fold increase in total cellular FA content in response to palmitate tended to be lower in KO astrocytes (~ 1.2 vs. ~ 1.35 in WT cells), it was not statistically different compared to WT astrocytes, suggesting that the lack of ACBP does not affect the overall response to exogenous palmitate.

Third, ACBP deficiency alters the release of specific MCFA and LCFA species by astrocytes in basal conditions including octanoate, laurate, palmitoleate, and arachidonate. Of importance, palmitate increased total FA release by ~ 20% in WT astrocytes, a response that was absent in ACBP KO astrocytes, suggesting that ACBP regulates FA release. Although the release of FA species such as myristate and stearate was increased by palmitate, octanoate contributed to most of the overall

increase in FA release in response to palmitate in WT astrocytes. It is unclear how lack of ACBP inhibits palmitate-induced FA release. However, the decrease of FABP7 expression in KO astrocytes (Fig. 4) may affect FA cellular trafficking, and therefore their release. To our knowledge, this is the first study reporting the release profile of MCFA and LCFA species in hypothalamic astrocytes and demonstrating that this process is regulated by palmitate in an ACBP-dependent manner. The glial release of oleate and arachidonate is in agreement with previous studies (Taberero et al. 2001; Strokin et al. 2003). Our results add to the list of FA released by astrocytes and suggest that they may also provide neurons with myristate, palmitate, and stearate *in vivo*. Octanoate was the most abundant FA found in the media. Whether or not astrocytes release octanoate *in vivo* is unknown. However, it was shown that octanoate can contribute 20% of oxidative metabolism to the brain and constitutes a substrate for glutamine synthesis in astrocytes (Ebert et al. 2003), suggesting that astrocyte-derived octanoate may play a significant role as a metabolic substrate *in vivo*.

PUFA including, arachidonate and docosahexaenoate (an essential omega-3 PUFA), are synthesized from omega-3 and -6 precursors and released by astrocytes to regulate important functions in the central nervous system (Moore 2001). The extracellular release of AA and DHA (docosahexaenoate) from membrane PL is regulated by different signals (i.e., ATP and glutamate) in a phospholipase A2-dependent manner in astrocytes (Strokin et al. 2003). Interestingly, AA release in ACBP KO astrocytes was significantly decreased in basal conditions. Free cellular arachidonate level was similar in WT and KO astrocytes, however we cannot rule out that arachidonate in membrane PL is decreased in ACBP KO astrocytes. Palmitate did not modulate arachidonate release, suggesting that palmitate does not affect phospholipase A2 activity. In contrast to arachidonate, no changes were observed in the combined media levels of linoleate and docosahexaenoate in response to palmitate or ACBP deficiency. However, since our HPLC analysis did not allow us to discriminate linoleate from docosahexaenoate, we cannot rule out that their respective levels are affected by lack of ACBP. Additional studies using radiolabeled tracers will be required to confirm whether or not ACBP regulates AA and docosahexaenoate release per se and if PUFA synthesis from radiolabeled precursors is a process involving ACBP.

One limitation of our study is related to the astrocyte culture model generated from post-natal brain (P1). First, a previous study established that the number of days in vitro affects FA composition in cortical astrocytes (Murphy et al. 1997). Our astrocyte cultures were used at ~ 70% confluence which was reached after 14–20 days in vitro. Thus, it is possible that our results were in part confounded by a variable number of days in vitro when comparing different cultures. However, WT, Het, and KO astrocyte cultures were generated from littermates (ACBP Het breeding scheme) and always used for metabolic measurements after the same number of days in culture, ruling out the possibility that differences observed between WT and KO cells result from the age of the culture. Second, while the adult brain mostly uses glucose as a metabolic substrate, the brain highly relies on ketone bodies and FA during the lactation period (Nehlig 2004). Therefore, it is expected that FA metabolism in cultured P1 astrocytes might be different compared to adult astrocytes. As a result, we cannot rule out that the alterations of LCFA metabolism observed in P1 astrocytes are specific to this developmental stage. However, the fact that a similar decrease in oleate oxidation was observed in hypothalamic slices generated from P30 mice and in P1 astrocytes, suggests that the function of ACBP is conserved and not dependent on the age of the animals.

Altogether, our results show that ACBP deficiency alters the LCFA-CoA profile in the brain, impairs LCFA oxidation and esterification in a LCFA type-dependent manner both in MBH slices and astrocyte cultures, and affects gene expression and FA profile in astrocytes. Our findings suggest that ACBP may play an important role in the hypothalamus. Hypothalamic LCFA action to inhibit feeding and hepatic glucose production mainly relies on their intracellular metabolism (Lam et al. 2009). Importantly, the effect of LCFA on feeding is dependent on the type of LCFA. Indeed, unsaturated LCFA, including oleate and docosahexaenoate, but not palmitate, have an anorectic action *in vivo* (Obici et al. 2002; Schwinkendorf et al. 2010). Our results showing that ACBP specifically affects unsaturated LCFA metabolic fluxes in the hypothalamus, combined with previous studies highlighting the contribution of hypothalamic astrocytes in LCFA metabolism (Taib et al. 2013) and sensing (Le Foll et al. 2014), make it tempting to speculate that ACBP may be involved in central unsaturated LCFA action on feeding. Further studies using astrocyte-specific ACBP loss-of-function will be required to address this hypothesis.

More generally, our findings suggest that ACBP may regulate central processes and functions known to be modulated by LCFA including neurogenesis, neuroinflammation, and cognition (Haast and Kiliaan 2015).

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

Acknowledgments and conflict of interest disclosure

This project was supported by grants to TA from the Canadian Institutes of Health Research (MOP115042), Fonds de Recherche Quebec-Sante, Societe Francophone du Diabete and Canadian Foundation for Innovation. BT and KB were supported by a doctoral fellowship from Diabete Quebec and University of Montreal. We thank the metabolomics core facility of CRCHUM for their assistance with the measurement of fatty acid profiles. We thank Drs Marc Prentki and Murthy Madiraju for critical discussions.

All experiments were conducted in compliance with the ARRIVE guidelines. The authors have no conflict of interest to declare.

References

- Alfonso, J.**, Le Magueresse, C., Zuccotti, A., Khodosevich, K. and Monyer, H. (2012) Diazepam binding inhibitor promotes progenitor proliferation in the postnatal SVZ by reducing GABA signaling. *Cell stem cell*, 10, 76-87.
- Alho, H.**, Costa, E., Ferrero, P., Fujimoto, M., Cosenza-Murphy, D. and Guidotti, A. (1985) Diazepam-binding inhibitor: a neuropeptide located in selected neuronal populations of rat brain. *Science*, 229, 179-182.
- Arsenault, D.**, Julien, C., Chen, C. T., Bazinet, R. P. and Calon, F. (2012) Dietary intake of unsaturated fatty acids modulates physiological properties of entorhinal cortex neurons in mice. *Journal of neurochemistry*, 122, 427-443.
- Bloksgaard, M.**, Bek, S., Marcher, A. B. et al. (2012) The acyl-CoA binding protein is required for normal epidermal barrier function in mice. *Journal of lipid research*, 53, 2162-2174.
- Burton, M.**, Rose, T. M., Faergeman, N. J. and Knudsen, J. (2005) Evolution of the acyl-CoA binding protein (ACBP). *The Biochemical journal*, 392, 299-307.
- Camargo, N.**, Brouwers, J. F., Loos, M., Gutmann, D. H., Smit, A. B. and Verheijen, M. H. (2012) High-fat diet ameliorates neurological deficits caused by defective astrocyte lipid metabolism. *FASEB J*, 26, 4302-4315.
- Camargo, N.**, Smit, A. B. and Verheijen, M. H. (2009) SREBPs: SREBP function in glia-neuron interactions. *The FEBS journal*, 276, 628-636.
- Castagnet, P. I.**, Golovko, M. Y., Barcelo-Coblijn, G. C., Nussbaum, R. L. and Murphy, E. J. (2005) Fatty acid incorporation is decreased in astrocytes cultured from alpha-synuclein gene-ablated mice. *Journal of neurochemistry*, 94, 839-849.
- Chao, H.**, Zhou, M., McIntosh, A., Schroeder, F. and Kier, A. B. (2003) ACBP and cholesterol differentially alter fatty acyl CoA utilization by microsomal ACAT. *Journal of lipid research*, 44, 72-83.
- Chowen, J. A., Argente, J. and Horvath, T. L. (2013) Uncovering novel roles of nonneuronal cells in body weight homeostasis and obesity. *Endocrinology*, 154, 3001-3007.
- Christian, C. A.**, Herbert, A. G., Holt, R. L., Peng, K., Sherwood, K. D., Pangratz-Fuehrer, S., Rudolph, U. and Huguenard, J. R. (2013) Endogenous positive allosteric modulation of GABA(A) receptors by diazepam binding inhibitor. *Neuron*, 78, 1063-1074.
- Christian, C. A.** and Huguenard, J. R. (2013) Astrocytes potentiate GABAergic transmission in the thalamic reticular nucleus via endozepine signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 20278-20283.
- Do Rego, J. L., Seong, J. Y., Burel, D. et al. (2012) Regulation of neurosteroid biosynthesis by neurotransmitters and neuropeptides. *Frontiers in endocrinology*, 3, 4.
- Ebert, D.**, Haller, R. G. and Walton, M. E. (2003) Energy contribution of octanoate to intact rat brain metabolism measured by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Neurosci*, 23, 5928-5935.
- Elle, I. C.**, Simonsen, K. T., Olsen, L. C., Birck, P. K., Ehmsen, S., Tuck, S., Le, T. T. and Faergeman, N. J. (2011) Tissue- and paralogue-specific functions of acyl-CoA-binding proteins in lipid metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *The Biochemical journal*, 437, 231-241.
- Faergeman, N. J.**, Wadum, M., Feddersen, S., Burton, M., Kragelund, B. B. and Knudsen, J. (2007) Acyl-CoA binding proteins; structural and functional conservation over 2000 MYA. *Molecular and cellular biochemistry*, 299, 55-65.
- Frolov, A.**, Cho, T. H., Billheimer, J. T. and Schroeder, F. (1996) Sterol carrier protein-2, a new fatty acyl coenzyme A-binding protein. *J Biol Chem*, 271, 31878-31884.

Gaigg, B., Neergaard, T. B., Schneiter, R. et al. (2001) Depletion of acyl-coenzyme A-binding protein affects sphingolipid synthesis and causes vesicle accumulation and membrane defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*, 12, 1147-1160.

Guidotti, A., Forchetti, C. M., Corda, M. G., Konkel, D., Bennett, C. D. and Costa, E. (1983) Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 3531-3535.

Guzman, M. and Blazquez, C. (2001) Is there an astrocyte-neuron ketone body shuttle? *Trends Endocrinol Metab*, 12, 169-173.

Haast, R. A. and Kiliaan, A. J. (2014) Impact of fatty acids on brain circulation, structure and function. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids, doi: 10.1016/j.plefa.2014.01.002.

Hansen, J. S., Faergeman, N. J., Kragelund, B. B. and Knudsen, J. (2008) Acyl-CoA-binding protein (ACBP) localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi in a ligand-dependent manner in mammalian cells. *The Biochemical journal*, 410, 463-472.

Harris, F. T., Rahman, S. M., Hassanein, M. et al. (2014) Acyl-coenzyme A-binding protein regulates Beta-oxidation required for growth and survival of non-small cell lung cancer. *Cancer prevention research*, 7, 748-757.

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

Just, M., Faergeman, N. J., Knudsen, J., Beck-Nielsen, H. and Gaster, M. (2006) Long-chain Acyl-CoA is not primarily increased in myotubes established from type 2 diabetic subjects. *Biochimica et biophysica acta*, 1762, 666-672.

Knudsen, J., Faergeman, N. J., Skott, H. et al. (1994) Yeast acyl-CoA-binding protein: acyl-CoA-binding affinity and effect on intracellular acyl-CoA pool size. *The Biochemical journal*, 302 (Pt 2), 479-485.

Knudsen, J., Neergaard, T. B., Gaigg, B., Jensen, M. V. and Hansen, J. K. (2000) Role of acyl-CoA binding protein in acyl-CoA metabolism and acyl-CoA-mediated cell signaling. *J Nutr*, 130, 294S-298S.

Kunau, W. H., Dommes, V. and Schulz, H. (1995) beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog Lipid Res*, 34, 267-342.

Lam, C. K., Chari, M. and Lam, T. K. (2009) CNS regulation of glucose homeostasis. *Physiology*, 24, 159-170.

Lanfray, D., Arthaud, S., Ouellet, J. et al. (2013) Gliotransmission and brain glucose sensing: critical role of endozepines. *Diabetes*, 62, 801-810.

Le Foll, C., Dunn-Meynell, A. A., Mizioroko, H. M. and Levin, B. E. (2014) Regulation of hypothalamic neuronal sensing and food intake by ketone bodies and fatty acids. *Diabetes*, 63, 1259-1269.

Liu, R. Z., Mita, R., Beaulieu, M., Gao, Z. and Godbout, R. (2010) Fatty acid binding proteins in brain development and disease. *The International journal of developmental biology*, 54, 1229-1239.

Loomis, W. F., Behrens, M. M., Williams, M. E. and Anjard, C. (2010) Pregnenolone sulfate and cortisol induce secretion of acyl-CoA-binding protein and its conversion into endozepines from astrocytes. *J Biol Chem*, 285, 21359-21365.

Malagon, M., Vaudry, H., Van Strien, F., Pelletier, G., Gracia-Navarro, F. and Tonon, M. C. (1993) Ontogeny of diazepam-binding inhibitor-related peptides (endozepines) in the rat brain. *Neuroscience*, 57, 777-786.

Micevych, P. E., Chaban, V., Ogi, J., Dewing, P., Lu, J. K. and Sinchak, K. (2007) Estradiol stimulates progesterone synthesis in hypothalamic astrocyte cultures. *Endocrinology*, 148, 782-789.

Moore, S. A. (2001) Polyunsaturated fatty acid synthesis and release by brain-derived cells in vitro. *J Mol Neurosci*, 16, 195-200; discussion 215-121.

Morton, G. J., Cummings, D. E., Baskin, D. G., Barsh, G. S. and Schwartz, M. W. (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, 443, 289-295.

Murphy, E. J., Rosenberger, T. A. and Horrocks, L. A. (1997) Effects of maturation on the phospholipid and phospholipid fatty acid compositions in primary rat cortical astrocyte cell cultures. *Neurochemical research*, 22, 1205-1213.

Neess, D., Bek, S., Bloksgaard, M., Marcher, A. B., Faergeman, N. J. and Mandrup, S. (2013) Delayed hepatic adaptation to weaning in ACBP-/- mice is caused by disruption of the epidermal barrier. *Cell reports*, 5, 1403-1412.

Neess, D., Bloksgaard, M., Bek, S. et al. (2011) Disruption of the acyl-CoA-binding protein gene delays hepatic adaptation to metabolic changes at weaning. *J Biol Chem*, 286, 3460-3472.

Nehlig, A. (2004) Brain uptake and metabolism of ketone bodies in animal models. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, 70, 265-275.

Obici, S., Feng, Z., Morgan, K., Stein, D., Karkanas, G. and Rossetti, L. (2002) Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes*, 51, 271-275.

Owada, Y., Abdelwahab, S. A., Kitanaka, N. et al. (2006) Altered emotional behavioral responses in mice lacking brain-type fatty acid-binding protein gene. *Eur J Neurosci*, 24, 175-187.

Puttmann, M., Krug, H., von Ochsenstein, E. and Kattermann, R. (1993) Fast HPLC determination of serum free fatty acids in the picomole range. *Clinical chemistry*, 39, 825-832.

Rosendal, J., Ertbjerg, P. and Knudsen, J. (1993) Characterization of ligand binding to acyl-CoA-binding protein. *The Biochemical journal*, 290 (Pt 2), 321-326.

Schwinkendorf, D. R., Tsatsos, N. G., Gosnell, B. A. and Mashek, D. G. (2010) Effects of central administration of distinct fatty acids on hypothalamic neuropeptide expression and energy metabolism. *Int J Obes (Lond)*, 35, 336-344.

Strokin, M., Sergeeva, M. and Reiser, G. (2003) Docosahexaenoic acid and arachidonic acid release in rat brain astrocytes is mediated by two separate isoforms of phospholipase A2 and is differently regulated by cyclic AMP and Ca²⁺. *British journal of pharmacology*, 139, 1014-1022.

Taberner, A., Lavado, E. M., Granda, B., Velasco, A. and Medina, J. M. (2001) Neuronal differentiation is triggered by oleic acid synthesized and released by astrocytes. *Journal of neurochemistry*, 79, 606-616.

Taib, B., Bouyakdan, K., Hryhorczuk, C., Rodaros, D., Fulton, S. and Alquier, T. (2013) Glucose Regulates Hypothalamic Long-chain Fatty Acid Metabolism via AMP-activated Kinase (AMPK) in Neurons and Astrocytes. *J Biol Chem*, 288, 37216-37229.

Takahashi, H., Suzuki, H., Suda, K. et al. (2013) Long-chain free fatty acid profiling analysis by liquid chromatography-mass spectrometry in mouse treated with peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 77, 2288-2293.

Tokay, T., Hachem, R., Masmoudi-Kouki, O. et al. (2008) Beta-amyloid peptide stimulates endozepine release in cultured rat astrocytes through activation of N-formyl peptide receptors. *Glia*, 56, 1380-1389.

Zhao, S., Mugabo, Y., Iglesias, J. et al. (2014) alpha/beta-Hydrolase domain-6-accessible monoacylglycerol controls glucose-stimulated insulin secretion. *Cell Metab*, 19, 993-1007.

Figures legend

Figure 1. **Acyl-CoA binding protein (ACBP) expression in the brain and astrocyte cultures.** ACBP expression was determined by western blotting (a) and quantified (b) in the mediobasal hypothalamus (MBH) and cortex of ACBP WT, Het, and KO mice. Co-localization of ACBP immunofluorescence in glial fibrillary acidic protein (GFAP)- (c) and NeuN-positive cells (d) on MBH coronal sections from ACBP WT and KO mice. (e) ACBP and GFAP immunofluorescence in WT (top) and KO (bottom) astrocyte cultures. ME, median eminence; 3V, third ventricle. Results are means \pm SEM, $n = 4$, *** $p < 0.001$ (t -test).

Figure 2. **Acyl-CoA binding protein (ACBP) deficiency alters long-chain fatty acids (LCFA)-CoA levels and impairs oleate oxidation.** LCFA-CoA levels in (a) cortex and (b) hypothalamus of WT and KO mice. Palmitate and stearate (c), and oleate and α -linolenate (d) oxidation rates in WT, Het, and KO hypothalamic astrocytes. (e) Stearate and oleate oxidation in WT, Het, and KO cortical astrocytes. (f) Palmitate and oleate oxidation in WT and KO mediobasal hypothalamic (MBH) slices. Results are means \pm SEM. $n = 4-9$ for LCFA-CoA levels, $n = 4-10$ for stearate and α -linolenate, $n = 8-10$ for palmitate, and $n = 10-12$ for oleate oxidation. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (t -test and one-way anova).

Figure 3. **Acyl-CoA binding protein (ACBP) deficiency alters oleate but not palmitate esterification in hypothalamic astrocytes.** (a) Oleate esterification into DAG, triacylglycerol (TAG), non-esterified fatty acid (NEFA), and phospholipids (PL) in astrocytes derived from WT and KO mice and (b) Palmitate esterification in hypothalamic astrocytes. $n = 7-10$ for oleate esterification and $n = 5-10$ for palmitate. * $p < 0.05$ versus WT and \$\$ $p < 0.01$ versus WT cortical astrocytes (one-way anova).

Figure 4. **Acyl-CoA binding protein (ACBP) deficiency alters the expression of genes involved in long-chain fatty acids (LCFA) metabolism.** Gene expression was determined by qPCR in WT and KO cortical

(a) and hypothalamic (b) astrocytes. mRNA levels were normalized to cyclophilin levels. Results are means \pm SEM with $n = 6-15$. $*p < 0.05$ (t -test).

Figure 5. **Modification of the fatty acid (FA) profile in acyl-CoA binding protein (ACBP) KO hypothalamic astrocytes.** (a and b) Intracellular content and release (c and d) of different FA species in WT and KO hypothalamic astrocytes treated with or without palmitate (0.3 mM) during 2 h. $n = 6$ to 12 per conditions. *, ** and *** $p < 0.05$, 0.01 and 0.001, respectively, versus WT control. \$ and \$\$\$ $p < 0.05$ and 0.001, respectively versus WT Palmitate (one- and two-way anova).

FIGURE 1

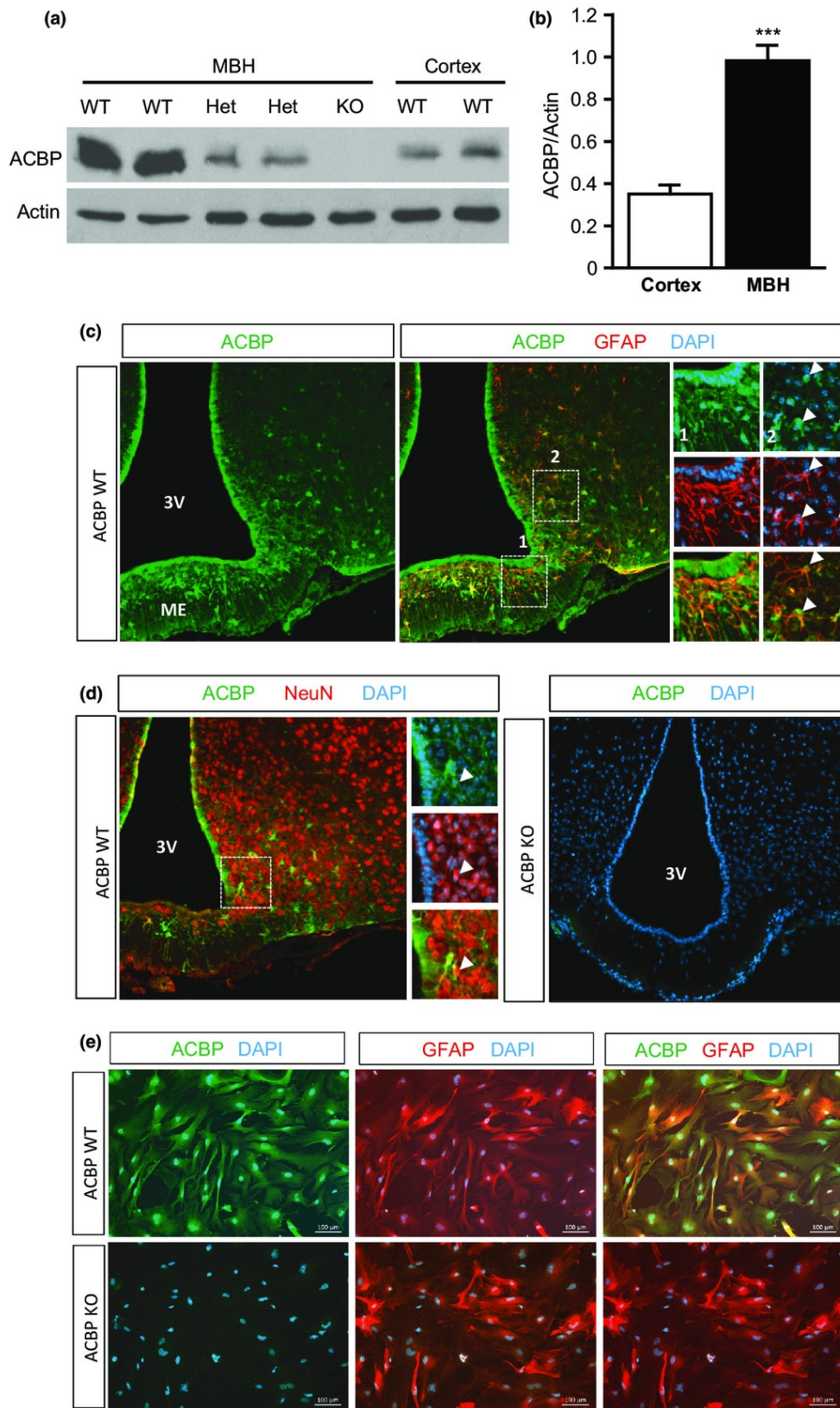


FIGURE 2

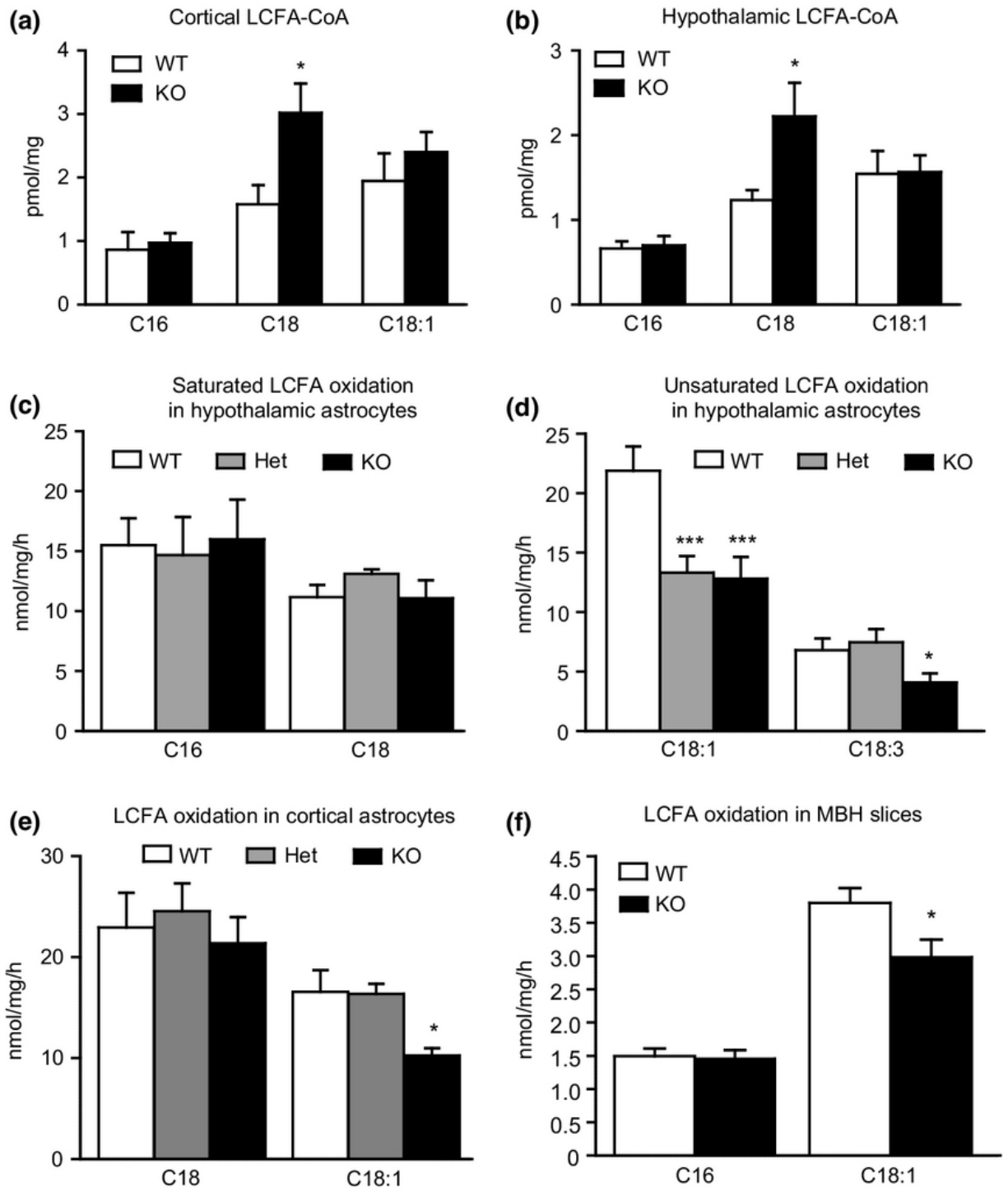
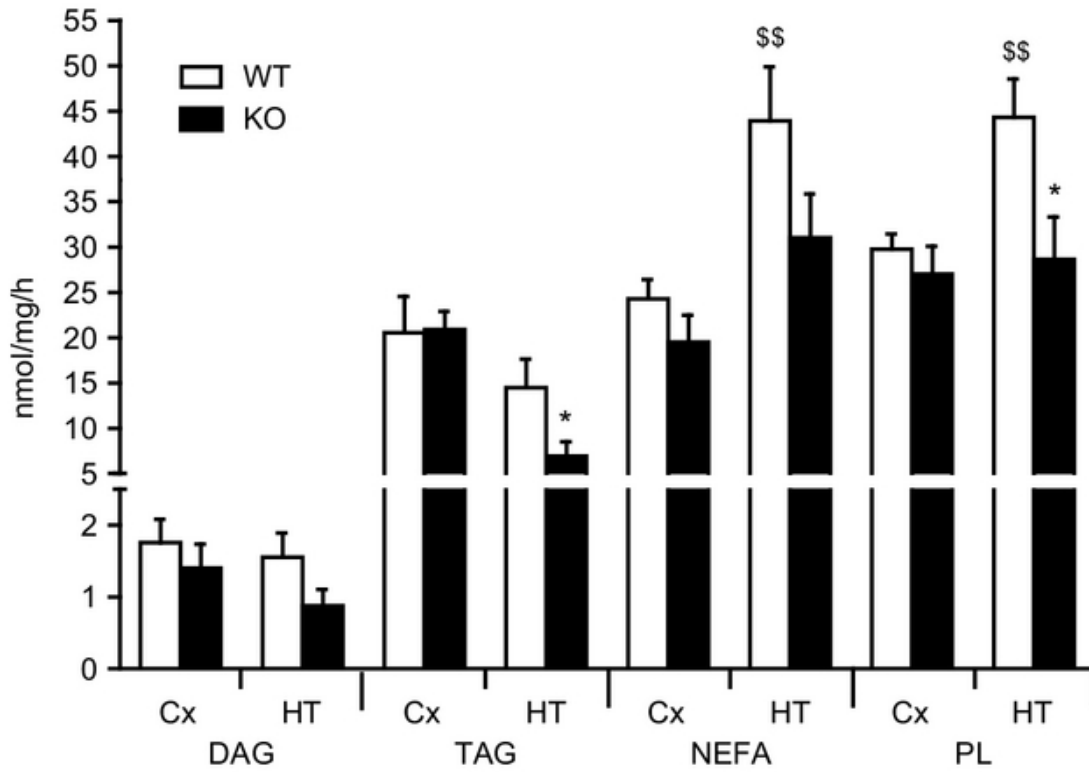


FIGURE 3

(a) Oleate esterification in cortical (Cx) and hypothalamic (HT) astrocytes



(b) Palmitate esterification in hypothalamic astrocytes

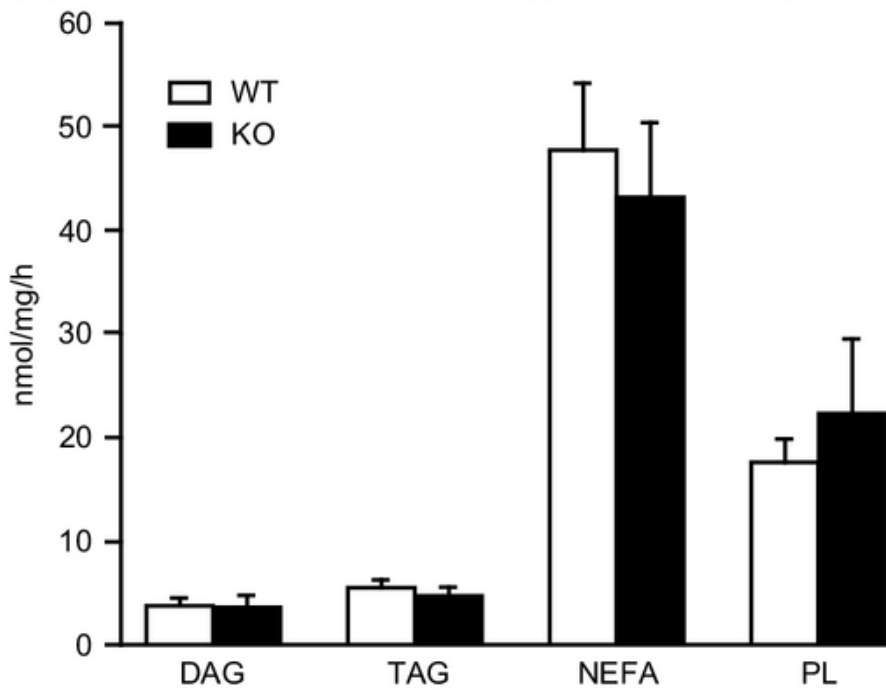


FIGURE 4

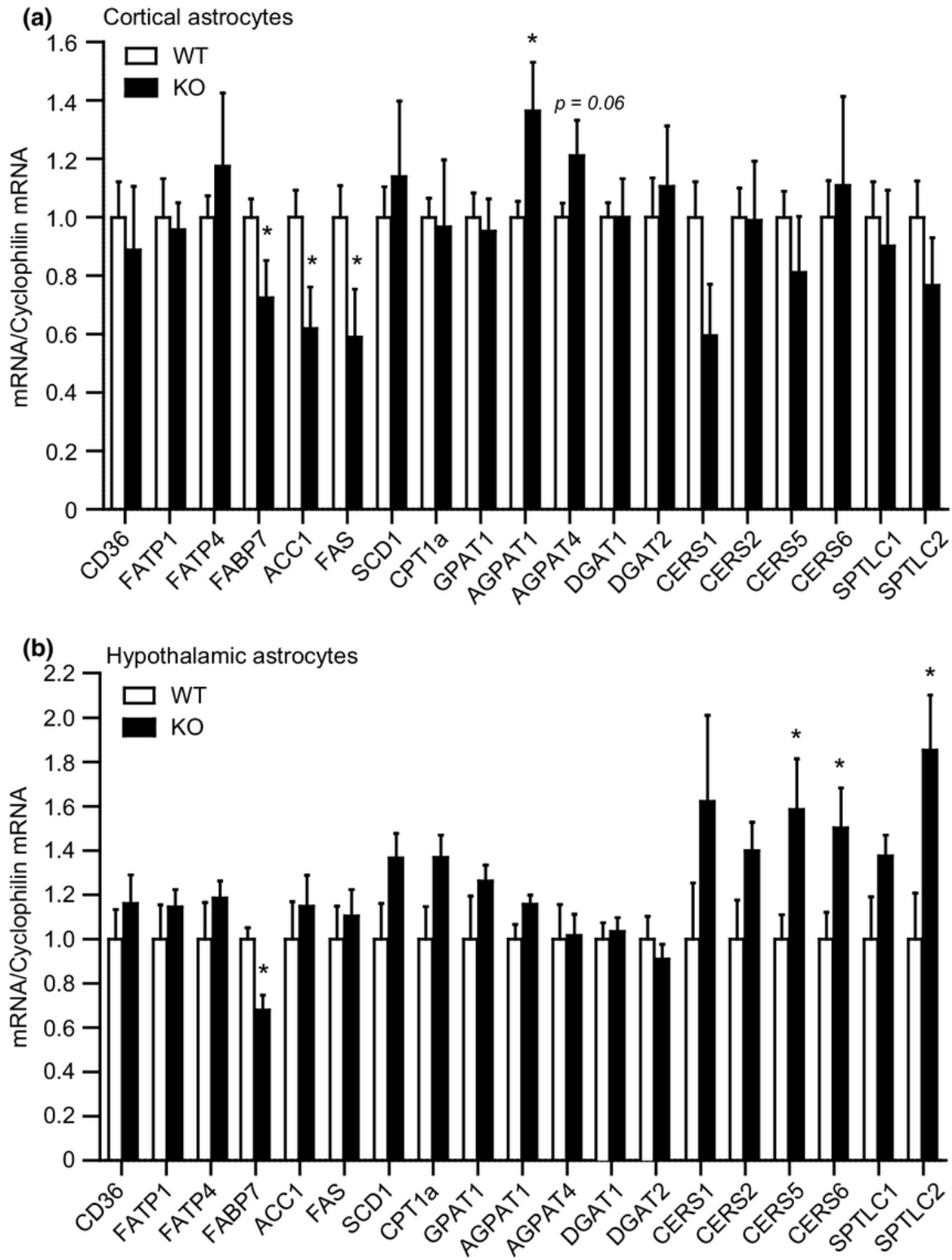
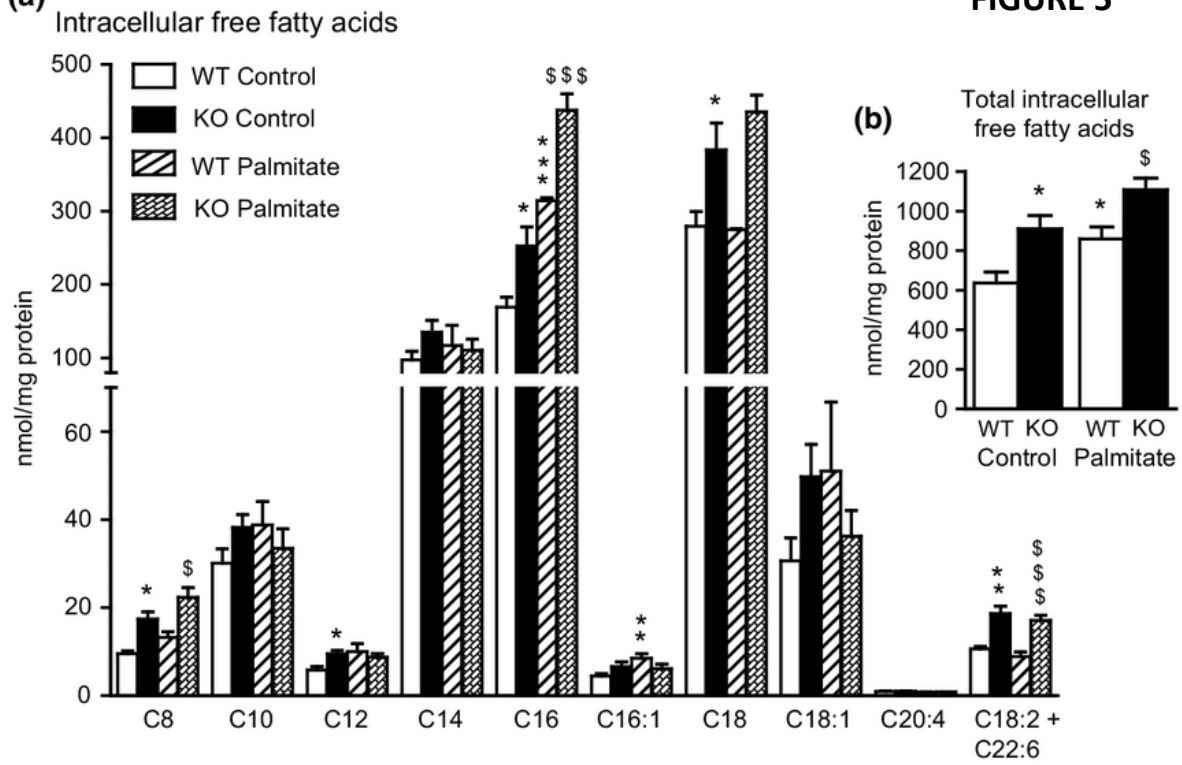
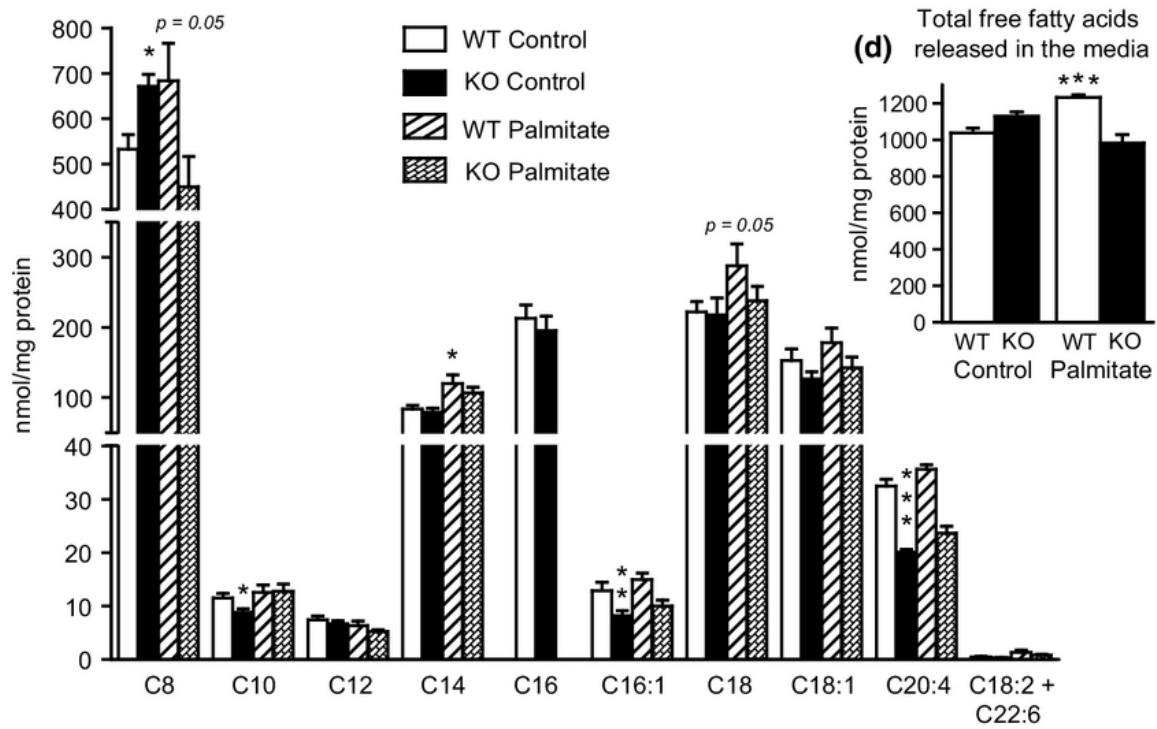


FIGURE 5

(a)



(c) Free fatty acids released



ACBP/DBI regulates hypothalamic melanocortin pathway to modulate feeding and energy homeostasis.

Auteurs : Khalil Bouyakdan, Chloé Chrétien, Alexandre Fiset, Demetra Rodaros, Fabienne Liénard, Eric Biron, Luc Pénicaut, Xavier Fioramonti, Thierry Alquier.

En préparation pour soumission à Cell Metabolism au début 2017

Contribution des auteurs :

Khalil Bouyakdan : Auteur principal, a élaboré les hypothèses, conçu et réalisé la majorité des expériences ayant contribué à des figures. A analysé les données et rédigé le manuscrit.

Chloé Chrétien: Coauteur, a participé à la réalisation des études d'imagerie calcique.

Alexandre Fiset: Coauteur, a participé au phénotypage des souris et à la rédaction du manuscrit.

Demetra Rodaros : Coauteur, a participé au phénotypage des souris et le maintien et génotypage des lignées de souris ACBP flox et GFAP Cre.

Fabienne Liénard: Coauteur, a participé à la réalisation des enregistrements électrophysiologiques.

Eric Biron: Coauteur et collaborateur, a synthétisé l'antagoniste d'ODN.

Luc Pénicaut: Coauteur et collaborateur, a contribué au design expérimental et discussions.

Xavier Fioramonti : Collaborateur principal et directeur de thèse de Chloé Chrétien, a participé aux études d'électrophysiologie.

Thierry Alquier : Directeur de thèse des coauteurs, a dirigé le projet et rédigé le manuscrit.

ACBP/DBI regulates hypothalamic melanocortin pathway to modulate feeding and energy homeostasis.

Khalil Bouyakdan¹, Chloé Chrétien³, Alexandre Fiset², Demetra Rodaros¹, Fabienne Liénard³, Eric Biron⁴, Luc Pénicaud³, Xavier Fioramonti³, Thierry Alquier^{1,5}.

¹ Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montreal Diabetes Research Center, and Departments of Medicine and Biochemistry, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada H3T 1J4.

² CRCHUM and Montreal Diabetes Research Center and Departments of Nutrition, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada H3T 1J4.

³ Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation; UMR 6265 CNRS, 1324 INRA, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France.

⁴ Faculty of Pharmacy, Université Laval and Laboratory of Medicinal Chemistry, Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CRCHUQ), Québec, QC, Canada G1V 4G2.

⁵To whom correspondence should be addressed: Thierry Alquier, CRCHUM-Tour Viger, 900 rue Saint-Denis, Montreal, QC, Canada, H2X0A9. Tel.: (1)514-890-8000#23628; Fax: (1)514-412-7655; E-mail: thierry.alquier@umontreal.ca

ABSTRACT

Unsaturated fatty acid can be detected in the arcuate nucleus (ARC) of the hypothalamus and modulate food intake and peripheral glucose homeostasis. However, the mechanisms by which they act are still unknown. Recent evidences demonstrate that, in astrocytes, Acyl-CoA Binding Protein (ACBP) regulates unsaturated fatty acid metabolism and that the endozepine octadecaneuropeptide (ODN), a secreted peptide derived from the cleavage of ACBP, modulates feeding behaviour and peripheral glucose homeostasis. It was suggested that the anorectic effect of ODN involves the activation of the melanocortin pathway, a key player in the hypothalamic control of energy balance. The aim of the present study was to determine whether ODN specifically activates proopiomelanocortin (POMC) neurons of the ARC to modulate energy homeostasis in a melanocortin-4 receptor (MC4R)-dependent manner. Our results demonstrate that astrocyte-specific deletion of ACBP leads to an exacerbated diet-induced obesity and altered feeding behaviors and that the modulation of food intake by ODN is blunted in MC4R-deficient mice. Using electrophysiological recordings in brain slices from POMC-eGFP mice, we show that ODN selectively increases the firing of GFP-positive neurons, suggesting ODN selectively activates POMC neurons in the ARC. Importantly, ODN can activate POMC neurons independently of GABA_A inhibition. Finally, calcium imaging recordings in dissociated primary hypothalamic neurons show that the antagonist of the putative ODN receptor inhibits ODN-induced calcium oscillations. These findings highlight the importance of ODN and endozepines in the regulation of the melanocortin pathway and open new research avenues related to the hypothalamic control of energy balance by endozepines.

INTRODUCTION

The past two decades have witnessed major advances in our understanding of the control of energy balance by hypothalamic neuronal populations. Much of this control relies on populations of neurons in the arcuate nucleus (ARC) able to detect and integrate various metabolic signals including hormones (e.g. leptin, insulin and ghrelin) and nutrients (i.e. glucose, fatty and amino acids) (Myers and Olson 2012). Neurons responding to these signals are clustered in areas of the hypothalamus including the ARC, ventromedial hypothalamus (VMH), paraventricular nucleus (PVN) and the lateral hypothalamus. In the ARC, metabolic signals are known to modulate the activity of two functionally opposing neuronal populations that project to other nuclei: orexigenic neuropeptide Y (NPY) neurons and anorectic POMC neurons (Myers and Olson 2012). POMC neurons, considered as “catabolic” given their action to decrease food intake and promote energy expenditure, release α -Melanocyte-Stimulating Hormone (α -MSH) that activates the melanocortin-4 receptor (MC4R) in PVN neurons. The importance of the melanocortin pathway in the etiology of obesity and type 2 diabetes is underscored by several lines of evidence showing that impairments in POMC signalling lead to obesity, glucose intolerance and chronic hyperglycemia in rodents (Parton et al. 2007, Berglund et al. 2012) and that mutations in the genes coding for POMC and MC4R are the most frequent form of monogenic human obesity (Vaisse et al. 1998, Yeo et al. 1998, Coll et al. 2004).

In addition to this well-established metabolic neurocircuits, non-neuronal cells of the hypothalamus have recently come to the forefront as new players both in the detection of various nutrients and in the regulation of energy balance and food intake (Argente-Arizon et al. 2015). Previously thought to only provide anatomical and metabolic support for neurons, astrocytes are now thought to be involved in many neuronal processes including nutrient detection, central metabolism of glucose and fatty acids and the regulation of energy balance (Taib et al. 2013, Argente-Arizon et al. 2015, Bouyakdan et al. 2015). Recent studies have also shown that an activation of these hypothalamic glial cells, possibly via the detection of metabolic signals, can regulate feeding behavior. This control involves the secretion of neuroactive substances termed gliotransmitters in order to modulate the activity of various neuronal populations in the ARC (Yang et al. 2015, Chen et al. 2016). However the mechanisms and pathways by which these astrocytes regulate the activity of metabolic neurocircuits in the hypothalamus, particularly in response to nutrient derived signals like glucose and fatty acids,

remain elusive.

Recently, an astrocyte derived peptide, octadecaneuropeptide (ODN), has been shown to decrease food intake (de Mateos-Verchere et al. 2001, do Rego et al. 2007) and increases glucose tolerance in rodents (Lanfray et al. 2013) when administered centrally. Moreover, the appetite-suppressing effect of ODN is blunted by antagonism of MC3R and MC4R (Lanfray et al. 2013) suggesting an involvement of the melanocortin pathway in the anorectic action of ODN. This 18 amino acid peptide is generated from the secretion of the Acyl-CoA Binding Protein (ACBP), a protein known for its role in peripheral fatty acid metabolism, and its subsequent cleavage into ODN (ACBP₃₃₋₅₀) (Farzampour et al. 2015). Since its discovery, multiple studies have shown that ACBP is secreted by cultured astrocytes in response to various stimuli (Tokay et al. 2008, Loomis et al. 2010, Lanfray et al. 2013). ACBP and ODN are considered as endozepine for their ability to displace benzodiazepines from their binding sites on the GABA_A ionotropic receptor (Guidotti et al. 1983, Ferrero et al. 1984). Thus, by acting as a negative allosteric modulator (NAM) of the GABA_A receptor, ODN could contribute to the activation of POMC neurons by blocking GABAergic inhibitory inputs from NPY neurons (Acuna-Goycolea et al. 2005). However, recent studies suggest that the anorectic effect of ODN is not contingent on the GABA_A receptor, but involves the activation of an unknown G-protein coupled receptor (GPCR) that will be termed ODN-GPCR (de Mateos-Verchere et al. 2001, do Rego et al. 2007, Lanfray et al. 2013).

ACBP is expressed throughout the brain, we (Bouyakdan et al. 2015) and others (Lanfray et al. 2013), have shown it to be predominantly expressed in astrocytes and tanycytes. We recently demonstrated that, similar to its role in peripheral tissue, ACBP is an important regulator of intracellular Acyl-CoA accumulation and for the intracellular metabolism of unsaturated, but not saturated, fatty acids in the brain and in astrocytes (Bouyakdan et al. 2015). This modulation of unsaturated fatty acid metabolism suggest that intracellular ACBP could play a role in regulating feeding behavior and energy metabolism, given what we know about the central effects of unsaturated fatty acids on these parameters. Indeed, unsaturated, but not saturated, fatty acids administered centrally are known to decrease feeding (Obici et al. 2002, Schwinkendorf et al. 2011). Furthermore, the hypothalamic detection of unsaturated fatty acid, which is thought to involve their intracellular accumulation as Acyl-CoA, is essential for the modulation of food intake and peripheral glucose metabolism (Obici et al. 2003, Lam et al. 2005, Poci et al. 2006).

Taken together, these findings suggest that intracellular ACBP as well as secreted ODN may be important mediators of the effect of fatty acids on the regulation of feeding and energy metabolism. Despite these evidences, it remains to be determined whether endogenous ACBP and ODN can regulate feeding behavior and energy metabolism in a similar fashion as exogenous ODN. Also, whether ODN, acting as a gliotransmitter, can activate POMC neurons in the ARC and which signalling mechanisms are involved (inhibition of GABA_A receptor and/or activation of an ODN-GPCR) are still unknown.

Thus, the goal of the present study was to 1- determine whether ACBP in astrocytes regulates feeding behavior and energy expenditure *in-vivo*, 2- to determine whether ODN modulates feeding and metabolic responses in a MC4R-dependent manner, 3- establish whether ODN specifically targets and activates POMC neurons of the ARC, and 4- determine the contribution of GABA_A receptor and the ODN-GPCR in the modulation of POMC neurons activity. To this end we have employed complementary approaches and models consisting of astrocyte specific ACBP knockout (KO) as well as MC4R KO mice, electrophysiological recordings in POMC-GFP reporter mice and Ca²⁺ imaging in primary hypothalamic neurons.

We show, using a model of astrocyte specific KO, that endogenous ACBP is involved in regulation of feeding and energy expenditure. We show that the anorectic action of exogenous ODN acts through the melanocortin pathway and we demonstrate, through our electrophysiology and Ca²⁺ imaging data, that ODN specifically targets POMC neurons in the ARC independently of its action on GABAergic signalling but through the ODN-GPCR.

MATERIAL AND METHODS

Animals: ACBP^{fl/fl} mice were kindly donated by Dr Susanne Mandrup (Nees et al. 2013) from University of Southern Denmark (Odense, Denmark) and were backcrossed at least 8 generations on the C57/Bl6 background. Female ACBP^{fl/fl} mice on the C57/Bl6 background were bred with male mice expressing Cre recombinase under the mouse glial fibrillary acidic protein (GFAP) promoter (GFAP-Cre line 73.12 (Stock No. 012886), (Sofroniew 2012) obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). ACBP^{+/+};Cre (WT), ACBP^{fl/+};Cre (HET) and ACBP^{fl/fl};Cre (KO) were obtained by breeding female ACBP^{fl/+} with male ACBP^{fl/+};Cre to obtain littermates of all genotypes.

Male MC4R KO and control wild type (WT, same genetic background) mice (B6;129S4-Mc4r^{tm1Lowl}/J, stock number 006414,) and POMC-eGFP mice (C57BL/6J-Tg(Pomc-EGFP)1Low/J, stock number 009593) were purchased from the Jackson Laboratory.

Animals were group housed on a reverse light-dark cycle (dark cycle from 10AM to 10PM) at 21°C with free access to water and standard chow diet at weaning (for in house bred animals) or for at least ten days before starting the experimentation (for purchased animals). All procedures using animals were approved by the institutional animal care and use committee (Comité Institutionnel de Protection de Animaux, protocol #An12012TArS) of Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) and the French Ministry of Research and local ethic committees of the University of Burgundy (C2EA Grand Campus de Dijon N°105).

Immunohistochemistry: Male mice were perfused intracardially with 4% paraformaldehyde under anaesthesia. The brains were post-fixed in 4% paraformaldehyde, cryopreserved in 20% sucrose, and cryosectioned at 16 µm using a cryostat. Sections were blocked and incubated with primary antibodies overnight at 4°C followed by 2 h incubation at 22°C with secondary antibodies. Sections were mounted and imaged with a Zeiss fluorescent microscope (Carl Zeiss AG, Jena, Germany). Primary antibodies used were anti-ACBP (1:100; kind gift from Dr Mandrup), anti-glial fibrillary acidic protein (1:100, Mab360, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) and anti-NeuN (1:100, Mab377, Millipore). Secondary antibodies were Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG and Alexa Fluor® 546 Goat Anti-Mouse IgG (1:150, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Real-time PCR: Real-time PCR was performed as previously described (Bouyakdan et al. 2015). Briefly, fresh ARC and MH were microdissected and immediately frozen on dry ice before RNA extraction using the TRIzol method (Invitrogen). RNA concentration was quantified spectrophotometrically and 900 ng of total RNA was reverse-transcribed by M-MuLV reverse transcriptase (Invitrogen) with random hexamers following the manufacturer's conditions. The reaction mix was then diluted fivefold before use. Quantitative gene expression was measured from 1 : 10 cDNA dilutions. Real-time PCR was performed using the QuantiFast SYBR Green PCR kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's guidelines on a Corbett Rotor-Gene 6000. Data were analyzed using the standard curve method and normalized to actin expression levels.

In vivo metabolic assessments: Mice between 5-6 weeks of age were individually housed and fed either chow or high fat diet (HFD) (modified AIN-93G purified rodent diet with 50 % Kcal from fat derived from palm oil (Hryhorczuk et al. 2016)). Body weight and food intake were measured weekly during 12 (chow) or 16 (HFD) weeks. Respiratory exchange ratio (RER), energy expenditure and locomotor activity were measured using indirect calorimetry following a 24 h acclimation period in Comprehensive Lab Animal Monitoring System (CLAMS) metabolic cages (Columbus Instruments) using their respective diets following the 12 or 16 weeks of measurements. Glucose tolerance was assessed by intraperitoneal (IP) injection of 1.5 mg/kg glucose following a 5 h fast and glycaemia was measured using Accu-chek Performa glucometer and strips during the following 2 h. Fat and lean mass were assessed using a nuclear echo magnetic resonance imaging (MRI) whole-body composition analyzer and the different fat pads were collected and weighed using an analytical scale (Sartorius).

Stereotaxic surgery: Mice (10-12 week old) were anaesthetised with isoflurane and placed on a stereotaxic apparatus (Kopf instrument). Animals were implanted with a guide cannula (Plastics One) into the right lateral ventricle according to stereotaxic coordinates (from bregma: -0.5 mm antero-posterior, +1 mm lateral and -2.1 mm dorso-ventral from the dura). Cannulated mice were allowed to recover for a week before intracerebroventricular (ICV) administration of angiotensin II (40 ng in 2 µl) to verify cannula placement. Mice that did not drink within the first 5 min with repeated bouts were excluded from the study.

In-vivo effects of ODN: Cannulated MC4R WT and KO animals were divided into two separate groups, the first group was food deprived for 18 h before ICV administration of freshly reconstituted ODN (100 ng in 2 μ l; Phoenix pharmaceuticals) or saline control 1 h before the onset of the dark cycle. Access to food was restored 30 min after ICV injection and food intake was measured during 24 h. The second group was single housed in metabolic cages (CLAMS) during 24 h for acclimation and were administered freshly reconstituted ODN (100 ng in 2 μ l) or saline control 1 h before the onset of the dark cycle and monitored for 24 h.

Electrophysiological recordings: Brain slices (250 μ m) were prepared from 6-8 weeks old POMC-eGFP mice as previously described (Fioramonti et al. 2004). After recovery, slices were perfused with an oxygenated extracellular medium containing (in mM): 118 NaCl, 3 KCl, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄, 1.5 CaCl₂, 5 HEPES, 2.5 D-glucose (osmolarity adjusted to 310 mOsm with sucrose, pH 7.3) in a recording chamber placed under a microscope (Nikon EF600) outfitted for fluorescence and IR-DIC videomicroscopy. Viable ARC POMC neurons were visualized with a fluorescence video camera (Nikon). For cell-attached recordings, borosilicate pipettes (4-6 M Ω ; 1.5 mm OD, Sutter Instrument) were filled with filtered extracellular medium. For whole-cell spontaneous inhibitory post-synaptic currents (sIPSC) recordings, pipettes were filled with a cesium-chloride solution containing (in mM): 140 CsCl, 3.6 NaCl, 1MgCl₂, 10 HEPES, 0.1 Na₄EGTA, 4 Mg-ATP, 0.25 Na-GTP (290 mOsm, pH 7.3).

Calcium imaging: Mediobasal hypothalamic neurons were prepared from 3-4 weeks-old Wistar rats as described previously (Vazirani et al. 2013). Cells were loaded with Fura-2/acetoxymethyl ester (0.5 μ M; Fura-2/AM; Molecular Probes) for 20 min at 37°C in Hanks buffer balanced salt solution (containing (in mM): 25 HEPES, 121 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgSO₄, 1.2 KH₂PO₄, 5 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 2.5 D-glucose; pH 7.4)). Fura-2 fluorescence images were acquired every 10 sec by alternating excitation at 340 and 380 nm and emissions (420–600 nm) with a CDD camera coupled to Live Acquisition software (TiLL Photonics). Changes in intracellular calcium levels ([Ca⁺⁺]_i) were monitored in cells held at 2.5 mM glucose in response to ODN (1 nM) with or without the ODN GPCR antagonist cyclo₁₋₈[dLeu⁵]OP (cdLOP) (10 nM) prepared by standard Fmoc solid-phase peptide synthesis based on a previous study (Leprince et al. 2001).

Expression of data and statistics: Data are expressed as means \pm SEM. Intergroup comparisons were

performed by ANOVA with Bonferroni post hoc tests or Student's *t*-test as described in figure legends. $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Validation of the astrocyte specific knock-out of ACBP in MBH. In order to study ACBP's involvement in the central control of energy balance, we generated an astrocyte specific ACBP loss-of-function mouse model (ACBP^{fl/fl}; GFAP-Cre). The loss of ACBP expression in GFAP expressing cells (astrocytes and tanycytes) of the hypothalamus was confirmed by immunofluorescence (fig 1A) (right panel). ACBP expression was unchanged in non-GFAP expressing cells. These observations were confirmed by qPCR on freshly microdissected ARC and medial hypothalamus (MH) nuclei (fig 1B), where we were able to observe a 5-fold decrease in ACBP expression compared to WT samples. In agreement to what we showed recently (Budry et al. 2016), the remaining 20% of ACBP expression likely represents neuronal and non GFAP expressing glial cells.

ACBP loss of function modulates body weight gain and food intake. In order to assess the potential role of astrocytic ACBP, intracellular and/or following its secretion, in the regulation of energy balance, we used an astrocyte specific ACBP invalidation. We first sought to assess the effect of the astrocyte specific ablation of ACBP on feeding and energy metabolism under basal conditions. We thus measured weekly food intake and body weight gain on individually housed ACBP^{fl/fl}; GFAP-Cre (KO) and control littermates, ACBP^{+/+}; GFAP-Cre (WT), ACBP^{fl/+}; GFAP-Cre (HET), all fed a standard chow diet *ad-libitum* over the course of 12 weeks. No changes in body weight gain and cumulative food intake (fig 2A-B) were observed in our astrocyte specific ACBP KO mice when compared to WT littermates. At the end of the 12-week protocol, we measured energy expenditure, respiratory exchange ratio (RER) and locomotor activity using a CLAMS metabolic cages apparatus. Of note, ACBP KO mice had a 20% decrease in energy expenditure during the light cycle (at rest) suggesting a possible decrease in standard metabolic rate (fig CE & D, $p < 0.01$).

Given ACBP's involvement in astrocytes intracellular fatty acid metabolism (Bouyakdan et al. 2015), we hypothesized that the effects of its ablation would be better observed in a high fat (HF) feeding context, we thus placed a new group of ACBP^{fl/fl}; GFAP-Cre mice and their controls on an *ad-libitum*

HF diet over the course of 16 weeks. By 12 weeks on their respective diets, HF fed mice had already gained more weight than their chow fed counterparts (fig 2A vs 3A). ACBP^{fl/fl}; GFAP-Cre mice were more sensitive to diet-induced obesity. When compared with WT controls after 16 weeks of HF diet, ACBP^{fl/fl}; GFAP-Cre mice had gained 33% more body weight (Fig 3A, $p < 0.001$) and consumed 11% more calories (Fig 3B, $p < 0.001$), which was also reflected by increased fat mass (fig 3C, $p < 0.001$). Of note, this increase in fat mass seems to be solely due to an increase in intraperitoneal fat (fig 3D, $p < 0.01$). ACBP^{fl/+}; GFAP-Cre exhibited an intermediary phenotype in which they consumed only 5% more HF than WT controls (fig 3B, $p < 0.01$) and gained 16% more body weight (fig 3A, NS).

Due to their sensitivity to diet-induced obesity, we then evaluated glucose metabolism in ACBP KO animals. While no change in glucose tolerance over 120 minutes was observed in ACBP^{fl/fl}; GFAP-Cre mice during a glucose tolerance (GTT), they showed significantly higher peak glucose levels at 15-30 min following glucose administration (fig 3E, $p < 0.05$). We then used metabolic cages to assess, energy expenditure, RER and locomotor activity. ACBP^{fl/fl}; GFAP-Cre mice had similar energy expenditure to WT littermates, which cannot explain their sensitivity to diet induced obesity (DIO) (fig 4 A & B). Locomotor activity was decreased in both light and dark phases, possibly due to the increased weight of these mice (fig 4C & D, $p < 0.05$). We thus sought to determine whether astrocyte derived ACBP exerts its anorectic action through the activation of the melanocortin pathway, via the secreted peptide ODN.

Central action of ODN on energy homeostasis is MC4R-dependent. Centrally administered ODN is known to inhibit feeding and its deletion, through an astrocyte specific ACBP KO, results in an increased HF feeding and decreased energy expenditure (fig 3 & 4), all of which could be mediated through the melanocortin pathway. In order to verify that ODN acts via the MC4R receptor to inhibit food intake, as suggested recently (Lanfray et al. 2012), we tested the anorectic action of ICV ODN on both WT and MC4R KO mice. 100 ng of ODN was able to rapidly decrease food intake of WT mice as early as 2h post-infusion ($p < 0.01$), an effect that lasted for almost 24 h ($p = 0.051$). This anorectic effect of ODN was completely absent in mice lacking the MC4R (fig 5A). Since the activation of the melanocortin system has been associated with increased RER, locomotor activity as well as energy expenditure (Balthasar et al. 2005, Berglund et al. 2012), we then tested the effect ICV ODN administration using metabolic cages. We observed an increase of RER and locomotor activity in WT

but not MC4R KO mice following ODN administration (fig 5B & D, $p < 0.05$). No changes in energy expenditure were observed (fig 5C).

ODN specifically activates POMC neurons. Our *in vivo* findings demonstrate that MC4R is mediating the central actions of ODN. We thus investigated if ODN could activate POMC neurons of the ARC, a neuronal population central in melanocortin signaling. To this end, we used electrophysiology on brain slices from POMC-eGFP reporter mice (fig 6A). Cell-attached recordings show that ODN increases action potential (AP) frequency in all POMC neurons tested (Fig 6B & C, $p < 0.01$). Importantly, recordings of non-fluorescent neurons in the ARC in brain slices from POMC-eGFP mice show that ODN failed to modulate the electrical activity of non-POMC neurons (Fig 6C), suggesting a specific activation of POMC neurons in the ARC by ODN.

ODN activates POMC neurons through a GABA_A independent mechanism. Importantly, POMC neurons of the ARC receive inhibitory GABAergic inputs from neighboring neurons including orexigenic NPY neurons (Acuna-Goycolea et al. 2005, Vong et al. 2011). Of note, ODN has been shown to act as a NAM of the GABA_A receptor (Alfonso et al. 2012), suggesting that the ODN-induced POMC neuronal activation shown earlier (fig 6B & C) could be mediated via an inhibition of the GABAergic input on these cells. Thus, we quantified the frequency and amplitude of spontaneous Inhibitory Postsynaptic Currents (sIPSC) onto POMC and non-POMC neurons in brain slices from POMC-eGFP mice. sIPSC amplitude was not affected by ODN in both POMC and non-POMC neurons (data not shown). However, ODN decreases sIPSC frequency onto POMC neurons (fig 7A & B, $p < 0.05$). Interestingly, ODN also decreases sIPSC frequency onto non-POMC neurons (fig 7C & D, $p < 0.05$) suggesting that the peptide acts as a NAM of the GABA_A receptor in most, if not all, ARC neurons. The inhibition of GABAergic signalling by ODN would therefore not be sufficient for neuronal activation, given that non-POMC neurons were not activated by the decreased inhibitory tone (fig 6C).

To confirm that POMC are activated by ODN independently of its action on GABA_A receptor, we sought to measure their activation in absence of both inhibitory and excitatory inputs. We thus pre-treated brain slices from POMC-eGFP mice with an “inhibitory cocktail” consisting of two GABA_A antagonists (bicuculline and picrotoxin) and two glutamate receptors antagonist capable of inhibiting both the AMPA/Kainate and NMDA glutamate receptors (Cnqx and AVP respectively). The addition of

ODN to slices pre-treated with the inhibitor cocktail produced an increase in AP frequency of 73 % (fig 8 A & B, $p < 0.05$), suggesting that ODN alone is sufficient to activate POMC neurons in the ARC independently of other synaptic inputs, be they inhibitory or excitatory. Of note, pre-treatment with GABA_A and glutamate receptor antagonists did not affect the firing frequency of AP in POMC neurons in the absence of ODN (fig 8 A & B), showing that these neurons do not fire spontaneously in the absence of synaptic input.

ODN directly activates POMC neurons through a GPCR. Since a reduction in GABAergic signalling is not sufficient to activate ARC neuronal populations (fig 6C & 7D) and that POMC neurons activation by ODN is also unlikely to be carried out through glutamatergic input from other neurons (fig 8B), we decided to determine if this activation is mediated through a cell surface receptor on POMC neurons. Previous studies have demonstrated that ODN can activate a GPCR coupled to Phospholipase C and Ca²⁺ and synthesised an antagonist of this ODN-GPCR (cdLOP) (Gandolfo et al. 1997, Leprince et al. 2001). To test whether ODN can act directly on this GPCR on ARC neurons, we looked at neuronal activation by ODN using Ca²⁺ imaging on freshly dissociated neurons of the mediobasal hypothalamus (MBH, including the ARC and VMH). The neurons in our cultures are isolated from each other and are recorded before they can form connections, ruling out potential GABAergic inputs (Fig 8C). Calcium imaging was used as a surrogate of neuronal activation in isolated MBH neurons. Our recordings show that treatment with ODN increases [Ca²⁺]_i oscillations in ~10% of MBH neurons tested (Fig 8D & F). Importantly, we found that pre-treatment with ODN-GPCR inhibitor cdLOP decreases the number of ODN-responsive neurons as well as the magnitude of Ca²⁺ response to ODN in MBH neurons (Fig 4E & G).

DISCUSSION

The main goal of this study was to examine the role of astrocyte derived ACBP and its secreted peptide ODN in the control of energy balance *in vivo* and the mechanisms involved in this regulation. Using complementary *in vivo* and *ex vivo* approaches, we show that ACBP deficiency in astrocytes disrupts the regulation of feeding and energy expenditure. We demonstrate that ODN exert an anorectic action in an MC4R-dependent manner that involves a direct activation of ARC POMC neurons via an as of yet unidentified GPCR. Thus, our work gives new insights on the role of endogenous astrocytic ACBP and ODN in the regulation of feeding and energy metabolism via a direct activation of POMC neurons.

ODN is a peptide known for its anorectic action and for its anxiogenic proprieties in various animal models. However, these data rely heavily on exogenous administration of this peptide and little attention was given to the role of the endogenous protein in these effects. As we have previously shown, deficiencies in the endogenous protein do not translate in a modulation of anxiety-like behavior (Budry et al. 2016). It was thus critical to determine the involvement of astrocytic ACBP in the regulation of feeding behavior and energy metabolism.

We show that the deletion of ACBP from astrocytes has negative consequences on energy expenditure and food intake, consistently with what was observed following the ICV administration of ODN, the peptide resulting from the cleavage of ACBP following its secretion. The fact that the increased weight gain and food intake was only observed when mice were fed a HF diet contrasts with the KO of putative downstream effectors of ACBP/ODN signalling, MC4R, that gain weight regardless of diet (Itoh et al. 2011). This suggests that ACBP may be part of the anorectic response to fatty acid sensing rather than a general satiety peptide. This is consistent with its role in the intracellular metabolism of unsaturated fatty Acyl-CoA in astrocytes (Bouyakdan et al. 2015), which are known to have an anorectic action in the hypothalamus (Obici et al. 2002, Obici et al. 2003).

Following 16 weeks of HF feeding, ACBP^{fl/fl}; GFAP-Cre mice have an elevated glycaemia in the 30 min following glucose administration. While not entirely glucose intolerant, ACBP^{fl/fl}; GFAP-Cre mice could have impairments in the initial phase of insulin secretion, in line with the work of (Lanfray et al. 2013).

This slight glucose intolerance is not the result of visceral fat accumulation and suggests that central ODN plays a direct role in peripheral glucose metabolism. The adverse effects of ACBP invalidation on glycaemia that we have observed, as well as the beneficial effects of ICV ODN reported by (Lanfray et al. 2013), are at odds with early description of ODN activity on insulin secretion reporting that ODN inhibits glucose induced insulin secretion in isolated pancreatic islets (Chen et al. 1988, Borboni et al. 1991, De Stefanis et al. 1995). Though little is known on the regulation of circulating ODN in response to the feeding status, this could mean that central and peripheral ODN can have different functions.

Our findings highlight the importance of the melanocortin pathway in the central effects of ODN on feeding, RER and locomotor activity. These effects of ODN on RER and locomotor activity are similar to what is observed following the activation of ARC POMC neurons (Berglund et al. 2012). The lack of modulation of energy expenditure by ODN is somehow surprising given that activation of the melanocortin pathway is usually associated with increased energy expenditure. A similar uncoupling of the modulation of food intake and energy expenditure by POMC neurons has also been reported in the past. This has been attributed to the activation specific subpopulation of POMC neurons (Balthasar et al. 2005). It is also possible that a higher dose or repeated injections of ODN may be required to observe changes in energy expenditure. Of importance, central ODN administration has the opposite effects of ACBP ablation in astrocytes, strengthening the role of ACBP and ODN as a glial modulator of feeding behavior.

Our findings also serve to highlight several important aspects of endozepine signaling and action in the hypothalamus. Our data support a mode of action of ODN involving a selective activation of POMC neurons in the ARC. We show that ODN in the ARC acts as a NAM on the GABA_A receptor, as previously shown in other brain regions (Alfonso et al. 2012). However, this NAM action on GABA_A receptors by ODN is not sufficient to activate POMC neurons. Furthermore, some have shown ODN to be a positive allosteric modulation of GABA_A in other brain areas (Christian et al. 2013). Although we cannot extend our findings to other hypothalamic nuclei, it is important to note that approximately 50% of synapses in the hypothalamus are GABAergic (Decavel and Van den Pol 1990). Thus ODN may be an important regulator of GABAergic signaling in the hypothalamus and affect the activity of circuits involved in neuroendocrine responses.

Both our electrophysiological recordings and Ca^{2+} imaging data suggest that ODN NAM activity on the GABA_A is not required for POMC activation. Although the identity of neurons in Ca^{2+} studies was unknown, the percentage of ODN-responsive neurons is compatible with the proportion of POMC neurons in the MBH. This is in line with previous reports suggesting an action of ODN on a GPCR to elicit a decrease in food intake. Although our results support the concept that POMC neurons activation by ODN is GPCR-dependent, the downstream signaling pathways elicited by this receptor are still unknown. Studies suggest that this ODN-GPCR activation stimulates phospholipase C, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, and a Protein kinase C-dependent activation of the ERK pathway (Gandolfo et al. 1997, Leprince et al. 2001, Kaddour et al. 2013). In our study, Ca^{2+} imaging was used as a surrogate of neuronal activation. Thus, we cannot conclude that ODN-GPCR is coupled to downstream Ca^{2+} signaling in MBH neurons. Additional studies are required to decipher which pathway(s) triggers POMC neurons activation in response to ODN.

This study supports the idea that astrocyte derived ODN might be involved in hypothalamic nutrient sensing. The recent study by (Lanfray et al. 2013) demonstrated that ODN secretion is increased by glucose in hypothalamic explants. In addition, they show that the anorectic action of glucose was blunted by the ODN-GPCR antagonist. Together, this suggests that ODN is a glucose-induced gliotransmitter targeting hypothalamic neurons to decrease feeding. Previous studies suggested that POMC neurons are activated by glucose (Parton et al. 2007, Hu et al. 2014). However, it is still unclear whether glucose directly activates POMC neurons (Fioramonti et al. 2007). Other studies have also suggested that POMC neurons can be activated by oleic acid in a mechanism requiring its β -oxidation but independently of glutamatergic and GABAergic signalling (Jo et al. 2009). Our results add an important piece to the endocannabinoid signaling puzzle by showing that ODN specifically activates anorectic POMC neurons in the ARC to decrease feeding and regulate metabolic responses via the MC4R. Together with (Lanfray et al. 2013), our findings support a model in which both fatty acid and glucose-induced POMC neurons activation could be dependent on ODN secretion by astrocytes. More generally, our results support the emerging concept that hypothalamic astrocytes and astrocyte-derived signals, or gliotransmitters, play a key role in the regulation of metabolic neurocircuits activity and energy balance.

CONCLUSION

In summary, our study demonstrates that ACBP in astrocytes plays a crucial role in the regulation of energy balance and feeding behavior through the detection of nutrients such as glucose and fatty acids, which can be exacerbated by the consumption of energy rich. Also, that ODN can act as a gliotransmitter in order to specifically activate POMC neurons of the hypothalamus in a manner entirely dependent on the ODN-GPCR to decrease feeding and regulate metabolic responses via the MC4R. These findings open new research avenues related to the control of energy balance by hypothalamic astrocytes and their contribution to the etiology of the development of metabolic diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are thankful to A. Lefranc, L. Decocq and A. Mathou for animal care.

GRANTS

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP115042 to TA), Marie Curie Foundation (CIG NeuROSenS PCIG09-GA-2011-293738 to XF), Société Francophone du Diabète and Réseau de recherche en santé cardiométabolique, diabète & obésité (CMDO, to TA and XF). TA and EB were supported by a salary award from Fonds de Recherche Québec-Santé (FRQS). KB was supported by a doctoral fellowship from Diabète Québec.

DISCLOSURES

Authors have no conflict of interest to declare.

REFERENCES

- Acuna-Goycolea, C.**, N. Tamamaki, Y. Yanagawa, K. Obata and A. N. van den Pol (2005). "Mechanisms of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide inhibition of identified green fluorescent protein-expressing GABA neurons in the hypothalamic neuroendocrine arcuate nucleus." *J Neurosci* **25**(32): 7406-7419.
- Alfonso, J.**, C. Le Magueresse, A. Zuccotti, K. Khodosevich and H. Monyer (2012). "Diazepam binding inhibitor promotes progenitor proliferation in the postnatal SVZ by reducing GABA signaling." *Cell Stem Cell* **10**(1): 76-87.
- Argente-Arizon, P.**, A. Freire-Regatillo, J. Argente and J. A. Chowen (2015). "Role of non-neuronal cells in body weight and appetite control." *Front Endocrinol (Lausanne)* **6**: 42.
- Balthasar, N.**, L. T. Dalgaard, C. E. Lee, J. Yu, H. Funahashi, T. Williams, M. Ferreira, V. Tang, R. A. McGovern, C. D. Kenny, L. M. Christiansen, E. Edelstein, B. Choi, O. Boss, C. Aschkenasi, C. Y. Zhang, K. Mountjoy, T. Kishi, J. K. Elmquist and B. B. Lowell (2005). "Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure." *Cell* **123**(3): 493-505.
- Berglund, E. D.**, C. R. Vianna, J. Donato, Jr., M. H. Kim, J. C. Chuang, C. E. Lee, D. A. Lauzon, P. Lin, L. J. Brule, M. M. Scott, R. Coppari and J. K. Elmquist (2012). "Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice." *J Clin Invest* **122**(3): 1000-1009.
- Borboni, P.**, L. Condorelli, P. De Stefanis, G. Sesti and R. Lauro (1991). "Modulation of insulin secretion by diazepam binding inhibitor and its processing products." *Neuropharmacology* **30**(12B): 1399-1403.
- Bouyakdan, K.**, B. Taib, L. Budry, S. Zhao, D. Rodaros, D. Neess, S. Mandrup, N. J. Faergeman and T. Alquier (2015). "A novel role for central ACBP/DBI as a regulator of long-chain fatty acid metabolism in astrocytes." *J Neurochem* **133**(2): 253-265.
- Budry, L.**, K. Bouyakdan, S. Tobin, D. Rodaros, A. B. Marcher, S. Mandrup, S. Fulton and T. Alquier (2016). "DBI/ACBP loss-of-function does not affect anxiety-like behaviour but reduces anxiolytic responses to diazepam in mice." *Behav Brain Res* **313**: 201-207.
- Chen, N.**, H. Sugihara, J. Kim, Z. Fu, B. Barak, M. Sur, G. Feng and W. Han (2016). "Direct modulation of GFAP-expressing glia in the arcuate nucleus bi-directionally regulates feeding." *Elife* **5**.
- Chen, Z. W.**, B. Agerberth, K. Gell, M. Andersson, V. Mutt, C. G. Ostenson, S. Efendic, J. Barros-Soderling, B. Persson and H. Jornvall (1988). "Isolation and characterization of porcine diazepam-binding inhibitor, a polypeptide not only of cerebral occurrence but also common in intestinal tissues and with effects on regulation of insulin release." *Eur J Biochem* **174**(2): 239-245.
- Christian, C. A.**, A. G. Herbert, R. L. Holt, K. Peng, K. D. Sherwood, S. Pangratz-Fuehrer, U. Rudolph and J. R. Huguenard (2013). "Endogenous positive allosteric modulation of GABA(A) receptors by diazepam binding inhibitor." *Neuron* **78**(6): 1063-1074.
- Coll, A. P.**, I. S. Farooqi, B. G. Challis, G. S. Yeo and S. O'Rahilly (2004). "Proopiomelanocortin and energy balance: insights from human and murine genetics." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(6): 2557-2562.
- de Mateos-Verchere, J. G.**, J. Leprince, M. C. Tonon, H. Vaudry and J. Costentin (2001). "The octadecaneuropeptide [diazepam-binding inhibitor (33-50)] exerts potent anorexigenic effects in rodents." *Eur J Pharmacol* **414**(2-3): 225-231.
- De Stefanis, P.**, F. Impagnatiello, A. Berkovich and A. Guidotti (1995). "Inhibitory effect of ODN, a naturally occurring processing product of diazepam binding inhibitor, on secretagogues-induced insulin secretion." *Regul Pept* **56**(2-3): 153-165.
- Decavel, C.** and A. N. Van den Pol (1990). "GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus." *J Comp Neurol* **302**(4): 1019-1037.
- do Rego, J. C.**, M. H. Orta, J. Leprince, M. C. Tonon, H. Vaudry and J. Costentin (2007).

"Pharmacological characterization of the receptor mediating the anorexigenic action of the octadecaneuropeptide: evidence for an endozepine tone regulating food intake." *Neuropsychopharmacology* **32**(7): 1641-1648.

Farzampour, Z., R. J. Reimer and J. Huguenard (2015). "Endozepines." *Adv Pharmacol* **72**: 147-164.

Ferrero, P., A. Guidotti, B. Conti-Tronconi and E. Costa (1984). "A brain octadecaneuropeptide generated by tryptic digestion of DBI (diazepam binding inhibitor) functions as a proconflict ligand of benzodiazepine recognition sites." *Neuropharmacology* **23**(11): 1359-1362.

Fioramonti, X., S. Contie, Z. Song, V. H. Routh, A. Lorsignol and L. Penicaud (2007). "Characterization of glucosensing neuron subpopulations in the arcuate nucleus: integration in neuropeptide Y and pro-opio melanocortin networks?" *Diabetes* **56**(5): 1219-1227.

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

Gandolfo, P., C. Patte, J. Leprince, J. L. Thoumas, H. Vaudry and M. C. Tonon (1997). "The stimulatory effect of the octadecaneuropeptide (ODN) on cytosolic Ca²⁺ in rat astrocytes is not mediated through classical benzodiazepine receptors." *Eur J Pharmacol* **322**(2-3): 275-281.

Guidotti, A., C. M. Forchetti, M. G. Corda, D. Konkol, C. D. Bennett and E. Costa (1983). "Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(11): 3531-3535.

Hryhorczuk, C., M. Florea, D. Rodaros, I. Poirier, C. Daneault, C. Des Rosiers, A. Arvanitogiannis, T. Alquier and S. Fulton (2016). "Dampened Mesolimbic Dopamine Function and Signaling by Saturated but not Monounsaturated Dietary Lipids." *Neuropsychopharmacology* **41**(3): 811-821.

Hu, J., L. Jiang, M. J. Low and L. Rui (2014). "Glucose rapidly induces different forms of excitatory synaptic plasticity in hypothalamic POMC neurons." *PLoS One* **9**(8): e105080.

Itoh, M., T. Suganami, N. Nakagawa, M. Tanaka, Y. Yamamoto, Y. Kamei, S. Terai, I. Sakaida and Y. Ogawa (2011). "Melanocortin 4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of nonalcoholic steatohepatitis." *Am J Pathol* **179**(5): 2454-2463.

Jo, Y. H., Y. Su, R. Gutierrez-Juarez and S. Chua, Jr. (2009). "Oleic acid directly regulates POMC neuron excitability in the hypothalamus." *J Neurophysiol* **101**(5): 2305-2316.

Kaddour, H., Y. Hamdi, D. Vaudry, M. Basille, L. Desrues, J. Leprince, H. Castel, H. Vaudry, M. C. Tonon, M. Amri and O. Masmoudi-Kouki (2013). "The octadecaneuropeptide ODN prevents 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of cerebellar granule neurons through a PKC-MAPK-dependent pathway." *J Neurochem* **125**(4): 620-633.

Lam, T. K., A. Pocai, R. Gutierrez-Juarez, S. Obici, J. Bryan, L. Aguilar-Bryan, G. J. Schwartz and L. Rossetti (2005). "Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis." *Nat Med* **11**(3): 320-327.

Lanfray, D., S. Arthaud, J. Ouellet, V. Compere, J. L. Do Rego, J. Leprince, B. Lefranc, H. Castel, C. Bouchard, B. Monge-Roffarello, D. Richard, G. Pelletier, H. Vaudry, M. C. Tonon and F. Morin (2012). "Gliotransmission and Brain Glucose-Sensing: Critical Role of Endozepines." *Diabetes*.

Lanfray, D., S. Arthaud, J. Ouellet, V. Compere, J. L. Do Rego, J. Leprince, B. Lefranc, H. Castel, C. Bouchard, B. Monge-Roffarello, D. Richard, G. Pelletier, H. Vaudry, M. C. Tonon and F. Morin (2013). "Gliotransmission and brain glucose sensing: critical role of endozepines." *Diabetes* **62**(3): 801-810.

Leprince, J., H. Oulyadi, D. Vaudry, O. Masmoudi, P. Gandolfo, C. Patte, J. Costentin, J. L. Fauchere, D. Davoust, H. Vaudry and M. C. Tonon (2001). "Synthesis, conformational analysis and biological activity of cyclic analogs of the octadecaneuropeptide ODN. Design of a potent endozepine antagonist." *Eur J Biochem* **268**(23): 6045-6057.

Loomis, W. F., M. M. Behrens, M. E. Williams and C. Anjard (2010). "Pregnenolone sulfate and cortisol

induce secretion of acyl-CoA-binding protein and its conversion into endozepines from astrocytes." *J Biol Chem* **285**(28): 21359-21365.

Myers, M. G., Jr. and D. P. Olson (2012). "Central nervous system control of metabolism." *Nature* **491**(7424): 357-363.

Neess, D., S. Bek, M. Bloksgaard, A. B. Marcher, N. J. Faergeman and S. Mandrup (2013). "Delayed hepatic adaptation to weaning in ACBP^{-/-} mice is caused by disruption of the epidermal barrier." *Cell Rep* **5**(5): 1403-1412.

Obici, S., Z. Feng, A. Arduini, R. Conti and L. Rossetti (2003). "Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production." *Nat Med* **9**(6): 756-761.

Obici, S., Z. Feng, K. Morgan, D. Stein, G. Karkanas and L. Rossetti (2002). "Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake." *Diabetes* **51**(2): 271-275.

Parton, L. E., C. P. Ye, R. Coppari, P. J. Enriori, B. Choi, C. Y. Zhang, C. Xu, C. R. Vianna, N. Balthasar, C. E. Lee, J. K. Elmquist, M. A. Cowley and B. B. Lowell (2007). "Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity." *Nature* **449**(7159): 228-232.

Pocai, A., T. K. Lam, S. Obici, R. Gutierrez-Juarez, E. D. Muse, A. Arduini and L. Rossetti (2006). "Restoration of hypothalamic lipid sensing normalizes energy and glucose homeostasis in overfed rats." *J Clin Invest* **116**(4): 1081-1091.

Schwinkendorf, D. R., N. G. Tsatsos, B. A. Gosnell and D. G. Mashek (2011). "Effects of central administration of distinct fatty acids on hypothalamic neuropeptide expression and energy metabolism." *Int J Obes (Lond)* **35**(3): 336-344.

Sofroniew, M. V. (2012). "Transgenic techniques for cell ablation or molecular deletion to investigate functions of astrocytes and other GFAP-expressing cell types." *Methods Mol Biol* **814**: 531-544.

Taib, B., K. Bouyakdan, C. Hryhorczuk, D. Rodaros, S. Fulton and T. Alquier (2013). "Glucose regulates hypothalamic long-chain fatty acid metabolism via AMP-activated kinase (AMPK) in neurons and astrocytes." *J Biol Chem* **288**(52): 37216-37229.

Tokay, T., R. Hachem, O. Masmoudi-Kouki, P. Gandolfo, L. Desrues, J. Leprince, H. Castel, M. Diallo, M. Amri, H. Vaudry and M. C. Tonon (2008). "Beta-amyloid peptide stimulates endozepine release in cultured rat astrocytes through activation of N-formyl peptide receptors." *Glia* **56**(13): 1380-1389.

Vaisse, C., K. Clement, B. Guy-Grand and P. Froguel (1998). "A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity." *Nat Genet* **20**(2): 113-114.

Vazirani, R. P., X. Fioramonti and V. H. Routh (2013). "Membrane potential dye imaging of ventromedial hypothalamus neurons from adult mice to study glucose sensing." *J Vis Exp*(81).

Vong, L., C. Ye, Z. Yang, B. Choi, S. Chua, Jr. and B. B. Lowell (2011). "Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons." *Neuron* **71**(1): 142-154.

Yang, L., Y. Qi and Y. Yang (2015). "Astrocytes control food intake by inhibiting AGRP neuron activity via adenosine A1 receptors." *Cell Rep* **11**(5): 798-807.

Yeo, G. S., I. S. Farooqi, S. Aminian, D. J. Halsall, R. G. Stanhope and S. O'Rahilly (1998). "A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity." *Nat Genet* **20**(2): 111-112.

FIGURES LEGENDS

Figure 1: Validation of ACBP KO in GFAP astrocytes. **A-** Colocalisation of ACBP (green) and GFAP (red) in ACBP^{fl/fl} (control; left panel) and ACBP^{fl/fl}; GFAP-Cre (KO; right panel) mice by immunofluorescence in the mediobasal hypothalamus. **B-** Fold expression of ACBP over actin measured by Q-PCR in ARC and VMH from control and KO mice. *** p<0.001. Student t-test, n= 4.

Figure 2: ACBP loss of function in GFAP astrocytes increases body weight and feeding behavior on chow fed mice. **A-** Body weight gain and **B-** cumulative food intake of ACBP^{+/+}; GFAP-Cre (WT; light gray line with open circles), ACBP^{fl/+}; GFAP-Cre (HET; dark gray dotted line with triangles) and ACBP^{fl/fl}; GFAP-Cre (KO; black line and black squares) of individually housed mice over 12 weeks and fed with standard Chow. **C-** Energy expenditure corrected to lean mass (Cal/g of lean mass), measured over 48 h in CLAMS following a 24 h habituation period at the end of the 12 weeks BW and FI measurement period. **D-** Area under the curve (AUC) of 24 h dark and light cycles. **E-** Locomotor activity and **F-** AUC of locomotor activity measured by the number of beam breaks. ACBP^{+/+}; GFAP-Cre (WT; white bars), ACBP^{fl/+}; GFAP-Cre (HET; gray bars) and ACBP^{fl/fl}; GFAP-Cre (KO; black bars). ** p<0.01 Two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test, n=8-10/group.

Figure 3: ACBP^{fl/fl}; GFAP-Cre mice are more prone to Diet Induced Obesity (DIO) on a High Fat diet (HF). **A-** Body weight gain and **B-** cumulative food intake of ACBP^{+/+}; GFAP-Cre (WT; light gray line with open circles), ACBP^{fl/+}; GFAP-Cre (HET; dark gray dotted line with triangles) and ACBP^{fl/fl}; GFAP-Cre (KO; black line and black squares) of individually housed mice over 16 weeks and fed a HF diet. **C-** Total fat and lean mass **D-** Visceral (intra-peritoneal), subcutaneous (inguinal) white adipose tissue and brown (extrascapular) adipose tissue depots weights of ACBP^{+/+}; GFAP-Cre (WT; white bars), ACBP^{fl/+}; GFAP-Cre (HET; gray bars) and ACBP^{fl/fl}; GFAP-Cre (KO; black bars). **E-** Glucose tolerance test after a 5 h fast and administration of 1.5 mg/kg glucose intraperitoneally. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 Two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test, n=8-11/group.

Figure 4: Metabolic impairments in ACBP^{fl/fl}; GFAP-Cre mice fed a HF diet during 16 weeks. **A-** Energy expenditure corrected to lean mass (Cal/g of lean mass) and **C-** locomotor activity measured over 48 h in CLAMS following a 24 h habituation period at the end of the 16 weeks BW and FI

measurement period of ACBP^{+/+}; GFAP-Cre (WT; light gray line with open circles), ACBP^{fl/+}; GFAP-Cre (HET; dark gray dotted line with triangles) and ACBP^{fl/fl}; GFAP-Cre (KO; black line and black squares). **B-** AUC of energy expenditure and **D-** locomotor activity of 24 h dark and light cycles. ACBP^{+/+}; GFAP-Cre (WT; white bars), ACBP^{fl/+}; GFAP-Cre (HET; gray bars) and ACBP^{fl/fl}; GFAP-Cre (KO; black bars). * $p < 0.05$ Two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test, $n = 8-11$ /group.

Figure 5: Central regulation of energy homeostasis and food intake by ODN is MC4R-dependent. **A-** Cumulative food intake in fasted MC4R WT or KO mice injected ICV with saline or ODN (100 ng). **B-** Respiratory exchange ratio (RER, top panel), energy expenditure (middle panel) and locomotor activity (bottom panel) in MC4R WT or KO injected ICV with saline or ODN (100 ng). **A**, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Student t-test, $n = 7-8$ /group. **B-D**, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test, $n = 7-8$ /group.

Figure 6: ODN activates POMC neurons in the ARC. **A-** POMC-GFP neuron (thick white arrow) visualized with x60 objective under infrared (left panel) and (right panel) fluorescent light during a patch-clamp recording (the white thin arrow shows the recording pipette). **B-** Representative cell-attached recording of a POMC-GFP neuron activated by ODN (1 nM, thick black bar above the trace). **C-** Quantification of action potential (AP) frequency in POMC ($n = 9$) and non-POMC ($n = 15$) neurons before (control; over the last 60 sec before ODN application), during (ODN, over the last 60 sec of ODN application) and after (reversal, over 60 sec, 10 min after ODN application) ODN application, ** $p < 0.01$ vs. control. One-Way ANOVA in repeated measures followed by Bonferroni post hoc test.

Figure 7: ODN decreases sIPSC frequency in ARC neurons. Representative voltage-clamp whole-cell recording of a **A-** POMC or **C-** non-POMC (bottom panel) neuron before (control, over the last 4 min before ODN application) or during ODN application (over the last 4 min of 10 min ODN application). Quantification of sIPSC frequency of **B-** POMC ($n = 6$) and **D-** non-POMC ($n = 5$) neurons before (control; over the last 4 min before ODN application), during ODN application (ODN, over the last 4 min of 10 min ODN application). * $p < 0.05$ vs. control. Paired Student t-test.

Figure 8: ODN activation of POMC neurons is independent of GABA_A receptor inhibition but is mediated through unknown GPCR. **A-** Representative cell-attached recording of a POMC-GFP neuron

in the presence of (X Y Z, dotted bar) and ODN (1 nM, black bar), ** One way ANOVA $P < 0,005$ vs control, # One way ANOVA $P < 0,05$ vs Inhibitors, $n=9$. **B-** Quantification of action potential (AP) frequency in POMC neurons ($n = 9$) before (control; x seconds before application of X Y Z), during application of X Y Z inhibitors (inhibitors; x seconds ...) and during concomitant application of X Y Z and ODN 1 nM (inhibitors + ODN; x seconds etc). **C-** Representative bright-field image of cultured dissociated MBH cells (x20 objective, scale bar = 40 μm). **D, F-** Representative calcium imaging traces of a MBH neuron activated by ODN (1 nM) in absence **D-** or presence **F-** of the ODN GPCR antagonist cyclo1–8[dLeu5]OP (cdLOP) (10 nM). **E-** Percentage of ODN-responsive neurons in MBH dissociated neuron culture (left panel) and quantification of ODN response intensity (AUC; right panel) with or without cdLOP (ODN: $n=36$ ODN responsive / 425 total cells ; ODN + cdLOP: $n = 17$ ODN responsive/ 455 total cells, 3 independent cultures). * $p < 0.05$. paired Student t-test.

FIGURE 1

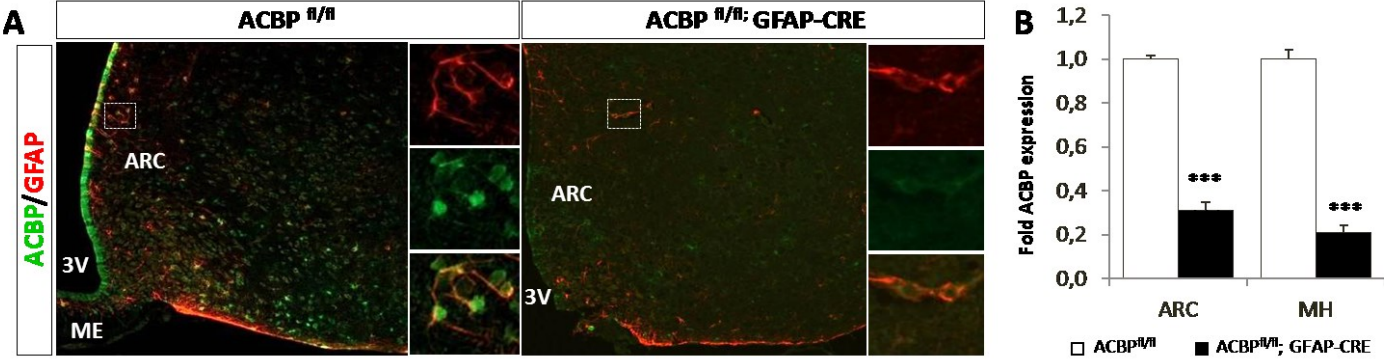


FIGURE 2

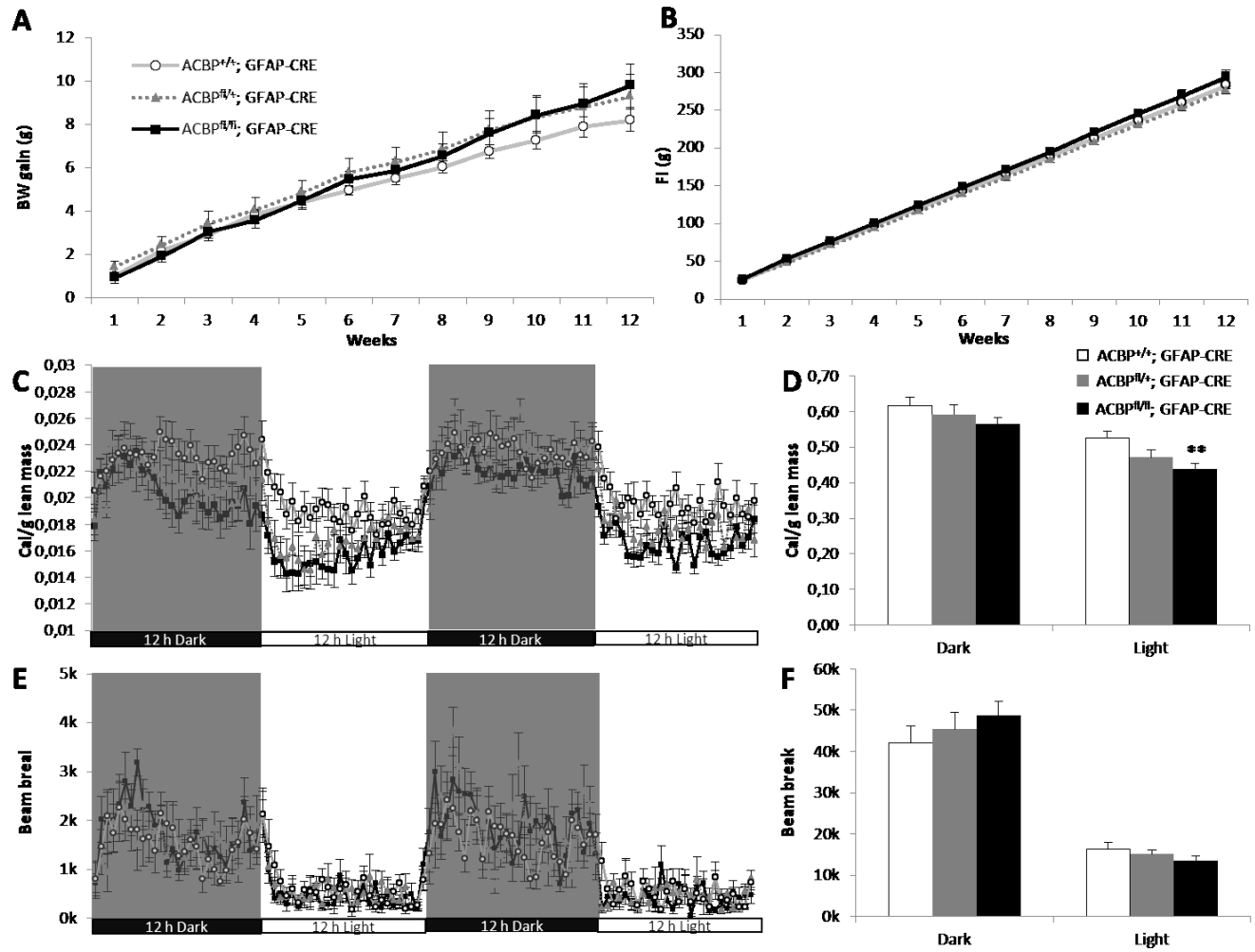


FIGURE 3

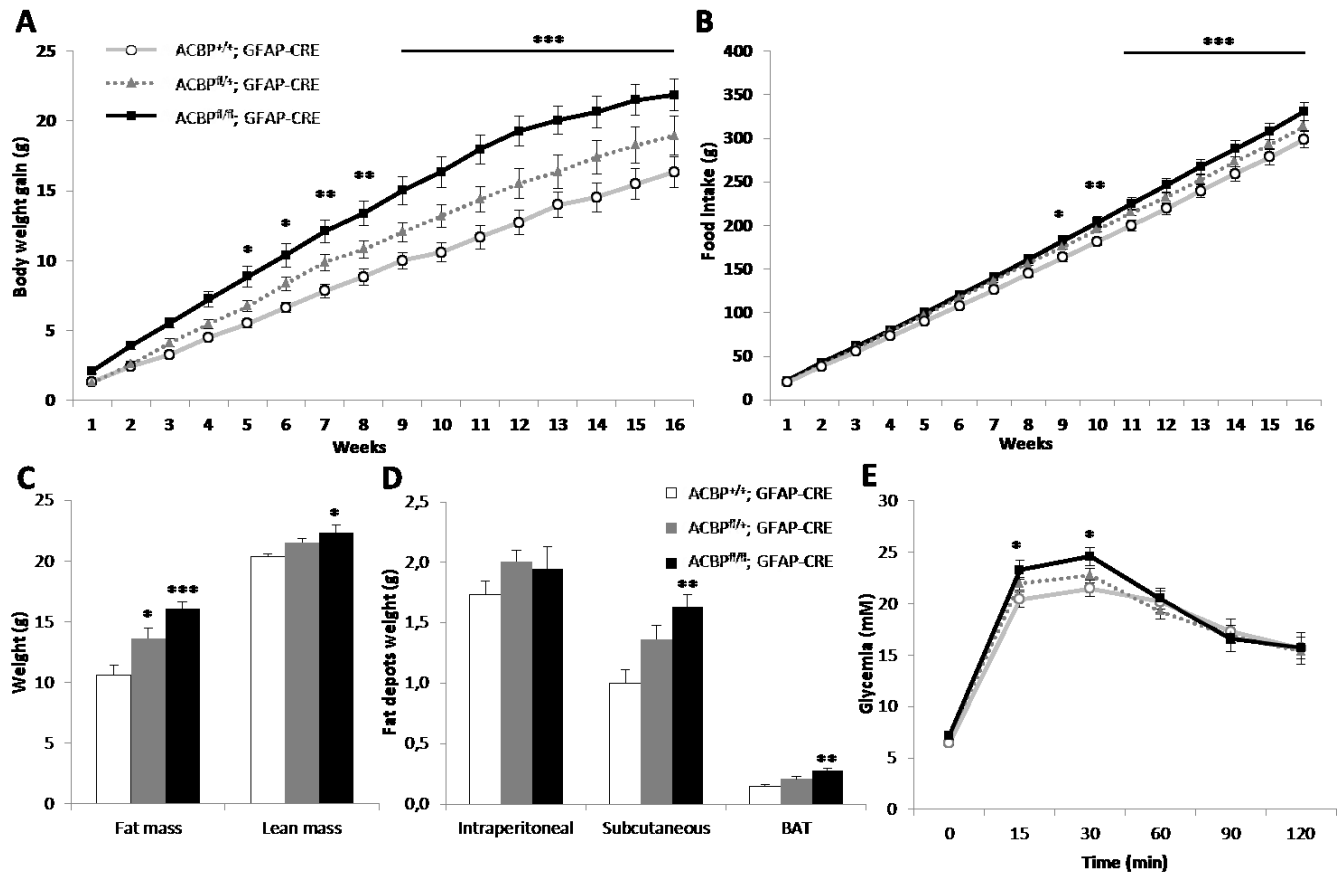


FIGURE 4

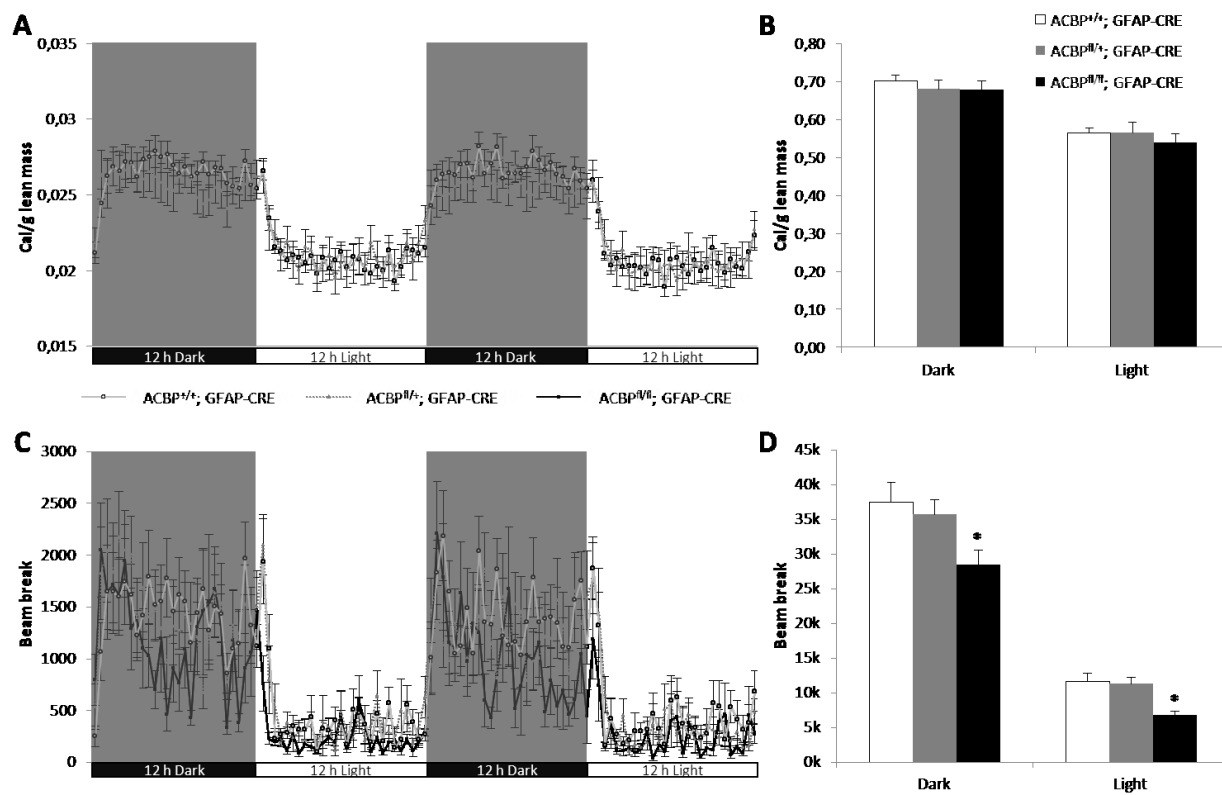


FIGURE 5

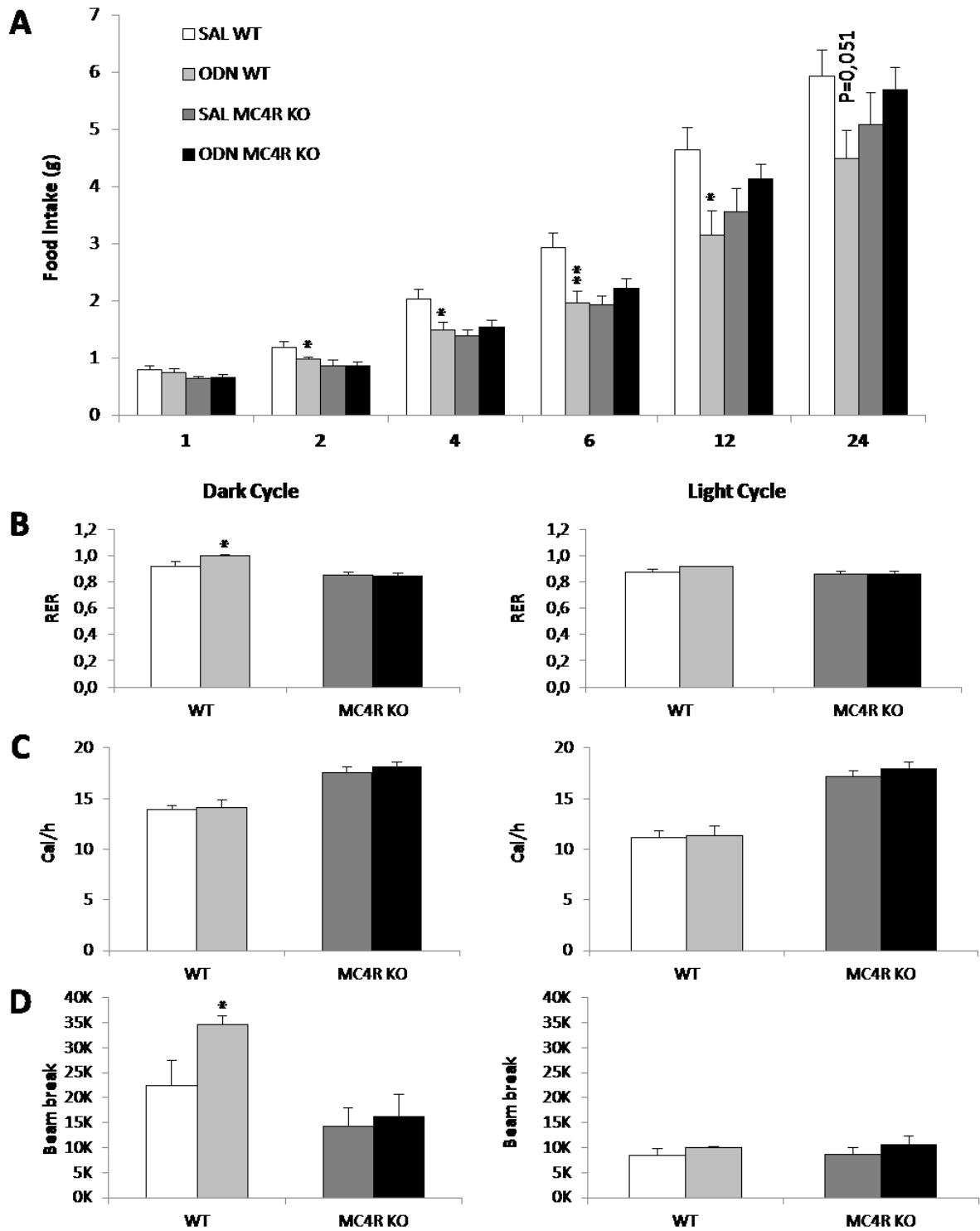


FIGURE 6

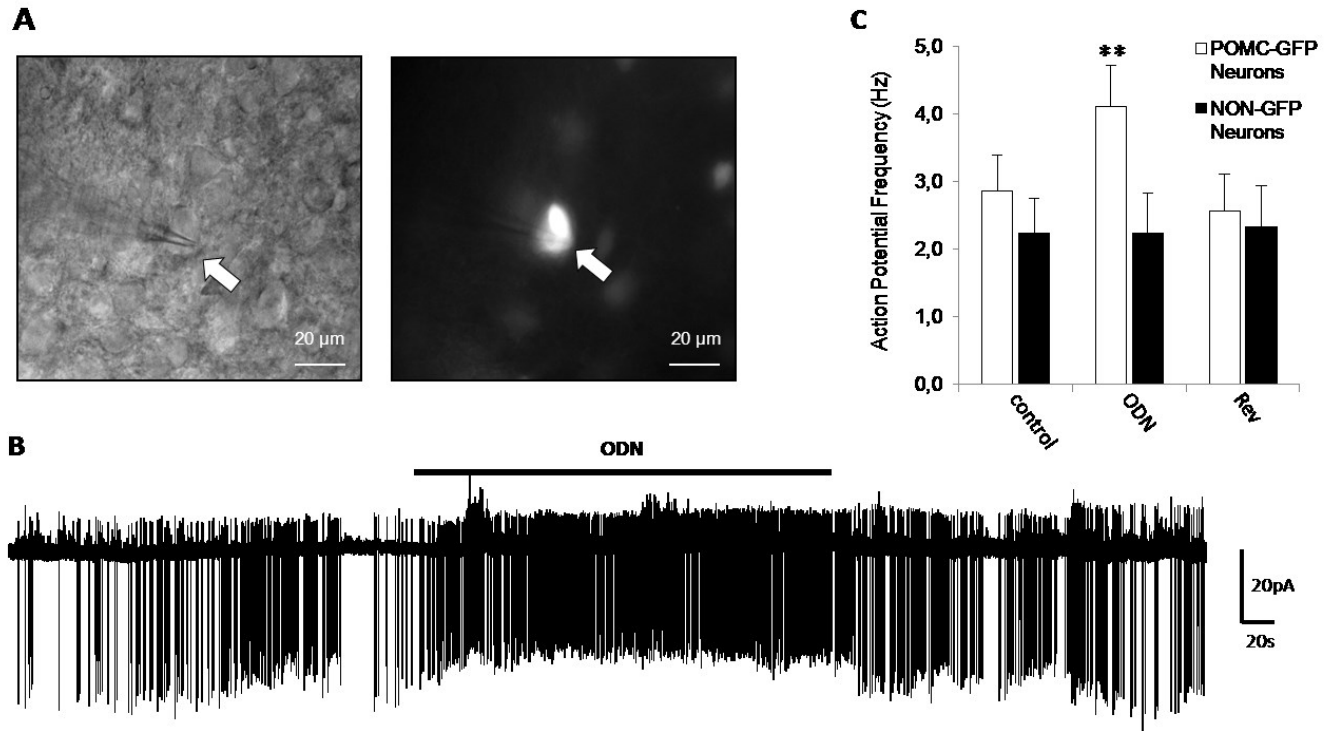


FIGURE 7

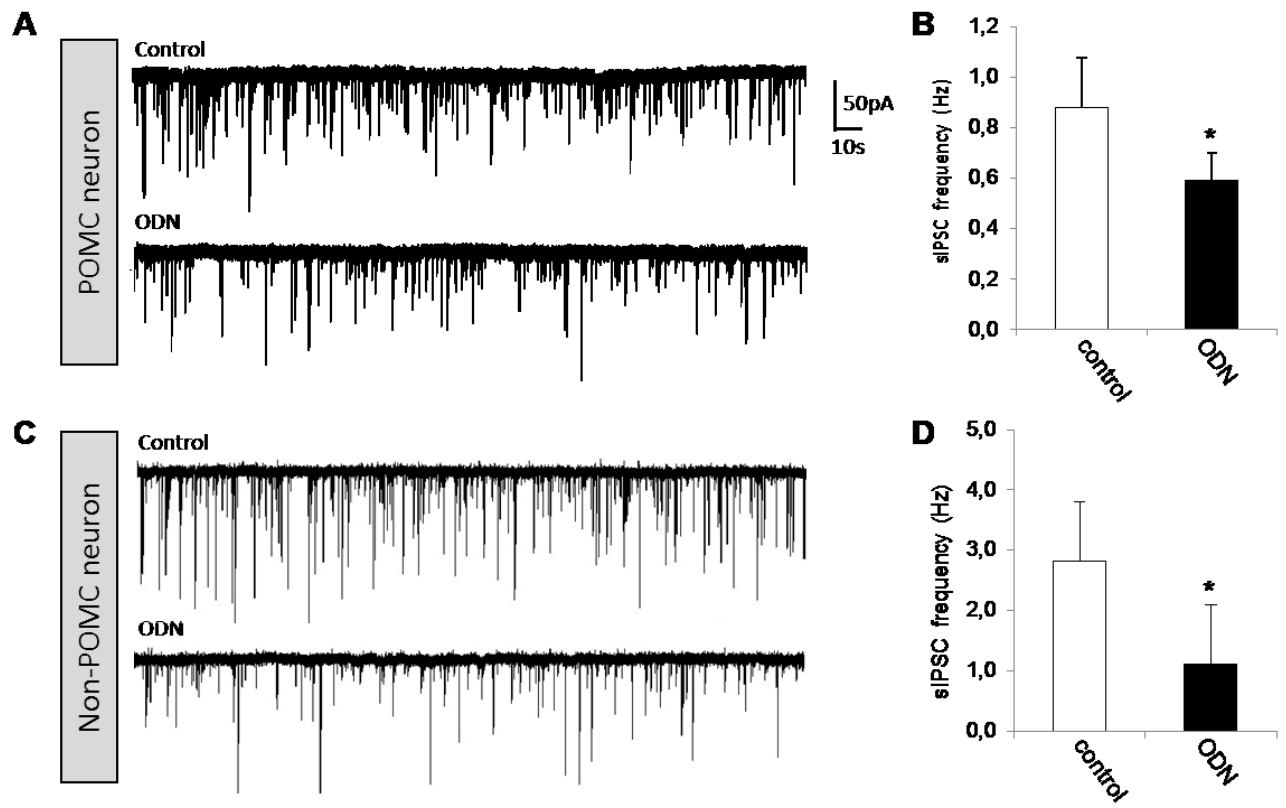
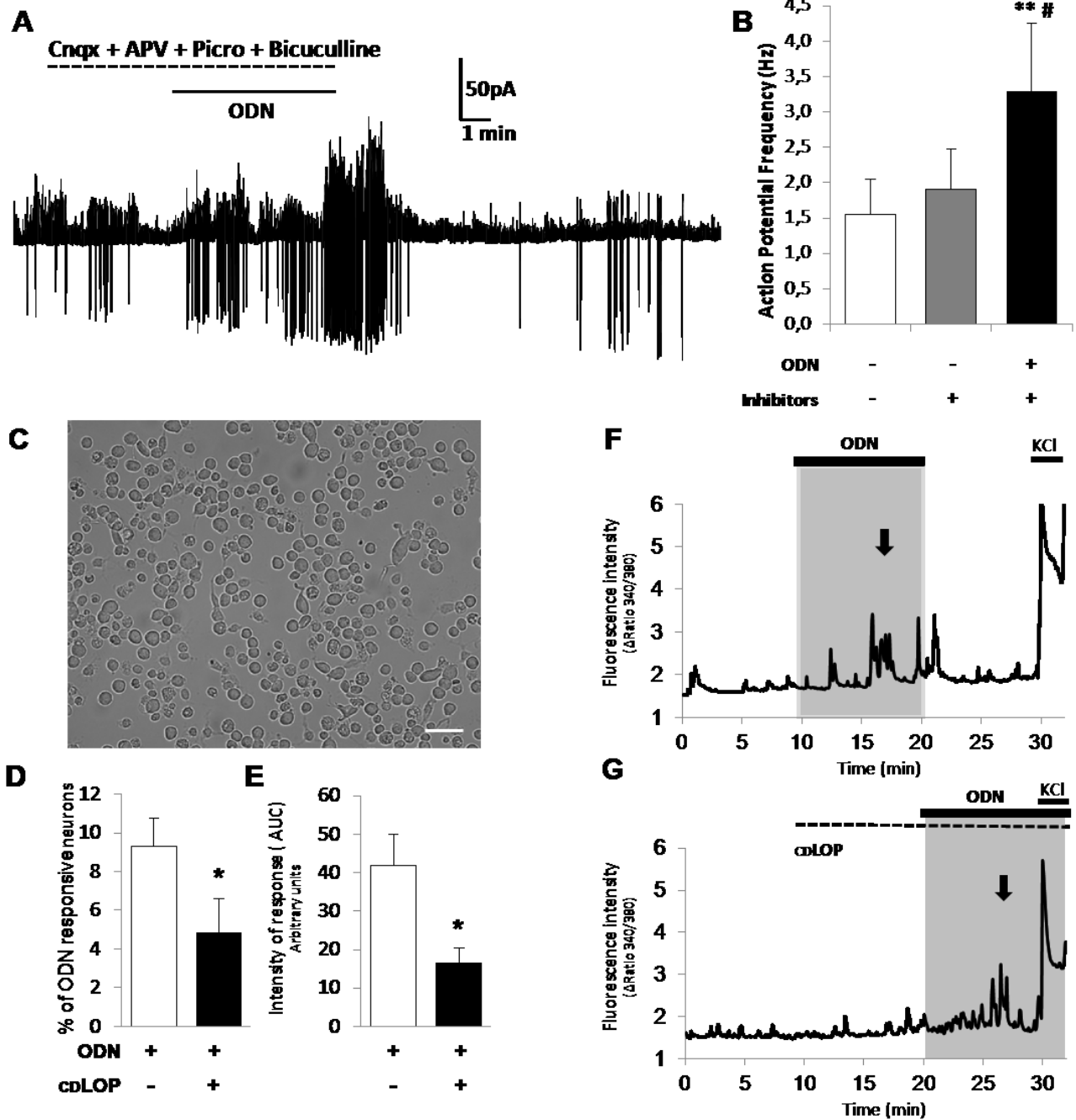


FIGURE 8



Discussion

La régulation de l'homéostasie énergétique repose sur la capacité de l'organisme à moduler les apports et les dépenses énergétiques, soit les deux aspects de la « balance énergétique », pour pallier à ses besoins énergétiques. L'organisme peut moduler la disponibilité des nutriments via l'apport exogène en nutriment (prise alimentaire), ou via ses réserves internes sous forme de glycogène et de TAG. Il est admis que cette régulation se fait principalement dans l'hypothalamus puisqu'il est capable de détecter les variations dans la disponibilité des nutriments et d'engendrer les réponses appropriées sur la balance énergétique. Ainsi en 1953, deux théories ont été proposées pour expliquer le contrôle de la prise alimentaire par l'hypothalamus, soit l'hypothèse « lipostatique » de Kennedy et « glucostatique » de Mayer (Kennedy 1953, Mayer 1953, 1955). Selon Kennedy, l'augmentation des dépôts adipeux induirait la sécrétion de signaux adipeux détectés dans le cerveau pour diminuer la prise alimentaire tandis que Mayer suggère que les variations de la glycémie sont détectées pour moduler la prise alimentaire. Ces travaux ont ouvert la porte à plusieurs études subséquentes sur la détection centrale des nutriments et les implications sur le contrôle de la prise alimentaire.

Étant donné que le cerveau utilise principalement le glucose pour sa production d'ATP, les mécanismes centraux de sa détection ont beaucoup été étudiés (Marty et al. 2007, Thorens 2012). Les mécanismes par lesquels le glucose active certaines populations neuronales sont relativement bien compris. À l'inverse, les mécanismes de détection des acides gras sont moins bien compris. Contrairement au glucose, les acides gras sont une catégorie de molécules variées pouvant avoir une chaîne de 4 à 26 carbones qui peut être saturée, mono ou polyinsaturée. La variété et la classification des acides gras est brièvement résumé au Tableau 1. Ceci rajoute un certain niveau de complexité aux différentes études portant sur leur détection dans le cerveau. Ces différents types d'acides gras peuvent ainsi être transportés ou non vers le cerveau, produire des effets différents, et avoir des devenir métaboliques variables en fonction de la longueur de leur chaîne de carbone et leur degré d'insaturation. Des exemples les plus marquants sont les effets différentiels des acides gras saturés et insaturés dans le cerveau sur la prise alimentaire. L'administration d'acides gras mono ou polyinsaturés en ICV diminue la prise alimentaire tandis que l'administration d'acides gras saturés n'a aucun effet (Obici et al. 2002, Schwinkendorf et al. 2011). Un autre exemple est le devenir différent du DHA et de l'EPA, deux acides gras polyinsaturés ayant une longueur de chaîne et un niveau d'insaturation similaire. Le DHA est principalement estérifié et devient un composant essentiel des

membranes cellulaires tandis que l'EPA est rapidement oxydé (Chen et al. 2009, Chen and Bazinet 2015).

La détection des nutriments, comme le glucose, est souvent dépendante d'un changement dans la concentration d'ATP suite à son oxydation. La détection des acides gras ne peut donc être étudiée sans prendre en compte le métabolisme du glucose. Si l'on se fie au modèle de la cellule β pancréatique, qui est capable de détecter le glucose et les acides gras, il a été observé dans ce type cellulaire que le métabolisme des acides gras était couplé à celui du glucose (Prentki et al. 1992, MacDonald et al. 2005). Ainsi, l'augmentation des niveaux de glucose inhibe l'oxydation des acides gras, tandis que sa diminution est permissive à l'oxydation des acides gras.

Plusieurs études ont déjà démontré plusieurs formes de détection centrale des acides gras : l'accumulation des Acyl-CoA intracellulaire est un signal anorexigène (Pocai et al. 2005), la baisse des niveaux circulants de NEFA entraîne une activation de l'axe HPA, les TAG sont détectés dans les aires mésolymbiques pour moduler l'aspect récompensant des diètes riches en gras (Cansell et al. 2014). Par contre, plusieurs questions restent sans réponse définitive concernant la détection des acides gras, quel type d'acide gras est détecté, leur métabolisme intracellulaire est-il requis pour leur détection ainsi que le type cellulaire impliqué dans cette détection.

L'ensemble des travaux ayant contribué à la complétion de cette thèse a pour but d'évaluer l'implication du métabolisme central des acides gras dans le contrôle de l'homéostasie énergétique par ces derniers et d'identifier des mécanismes par lesquels les acides gras seraient capables de moduler la prise alimentaire et la balance énergétique. Ils peuvent être séparés en trois volets ayant conduit à la publication de deux articles et à la soumission d'un troisième.

La première étude a pour but de caractériser la régulation du métabolisme des acides gras par le glucose et de déterminer si cette régulation est affectée par le type cellulaire, la région cérébrale ou par le type d'acide gras. Un autre but de cette étude était d'identifier un mécanisme expliquant cette régulation. Les résultats générés par cette étude ont permis l'identification d'un couplage entre le métabolisme du glucose et des acides gras dans le cerveau qui dépend de l'AMPK. Ce couplage est affecté par le type d'acide gras, notamment par le degré de saturation, ainsi que de la région cérébrale, cortex ou MBH.

La deuxième étude a pour but d'identifier les mécanismes intracellulaires du métabolisme des acides gras dans le cerveau et plus particulièrement, l'implication d'ACBP, une protéine de liaison des Acyl-CoAs connue pour être impliquée dans ce processus dans la périphérie. Un deuxième but de cette étude était d'évaluer si le métabolisme intracellulaire des acides gras dans le cerveau était régulé de façon différente pour les acides gras saturés et insaturés. Nos résultats ont permis de montrer pour la première fois qu'ACBP, tout comme en périphérie, est impliqué dans la régulation de l'oxydation et l'estérification des acides gras insaturés dans le CNS.

Finalement, le but de la troisième étude est de déterminer l'implication d'ACBP ainsi que son produit de clivage ODN, dans le contrôle de la prise alimentaire via l'activation des neurones POMC et de la voie des mélanocortines, ainsi que dans le développement de l'obésité *in vivo*. Nos données, générées via l'utilisation de souris où ACBP a été invalidée dans les astrocytes du CNS, nous montrent que dans les astrocytes, ACBP a un effet sur la prise alimentaire et les dépenses énergétiques qui se traduisent par une prise de poids accrue. Cette troisième étude nous a permis de confirmer l'effet anorexigène d'ODN dans le cerveau et de démontrer l'importance de la voie des mélanocortines dans son action sur la prise alimentaire. Nous montrons aussi pour la première fois une activation directe et spécifique des neurones anorexigènes POMC par l'endozépine ODN dans le MBH de manière indépendante de son action sur le récepteur GABA_A.

Étude 1

Dans le but d'évaluer la régulation du métabolisme des lipides par le glucose dans les deux types cellulaires principaux du cerveau, soit les neurones et les astrocytes, et de déterminer la contribution de ces deux acteurs à ce couplage métabolique, nous avons besoin de modèles cellulaires représentant ces deux types cellulaires de façon séparée. Pour étudier la composante neuronale, nous avons choisi de travailler sur des lignées cellulaires hypothalamiques immortalisées. Nous avons choisi de ne pas utiliser de cultures primaires de neurones puisque cette approche ne nous permettait pas d'utiliser des neurones de l'hypothalamus. Les cultures primaires de neurones sont générées à partir de cerveau embryonnaire, nous étions ainsi limités par la quantité de matériel biologique dans l'hypothalamus à un stade prénatal (généralement E18). Nous aurions pu générer ces cultures à partir du cortex, par contre nous nous attendions à observer ce couplage uniquement dans

l'hypothalamus (Minokoshi et al. 2004). En effet, selon notre hypothèse, le couplage du métabolisme des acides gras avec le glucose est une des composantes de la détection des nutriments et particulièrement des acides gras dans le cerveau. La nécessité d'avoir un modèle hypothalamique et la taille de cette structure dans le cerveau embryonnaire a donc motivé notre choix. Le choix des lignées neuronales hypothalamiques GT1-7 et N46, caractérisées par leur sécrétion d'AgRP et de NPY respectivement, était fondé sur des études préalables montrant que ces lignées sont capables de détecter le glucose (Madadi et al. 2008, Beall et al. 2012).

Dans le CNS, les cellules ayant la plus grande capacité à métaboliser les acides gras, voir même les seules cellules capables d'oxyder ces derniers sont les astrocytes (Edmond et al. 1987, Escartin et al. 2007). Étant donné leur importance dans le métabolisme des acides gras, il était essentiel pour nous d'avoir un modèle représentant le plus précisément ce type cellulaire. Nous avons ainsi décidé de travailler sur un modèle de culture primaire d'astrocytes. Contrairement aux cultures primaires de neurones, il est relativement facile de générer des cultures d'astrocytes à partir de l'hypothalamus d'un seul animal. De plus, bien que des lignées astrocytaires immortalisées soient disponibles et relativement faciles à maintenir, celles-ci sont générées à partir de matériel cortical. Il était donc impossible pour nous d'utiliser ces cellules pour étudier les caractéristiques du métabolisme hypothalamique des acides gras.

J'ai donc développé et mis au point dans le laboratoire, un modèle de culture primaire d'astrocytes hypothalamique de souris. À ma connaissance, aucun modèle de culture primaire d'astrocytes hypothalamique provenant d'une seule souris n'avait été rapporté dans la littérature. J'ai donc caractérisé et validé le premier modèle d'astrocytes hypothalamique de souris. J'ai aussi généré en parallèle, des cultures primaires d'astrocytes provenant du cortex. Ces cultures ont été générées pour déterminer si les astrocytes pouvaient être métaboliquement différents selon leur provenance. Ces cultures corticales auraient aussi servi à remplacer les cultures hypothalamiques au cas où leur utilisation s'avérait plus compliquée que prévu.

Dans le cerveau, les astrocytes et les neurones forment une unité fonctionnelle connue sous le nom de synapse tripartite (Araque et al. 1999). De plus, plusieurs études suggèrent que le métabolisme du glucose (Magistretti and Pellerin 1999) et des acides gras (Guzman and Blazquez 2001) requiert la participation de ces deux types cellulaires. Cette association métabolique entre astrocytes et neurones est connue comme la navette de lactate et des corps cétoniques et a été décrite dans les

sections précédentes. Il était ainsi essentiel d'avoir un modèle dans lequel les interactions astrocytes-neurones sont préservées dans le but de confirmer nos observations dans les modèles cellulaires. L'utilisation de techniques non invasives pour mesurer le métabolisme oxydatif des acides gras *in vivo*, notamment via l'utilisation d'acides gras marqués au ^{13}C et leur détection par spectroscopie par résonance magnétique, est techniquement réalisable (Ebert et al. 2003). Par contre, ces techniques comportent plusieurs inconvénients incluant le faible rapport signal/bruit de fond produit lié à la détection du ^{13}C (Cunnane et al. 2001). De plus, l'équipement et l'expertise requise à la mise au point de ces techniques dans notre labo n'étaient pas facilement accessibles.

Nous nous sommes donc tournés vers un modèle de cultures d'explants *ex vivo* adapté à partir de protocoles utilisés pour les enregistrements électrophysiologiques. Ce modèle a été mis au point et validé conjointement avec une autre étudiante au PhD du laboratoire, Bouchra Taïb. Ce modèle a été ajusté, principalement au niveau de l'oxygénation des tissus, pour pouvoir être utilisé avec des milieux de culture contenant de l'albumine, ce qui est nécessaire à la complexation des acides gras ainsi que des traceurs radio-marqués, pour étudier le métabolisme oxydatif de différents acides gras. Un inconvénient, ou limite, de ce modèle est qu'il ne tient pas en compte le transport des acides gras à travers la BBB. À l'inverse, cette limite peut aussi être considérée comme un avantage puisqu'il nous permet de contrôler plus précisément les concentrations de traceurs et de glucose, sans nous soucier du transport des acides gras à travers la BBB.

Couplage du métabolisme du glucose et des acides gras

Le métabolisme des acides gras et du glucose est couplé dans les tissus périphériques comme les cellules β et les hépatocytes (Prentki et al. 1992). Il a été suggéré que ce couplage existe aussi dans le CNS, particulièrement dans les régions du cerveau capable de détecter les nutriments comme le MBH et plus précisément l'ARC. Cependant, aucune démonstration de ce couplage n'a été faite jusqu'à présent. Nous montrons ainsi pour la première fois l'existence de ce couplage dans les neurones ainsi que les astrocytes du MBH via l'utilisation de modèles complémentaires *in vitro* et *ex vivo*.

Le métabolisme oxydatif du glucose génère de l'Acétyl-CoA qui entre dans le cycle de Krebs ou TCA pour être complètement oxydé en CO_2 et générer de l'ATP via la phosphorylation oxydative. Lorsque

les concentrations de glucose augmentent dans ces tissus, plusieurs processus s'enclenchent pour défavoriser l'oxydation mitochondriale des acides gras par rapport à celle du glucose. Premièrement, l'augmentation de la concentration d'Acétyl-CoA généré va favoriser sa carboxylation en Malonyl-CoA via l'ACC. Le Malonyl-CoA ainsi généré inhibe l'activité de CPT1 et diminue l'entrée des acides gras dans la mitochondrie. Deuxièmement, l'ATP générée par l'oxydation du glucose augmente le ratio ATP/AMP, ce qui a pour effet d'inhiber l'activité de l'AMP-activated kinase (AMPK) et renverse l'inhibition de l'activité de l'ACC par l'AMPK, augmentant davantage la concentration de Malonyl-CoA. Le couplage du métabolisme de ces deux molécules riches en énergie est un processus qui semble être lié à la détection des nutriments, nous pouvons nous attendre à observer ce couplage dans les régions du CNS impliqué dans ce processus.

Le glucose est capable d'inhiber l'activité de l'AMPK via sa déphosphorylation dans nos trois modèles hypothalamiques. Ceci est accompagné d'une diminution de l'oxydation des acides gras dans ces trois modèles. Cette inhibition n'est pas observée dans les astrocytes et les explants d'origine corticale. L'activation pharmacologique de l'AMPK par le 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR) lorsque les concentrations de glucose favorisent l'inhibition de l'oxydation β restaure les taux d'oxydation du palmitate. Comme attendu, l'activation pharmacologique de l'AMPK n'est efficace pour augmenter l'oxydation du palmitate que dans les régions hypothalamiques.

Le couplage entre le métabolisme du glucose et des acides gras est un processus AMPK dépendant et n'est observé que dans le MBH. Ces observations s'accordent parfaitement avec des données antérieures suggérant que l'activité de l'AMPK dans le MBH est sensible aux variations des concentrations du glucose induites par l'hypoglycémie ou la glucopénie, via l'injection ICV de 2-DG, tandis qu'elle est insensible à ces signaux dans le cortex (Minokoshi et al. 2004, Han et al. 2005, Alquier et al. 2007). Ceci est compatible avec le rôle de l'AMPK en tant que senseur métabolique puisque son activité semble être sensible au glucose uniquement dans les régions du cerveau impliqué dans sa détection.

L'inefficacité de nos traitements avec l'AICAR, un activateur de l'AMPK, à moduler l'oxydation du palmitate dans les astrocytes corticaux est en contraste avec les observations faites sur des astrocytes corticaux chez le rat où l'activation de l'AMPK par l'AICAR produit une augmentation de la cétogenèse à partir du palmitate (Blazquez et al. 1999). Plusieurs explications peuvent être proposées pour expliquer ces différences, incluant des conditions de cultures différentes, ou liées à des différences

entre les astrocytes de rat et de souris. De plus, le fait que dans notre modèle d'astrocytes corticaux, l'AICAR augmente la phosphorylation de l'AMPK sans affecter l'oxydation des acides gras semble suggérer que l'oxydation du palmitate est déjà à son maximum. L'insensibilité de l'AMPK à l'augmentation de la concentration en glucose dans le cortex n'est pas attribuable à une différence dans l'utilisation ou l'oxydation du glucose. En effet, nous observons des taux d'utilisation et d'oxydation du glucose sont identiques dans les astrocytes hypothalamiques et corticaux. De plus, on observe les mêmes niveaux d'augmentations de l'utilisation du glucose dans les explants hypothalamiques et corticaux.

Les changements dans la concentration de glucose peuvent aussi réguler la partition entre oxydation et estérification des acides gras. L'entrée des acides gras dans la cellule est suivie rapidement par leur activation en Acyl-CoA par différentes ACS. Ces Acyl-CoAs peuvent être dirigés vers des processus cataboliques, comme l'oxydation β , ou anaboliques, comme la synthèse des glycérolipides ou des phospholipides membranaires (Grevengoed et al. 2014). Étant donné l'importance de ces différents types de lipides complexes au bon fonctionnement des cellules, soit dans la régulation de l'expression génique ou la synthèse des membranes lipidiques, cette partition entre oxydation et estérification des acides gras se doit d'être régulée. Jusqu'à maintenant, nous ne savions pas si cette régulation pouvait être affectée par le statut nutritionnel ou par d'autres nutriments comme le glucose. Nous montrons ainsi pour la première fois que les changements dans la concentration de glucose sont capables de réguler l'estérification du palmitate dans nos modèles de neurones et d'explants hypothalamiques. L'augmentation des niveaux de glucose dans ces deux modèles entraîne une augmentation de l'estérification du palmitate en DAG ainsi qu'en TAG. Cette augmentation des taux d'estérification est aussi accompagnée d'une augmentation des niveaux d'expression de plusieurs enzymes impliqués dans ce processus tel que les 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransférase 1, 5, 7 et 8, et diacylglycerol acyltransférase 1. Bien que ces enzymes soient exprimés dans les astrocytes, ce processus ne semble pas être régulé par le glucose dans ces cellules.

Régulation différentielle du métabolisme des acides gras saturés et insaturés

Différents acides gras peuvent avoir des effets différents et ne sont peut-être pas détectés ou métabolisés de la même façon. Un des exemples les plus marquants est l'effet différentiel des acides gras saturés et insaturés sur la prise alimentaire où les acides gras insaturés, comme l'oléate, inhibent la prise alimentaire et la production hépatique de glucose tandis que les acides gras saturés, comme le palmitate, n'ont aucun effet (Obici et al. 2002, Schwinkendorf et al. 2011).

Effectivement, nous observons dans notre modèle d'explants hypothalamiques que l'oxydation du palmitate et de l'oléate sont régulés différemment en réponse aux variations des concentrations du glucose. Le glucose inhibe l'oxydation du palmitate dans ce modèle tandis qu'il n'a aucun effet sur l'oléate. Ceci peut être expliqué par une oxydation peroxisomale de l'oléate plutôt que mitochondriale. L'oxydation des acides gras dans le peroxysome ne dépend pas de l'activité de CPT1. Ceci est compatible avec nos observations puisque l'inhibition de CPT1 par l'étomoxir n'a aucun effet sur l'oxydation de l'oléate tandis qu'elle inhibe presque complètement l'oxydation du palmitate dans les explants hypothalamiques. Cette explication est compatible avec le fait que les Acyl-CoAs saturés ont un effet inhibiteur sur l'ACC plus prononcé que les Acyl-CoAs insaturés. Le palmitoyl-CoA et le stéaroyl-CoA ont une constante d'inhibition de l'ACC beaucoup plus faible que l'oléyl-CoA (Ogiwara et al. 1978, Nikawa et al. 1979). Ceci serait probablement un mécanisme pour prévenir l'accumulation d'Acyl-CoA saturé par l'inhibition de leur oxydation mitochondriale.

Tout comme avec son oxydation, nous observons que l'estérification de l'oléate en DAG et en TAG n'est pas modulée par le glucose dans nos modèles neuronaux ou d'explants hypothalamiques, et ce, en dépit d'une augmentation de l'expression des enzymes impliqués dans l'estérification des Acyl-CoAs (GPAT, AGPAT et DGAT). Une explication potentielle pour expliquer la régulation différentielle de l'estérification de l'oléate est que, lors d'une augmentation des concentrations en glucose, l'oléyl-CoA soit moins disponible que le palmitoyl-CoA pour être estérifié étant donné que son oxydation n'est pas inhibée par le glucose. Par contre, ceci n'est expliqué par le fait que l'estérification de l'oléate en TAG soit plus élevée que celle du palmitate. Ceci confirme en effet un devenir intracellulaire et une régulation différentielle des différents types d'acides gras dans l'hypothalamus.

Métabolisme des acides gras dans le cerveau

Dans cette étude, nous avons mis en évidence la forte capacité d'oxydation des acides gras de l'hypothalamus lorsqu'elle est comparée à d'autres régions du cerveau comme le cortex ou à des tissus périphériques impliqués dans le métabolisme des acides gras tels le foie et le muscle (le soleus dans notre étude). Ceci corrobore des observations faites dans les années 80 et 90 montrant que les niveaux d'oxydation du palmitate sont plus élevés dans le VMH que dans le cortex, et qu'ils peuvent même être plus élevés que dans le foie (Kasser et al. 1985, Beverly and Martin 1991). Ces études ainsi que la nôtre utilisent un modèle d'explant *ex vivo* qui contourne le transport des acides gras dans le cerveau à travers la BBB et fournit une quantité d'acides gras potentiellement supérieure à ce qui peut être observé *in vivo*. En dépit de cette limite, ces études montrent que le cerveau, particulièrement l'hypothalamus, possède la machinerie nécessaire à l'oxydation des acides gras et qu'il a une grande capacité d'oxydation des acides gras. En effet, les acides gras peuvent contribuer jusqu'à 20 % de la production énergétique *in vivo* du cerveau chez le rat (Ebert et al. 2003). Une autre observation qui ressort de notre étude, et qui valide en quelque sorte nos choix de modèles cellulaires, est que les astrocytes ont un taux d'oxydation du palmitate 2 à 3 fois plus élevé que les neurones en culture. Ceci est compatible avec les indications qui suggèrent que les astrocytes sont les seules cellules à pouvoir oxyder de façon efficace les acides gras (Edmond et al. 1987).

Ceci étant dit, nous aurions pu nous attendre à observer une plus grande différence entre l'oxydation astrocytaire et neuronale du palmitate, il faut toutefois prendre en considération que nos mesures d'oxydation neuronales ont été effectuées dans des lignées neuronales immortalisées. Ces neurones immortalisés sont capables de survivre en absence d'un support métabolique des astrocytes, ce qui n'est pas le cas *in vivo* si l'on se fie à l'hypothèse de l'ANLS (Pellerin and Magistretti 1994).

Les taux d'oxydation des acides gras ne sont pas uniformes à travers les différentes régions du cerveau. L'oxydation hypothalamique du palmitate est beaucoup plus importante que dans les explants corticaux. Cette différence n'est pas observée entre les astrocytes hypothalamiques et corticaux. Ces deux observations, qui peuvent sembler contradictoires, peuvent être expliquées par le fait que l'oxydation des acides gras serait presque exclusivement astrocytaire (Edmond et al. 1987, Escartin et al. 2007). En effet, les astrocytes contribuent à la majorité de l'oxydation des acides gras dans nos explants, ainsi les niveaux plus élevés d'oxydation du palmitate dans les explants

hypothalamiques reflètent la plus forte densité d'astrocyte dans cette région par rapport au cortex (Emsley and Macklis 2006).

Contrairement à ce qui a été rapporté dans la littérature sur le métabolisme du glucose dans les astrocytes en culture (Edmond et al. 1987, Zwingmann and Leibfritz 2003), nous rapportons que plus de la moitié du glucose utilisé par les astrocytes est complètement oxydé en CO₂. Nous savons que les astrocytes ont la machinerie nécessaire à l'oxydation du glucose et qu'ils ont une capacité oxydative équivalente à celle des neurones (Hertz et al. 2007). De plus, lorsque l'on considère l'hypothèse de la navette du lactate ou « l'ANLS », et la disponibilité des différents substrats, il n'est pas surprenant d'observer de si haut taux d'oxydation du glucose dans les astrocytes. Brièvement l'augmentation rapide de l'activité neuronale est accompagnée d'une relâche de glutamate qui est transporté par les astrocytes. Ce dernier va stimuler la glycolyse et la synthèse de lactate à partir du glucose qui sera acheminé au neurone en activité pour la production de l'ATP nécessaire au maintien des AP. Le glutamate transporté dans les astrocytes peut être recyclé et réacheminé au neurone sous une forme non neuroactive, la glutamine, ou il peut être oxydé dans le TCA mitochondrial (McKenna 2012).

Dans notre modèle, les astrocytes sont cultivés en absence de neurones, le glucose disponible en excès est ainsi dirigé soit vers la glycogénogenèse ou vers son oxydation dans le TCA. De plus, il a déjà été montré que l'addition de glutamate a pour effet d'augmenter l'oxydation de ce dernier tout en diminuant l'oxydation d'autres substrats comme le glucose, le lactate et les corps cétoniques (McKenna 2012). De plus, les astrocytes sont responsables d'environ 30 % de la consommation totale d'oxygène dans le cerveau, en grande partie via l'oxydation du glutamate (Lebon et al. 2002, Hertz 2006). Nos observations, montrant des hauts taux d'oxydation du glucose dans les astrocytes, en accord avec ces études récentes remettent en cause le dogme du métabolisme exclusivement glycolytique des astrocytes.

L'implication du couplage métabolique dans la détection des acides gras

Il est relativement bien établi maintenant que le métabolisme des acides gras peut être impliqué dans leur détection et donc important pour l'effet de ces derniers sur la prise alimentaire et le métabolisme du glucose (Obici et al. 2003, Lam, Poci, et al. 2005, Poci et al. 2005, Poci et al. 2006).

Bien que ces études ne soient pas focalisées sur l'action centrale du glucose sur la détection des acides gras, elles suggèrent un rôle CPT1 dépendant des acides gras sur la prise alimentaire et la production hépatique de glucose. Nous montrons dans notre première étude que le glucose peut agir au niveau central pour moduler le métabolisme de certains acides gras de façon AMPK et CPT1 dépendante. Le couplage métabolique du glucose et des acides gras devient un acteur important dans la détection des acides gras dans le MBH. En effet, la détection des acides gras peut être dépendante de la concentration de glucose. Ceci est mis en évidence par des études électrophysiologiques montrant que l'activation des neurones de l'ARC par les acides gras, notamment l'oléate, se fait en fonction de la concentration extracellulaire de glucose (Wang, Cruciani-Guglielmacci, et al. 2006). Les auteurs montrent que chez les animaux nourris et lorsque les concentrations de glucose sont élevées, l'oléate a un effet excitateur sur les neurones de l'ARC, tandis que chez les animaux à jeun ou à de faibles concentrations de glucose, il a un effet principalement inhibiteur.

L'importance de la modulation du métabolisme des acides gras par le glucose dans la détection des acides gras et leur effet anorexigène est renforcée par une autre étude montrant que le métabolisme des acides gras contribue à l'activation des neurones anorexigènes POMC dans l'ARC (Jo et al. 2009). Cette dernière montre que l'activation de ces neurones par l'oléate est un processus qui dépend de CPT1. En effet, l'inhibition de cette dernière par des inhibiteurs pharmacologiques ou via l'augmentation de la concentration de malonyl-CoA, prévient l'activation des neurones POMC par l'oléate. Un autre parallèle entre ce papier et notre étude est que l'activation dépend de l'acide gras utilisé, soit l'oléate par rapport à l'octanoate. Finalement, (Jo et al. 2009) observent une plus grande proportion de neurones POMC activés par l'oléate à de faibles concentrations de glucose. Les auteurs expliquent ces observations par une inhibition de CPT1 lorsque les concentrations en glucose sont élevées. Ceci n'est pas compatible avec l'absence d'inhibition de l'oxydation de l'oléate par le glucose que nous observons dans nos explants hypothalamiques. Ces différences peuvent être dues au fait qu'ils sont capables de mesurer l'activité électrique d'une population spécifique de neurones, les neurones POMC, tandis que notre modèle ne nous permet pas une telle résolution. De plus, nos observations ainsi que les leurs sont compatibles avec l'effet anorexigène de l'administration d'oléate en ICV puisqu'elle active une population de neurones anorexigènes de l'ARC sans affecter la population de neurones orexigènes de ce noyau.

Ainsi, l'ensemble des résultats obtenus lors de cette étude montrent que le métabolisme intracellulaire des acides gras est un processus régulé par le glucose de façon AMPK dépendent. Cette régulation est spécifique au type d'acide gras ainsi qu'à la région cérébrale. De plus, le métabolisme des acides gras semble être plus important dans les astrocytes que dans les neurones. Nos résultats mettent en évidence la forte capacité oxydative des cellules du MBH, particulièrement celle des astrocytes. Contrairement au dogme voulant que les astrocytes soient exclusivement glycolytiques, nous mettons en évidence leur haute capacité oxydative, ceci renforce l'idée que les cellules gliales sont impliquées dans la détection des nutriments, particulièrement dans le cas des acides gras via un mécanisme similaire à ce qui est observé dans les cellules β pancréatiques impliquant l'AMPK. Étant donné l'importance du métabolisme des acides gras dans leur détection et l'activation des neurones anorexigènes de l'ARC, il est important pour nous de mieux comprendre le mécanisme de leur métabolisme intracellulaire dans le cerveau. Ainsi pour notre deuxième étude, nous nous sommes intéressés au métabolisme intracellulaire des acides gras dans le cerveau et à l'implication de la protéine ACBP dans ce processus particulièrement dans les cellules astrogliales.

Étude 2

Comme il a été mentionné plus haut, les acides gras peuvent avoir plusieurs effets sur l'homéostasie énergétique au niveau central, que ce soit sur la prise alimentaire ou la régulation de la production hépatique du glucose (Lam, Pocai, et al. 2005, Lam, Schwartz, et al. 2005). Plusieurs ont aussi rapporté que ces différents effets sont spécifiques à certains types d'acides gras. L'infusion ICV d'acides gras à longue chaîne insaturée, comme l'oléate et le DHA, module la prise alimentaire et le métabolisme énergétique tandis que des acides gras saturés de moyennes et longues chaînes, comme l'octanoate et le palmitate, n'ont aucun effet sur ces paramètres (Obici et al. 2002, Schwinkendorf et al. 2011). L'activation par les acides gras des neurones POMC de l'ARC est dépendent de l'acide gras utilisé puisque l'oléate, mais pas l'octanoate, active directement ces neurones (Jo et al. 2009). Les mécanismes intracellulaires impliqués dans cette détection, où même le type cellulaire dans lesquelles elle se produit n'est toujours pas élucidé. Certains ont suggéré que l'oxydation β de ces acides gras dans le CNS est requise pour leurs effets en périphérie, notamment sur le contrôle du glucose sanguin (Cruciani-Guglielmacci et al. 2004). D'autres ont émis l'hypothèse que l'accumulation

intracellulaire sous forme d'Acyl-CoA soit le signal nécessaire à la modulation de la prise alimentaire (Obici et al. 2003). Cependant, ces différentes études s'accordent pour dire que la détection hypothalamique des acides gras est importante à la régulation de l'homéostasie glucidique (Lam, Pocai, et al. 2005) et qu'elle produit des effets de différents selon la saturation de la chaîne.

Suite à leur transport dans la cellule, les acides gras libres à longue chaîne sont estérifiés en Acyl-CoAs par différentes protéines, ces derniers sont alors liés par une protéine de liaison ACBP. La liaison de ces Acyl-CoA à ACBP a pour effet de les stabiliser en les protégeant contre l'hydrolyse (Martin et al. 2003). En plus de son rôle de protéine de liaison, ACBP est capable d'acheminer les Acyl-CoAs vers leurs différentes voies métaboliques ou signalétiques (Faergeman and Knudsen 1997). Ces rôles d'ACBP dans le métabolisme des acides gras sont relativement bien établis dans les tissus périphériques. Bien que cette protéine soit fortement exprimée dans le cerveau, aucune étude visant à caractériser son rôle dans le métabolisme central des acides gras n'a été effectuée. Les rôles d'ACBP dans le cerveau, où cette protéine a été identifiée pour la première fois sous le nom de Diazépam Binding Inhibitor ou DBI, se limitent à son action en tant que peptide sécrété par les astrocytes puis clivé pour la modulation de l'activité du récepteur des benzodiazépines et de la prise alimentaire.

Ainsi, dans le cadre de notre deuxième étude, nous nous sommes focalisés sur la caractérisation du rôle d'ACBP dans le métabolisme intracellulaire des acides gras dans le cerveau. Notre objectif principal est de déterminer si, dans le CNS, ACBP possède ce double rôle de régulateur du métabolisme intracellulaire des acides gras en plus de son rôle de peptide sécrété par les astrocytes, ou gliotransmetteur. Pour la réalisation de ce projet, nous nous sommes basées à la fois sur des données de la littérature, suggérant que les astrocytes sont le site principal de l'oxydation des acides gras dans le cerveau (Zwingmann and Leibfritz 2003, Escartin et al. 2007), ainsi que sur les résultats obtenus lors de notre première étude montrant des niveaux d'oxydation plusieurs fois supérieurs dans les astrocytes que les neurones en culture. À la lumière de ces résultats, nous nous sommes focalisés sur le métabolisme astrocytaire des acides gras.

Nous avons, de plus, utilisé une souris invalidée pour ACBP (ACBP Lox) récemment développée et validée (Nees et al. 2011) par nos collaborateurs au Danemark, les Drs Susanne Mandrup et Nils Faergeman. Nous avons choisi cette souris en dépit de l'existence de deux autres modèles d'invalidation d'ACBP chez la souris. Ces deux modèles présentaient des inconvénients limitant notre capacité à les utiliser, ou rendaient tout simplement leur utilisation impossible dans notre étude. Le

premier modèle (nm1054) est une délétion spontanée d'environ 400 kb dans le chromosome 1 qui contient les séquences d'au moins 6 gènes, dont ACBP. Ceci rend quasi impossible toute conclusion sur le rôle potentiel d'ACBP dans le métabolisme des lipides (Lee et al. 2007). Le deuxième modèle est le produit d'une invalidation dirigée d'ACBP par recombinaison homologue, l'invalidation homozygote d'ACBP dans ce modèle est létale à l'état embryonnaire pré-implantation. Les embryons KO ne survivent pas au-delà du stade de morula, ou stade 8-cellules (Landrock et al. 2010).

Nous avons donc mis à profit les souris ACBP Lox obtenues de nos collaborateurs ainsi que les modèles de cultures primaires d'astrocytes et d'explants hypothalamiques qui ont été mis au point dans le cadre de la première étude pour évaluer l'implication d'ACBP dans le métabolisme intracellulaire des acides gras dans les astrocytes. Puisque les cultures primaires sont de par leur nature plus hétérogène que les lignées immortalisées et que cette hétérogénéité peut potentiellement moduler les niveaux de base d'oxydation et/ou d'estérification des acides gras, nous avons fait le choix de n'utiliser que les cultures provenant de portées suffisamment larges et comportant des nouveau-nés des trois génotypes. Nous avons donc utilisé une stratégie de croisement HET x HET pour produire des souris WT, HET et KO. Ces souris naissaient à un ratio mendélien, confirmant l'observation que les souris ACBP Lox n'ont pas le phénotype développemental préimplantation observée dans la souris produite par Landrock et coll.

Avant de pouvoir entreprendre la caractérisation de l'expression d'ACBP dans le cerveau, il était nécessaire de valider les outils nécessaires à cette caractérisation. La souris ACBP KO ayant déjà été validée (Neess et al. 2011) dans les tissus périphériques, nous n'avons eu qu'à confirmer l'efficacité de l'ablation d'ACBP dans le cerveau. Ceci nous a permis de valider la spécificité des anticorps utilisés dans cette étude. En effet, nous observons une perte complète du signal ACBP dans les astrocytes et dans le MBH des souris KO à la fois en immunofluorescence et en immunobuvardage, suggérant une perte complète de la protéine ainsi que la spécificité des anticorps utilisés.

L'expression d'ACBP dans le CNS, quant au type cellulaire dans lequel il est exprimé, n'est pas très bien définie dans la littérature. Dans de récentes études, l'expression centrale d'ACBP est décrite comme étant exclusive aux cellules gliales (Lanfray et al. 2013). D'autres mesurent son expression à la fois dans les astrocytes et les neurones (Christian and Huguenard 2013). Pour être en mesure de répondre plus définitivement à cette question, nous avons tiré profit des souris ACBP KO à notre disposition et nous observons une expression préférentielle d'ACBP dans les cellules gliales ainsi

qu'une expression plus faible, mais spécifique, dans certains neurones. Nous pouvons affirmer avec certitude l'expression d'ACBP dans les neurones puisque nous avons validé la spécificité de nos anticorps avec les souris ACBP KO. De plus, nos observations sont en accord avec les travaux de l'équipe de Costa, le premier groupe à avoir isolé et identifié ACBP, en tant que DBI, dans les neurones chez le rongeur (Guidotti et al. 1983).

L'expression d'ACBP est significativement plus élevée dans le MBH que dans le cortex et autres structures du cerveau. Cette forte expression d'ACBP dans les noyaux hypothalamiques impliqués dans la détection des nutriments, dont les acides gras, nous laisse croire qu'ACBP puisse avoir un rôle dans ce processus. De plus, ce patron d'expression est compatible avec la densité élevée d'astrocytes dans l'hypothalamus par rapport au cortex puisque son expression est principalement gliale (Emsley and Macklis 2006). Finalement, nous avons confirmé qu'ACBP est exprimé dans plus de 90 % des cellules dans nos cultures d'astrocytes primaires.

Rôle d'ACBP dans le métabolisme central des acides gras

Contrairement à ce qui a été décrit dans la levure (Faergeman et al. 2007) et dans certains tissus périphériques comme le foie chez la souris (Neess et al. 2011), nous n'avons pas observé de diminution des niveaux totaux d'Acyl-CoA dans le cerveau des souris ACBP KO par rapport aux WT. En effet, nous observons uniquement une augmentation des niveaux de Stéaroyl-CoA à la fois dans le cortex et dans l'hypothalamus suite à l'ablation homozygote d'ACBP. L'absence d'une diminution des niveaux totaux d'Acyl-CoA peut être due à des mécanismes compensatoires dans le cerveau qui seraient absents dans le foie. De plus, il est possible que la régulation des différents types d'Acyl-CoA soit plus finement régulée dans le CNS qu'en périphérie. Nous montrons une augmentation des niveaux de stéaroyl-CoA à la fois dans l'hypothalamus et dans le cortex des souris KO, une observation qui s'accorde avec un modèle d'inactivation d'ACBP chez le nématode (Gaigg et al. 2001). Nos données sur l'accumulation des Acyl-CoAs sont limitées à un nombre restreint de LCFA-CoA, or nous savons qu'ACBP a aussi une haute affinité pour les MCFA-CoA, il est donc possible qu'une diminution des niveaux de MCFA-CoA soit masquée étant donné le nombre limité des espèces que l'on a mesuré. Malgré l'absence de diminution marquée des niveaux d'Acyl-CoA chez les souris KO,

l'augmentation des niveaux de stéaroyl-CoA suggère que l'inactivation d'ACBP perturbe le profil des Acyl-CoA intracellulaire dans le cerveau et que ce dernier est requis pour le maintien de niveaux adéquats des différents Acyl-CoA.

En plus des perturbations dans les niveaux d'Acyl-CoAs, ACBP joue aussi un rôle dans le métabolisme intracellulaire des acides gras (Huang et al. 2005, Elle et al. 2011). Nous montrons, en utilisant à la fois notre modèle d'astrocytes en culture et des explants hypothalamiques provenant de souris ACBP WT et KO, qu'ACBP est impliqué dans les processus d'oxydation et d'estérification des acides gras. Nous observons une diminution de l'oxydation de l'oléate ainsi qu'une diminution de son estérification en TAG et en PL dans notre modèle d'astrocyte primaire hypothalamique. Cette diminution observée dans notre modèle est en accord avec d'autres études où une surexpression d'ACBP a pour effet d'augmenter les taux d'estérification des LCFA en TAG et PL dans le foie chez les souris (Huang et al. 2005) et où l'ablation d'ACBP diminue l'accumulation des TAG chez le *C. elegans* (Elle et al. 2011). De façon intéressante, bien que nous observions des défauts d'oxydation de l'oléate à la fois dans les astrocytes hypothalamiques et corticaux, nous n'observons aucun défaut dans l'estérification de l'oléate dans les astrocytes en provenance du cortex suite à l'inactivation d'ACBP. De la même façon, plusieurs enzymes impliqués dans l'estérification des acides gras sont régulés par ACBP différemment dans les astrocytes hypothalamiques et corticaux. Notamment, l'expression d'AGPAT 1 et 4 est augmentée dans les astrocytes corticaux KO, tandis qu'elle est inchangée dans les astrocytes hypothalamiques KO. Si cette augmentation se traduit aussi par une augmentation de l'activité de ces enzymes, celle-ci pourrait expliquer l'absence de diminution dans l'estérification de l'oléate que nous observons dans les astrocytes corticaux.

Ces différences dans la régulation de l'estérification de l'oléate entre les astrocytes corticaux et hypothalamiques s'ajoutent et vont dans le même sens que les différences observées dans le cadre de la première étude, où l'on montre que la régulation du métabolisme des acides gras est régulée par le glucose uniquement dans les astrocytes hypothalamiques. Ces différences suggèrent que les astrocytes ne sont pas un type cellulaire homogène et qu'ils peuvent avoir différentes fonctions en fonction de leur emplacement dans le cerveau et/ou en fonction des neurones auxquels ils sont associés. Ainsi, des astrocytes hypothalamiques sont plus susceptibles d'être impliqués dans les divers processus conduisant à la détection des nutriments que des astrocytes situés dans le cortex.

Régulation différentielle du métabolisme des acides gras saturés et insaturés par ACBP

Plusieurs études ont déjà montré que les acides gras saturés et insaturés ont des fonctions différentes dans le cerveau. Ces études montrant l'effet différentiel des acides gras touchent à plusieurs sujets variés allant de la régulation de la prise alimentaire (Schwinkendorf et al. 2011), à la régulation de leur métabolisme (oxydation et estérification) par le glucose (étude 1), et ayant même des effets différentiels sur les systèmes de récompenses (Hryhorczuk et al. 2016). En accord avec ces observations précédentes, nous montrons à nouveau que les acides gras saturés et insaturés sont régulés de façon différentielle par ACBP dans le cerveau. En effet, nos données que le métabolisme intracellulaire des acides gras insaturés est régulé par ACBP, tandis que les acides gras saturés ne sont pas affectés par l'absence de cette protéine.

À la fois dans notre modèle astrocytaire et d'explants hypothalamiques, nous observons une diminution dans les taux d'oxydation des acides gras insaturés, mais pas des acides gras saturés, suite à l'invalidation d'ACBP. Cette disparité est aussi observée dans pour l'estérification des acides gras dans les astrocytes hypothalamiques. Malgré la diminution de l'estérification de l'oléate en TAG et en PL, aucune différence dans l'estérification du palmitate n'a été observée. De plus, les taux d'estérification du palmitate en DAG, TAG et PL mesurés dans les astrocytes ACBP KO dans le cadre de cette étude sont identiques à ceux obtenus lors de notre première étude. Pour confirmer que cette régulation différentielle n'est pas limitée au palmitate et à l'oléate, nous avons évalué l'effet de l'invalidation d'ACBP dans les astrocytes sur l'oxydation d'espèces additionnelles d'acides gras saturés et insaturés, soit le stéarate et l' α -linoléate. Nous montrons une diminution de l'oxydation de l' α -linoléate (C18:3) identique à celle de l'oléate (C18:1), soit une diminution d'environ 40 %. Par contre, l'ablation d'ACBP n'a aucun effet sur l'oxydation du stéarate (C18:0). Il est intéressant de noter que seule la présence d'une insaturation a une incidence sur la régulation de l'oxydation ACBP dépendante des acides gras. La longueur de la chaîne et le nombre d'insaturations (au-delà de 1) n'ont aucune incidence sur l'oxydation ACBP dépendante de ces acides gras. Les mêmes différences, quant à l'oxydation des acides gras saturés vs insaturés, sont aussi observées dans un système d'explants de souris âgées de quatre à cinq semaines. Ceci nous permet en partie d'exclure les différences

potentielles entre les astrocytes périnataux (culture primaire) et adultes (explants) puisque cette régulation persiste après le développement périnatal et surtout après la période de sevrage.

Il est intéressant de noter les différences entre les taux d'oxydation des acides gras insaturés et polyinsaturés. Les taux d'oxydation de l'oléate sont près de 4 fois supérieures à ceux de l' α -linoléate dans notre modèle d'astrocytes primaire. Il est possible que ces acides gras soient utilisés à des fins différentes dans le cerveau et ne soient pas nécessairement voués à la production d'ATP via l'oxydation β . En effet, l' α -linoléate est un précurseur de plusieurs PUFA, il peut ainsi être désaturé puis élongé pour générer différents acides gras ω -3 dont l'EPA et le DHA (Liu et al. 2015). Dans le même ordre d'idée et de façon similaire à nos observations concernant l'oléate et l' α -linoléate, l'EPA est beaucoup plus rapidement oxydé par rapport au DHA, suite à son transport vers le CNS (Chen et al. 2009, Chen and Bazinet 2015). Finalement, les défauts d'oxydation des acides gras insaturés observés dans notre modèle astrocytaire ne peuvent être attribués à une diminution de leur transport, dû à des défauts de liaison des Acyl-CoAs par ACBP, puisque les taux de transport de l'oléate et de l' α -linoléate sont identiques lorsque mesurés dans les astrocytes WT et KO pour ACBP.

La régulation différentielle du métabolisme par ACBP de l'oléate et du palmitate peut être due à plusieurs facteurs. Elle peut être due à une oxydation peroxydomale des acides gras insaturés, comme observée dans l'étude 1 avec l'oléate (l'absence d'inhibition de son oxydation par l'étofoxir, un inhibiteur de CPT1). Elle peut aussi être liée à une différence d'affinité d'ACBP pour ces acides gras en lien avec l'instauration. Finalement, cette différence pourrait être due à une action indirecte d'ACBP sur les enzymes impliquées spécifiquement dans le métabolisme des acides gras insaturés. En effet, l'oxydation β de ces derniers requiert des étapes supplémentaires en raison de la position de la double liaison en relation au carbone ω . L'absence d'ACBP dans la cellule peut potentiellement avoir un effet délétère sur ces enzymes, soit l'énoyl-CoA isomérase, la diénoyl-CoA réductase et la diénoyl-CoA isomérase (Kunau et al. 1995, Hiltunen and Qin 2000). Ceci étant dit, bien que ces aspects puissent expliquer les différences d'oxydation entre les acides gras saturés et insaturés, elle ne peut être invoquée pour expliquer l'estérification préférentielle des acides gras insaturés par l'entremise d'ACBP. Nous nous permettons ainsi d'assumer que l'absence d'ACBP a un effet direct sur le métabolisme oxydatif des acides gras, plutôt qu'indirect via l'activité des isomérases.

Nous montrons ainsi que, dans le cerveau, ACBP est impliqué dans le métabolisme intracellulaire des acides gras insaturés spécifiquement, tant au niveau de leur oxydation que de leur estérification. Nos

résultats sont en accord avec des observations similaires faites chez *C elegans* où l'oxydation de l'oléate et du palmitate est modulée de façon différentielle par l'ablation génique d'ACBP, celle-ci produisant une diminution de l'oxydation de l'oléate, mais une augmentation de l'oxydation du palmitate (Elle et al. 2011). Il est possible que cette augmentation des niveaux d'oxydation du palmitate observé chez le ver soit un effet de la diminution de la production d'ATP à partir de l'oléate. L'absence d'augmentation compensatoire de l'oxydation du palmitate dans nos astrocytes et explants hypothalamiques peut probablement être expliquée par une contribution moins importante des acides gras à la production énergétique de cerveau par rapport au reste du corps.

L'absence de défaut d'oxydation du palmitate dans nos modèles, suite à l'ablation d'ACBP, est contradictoire à une étude récente montrant qu'ACBP est impliqué dans l'oxydation du palmitate et est essentiel à la survie de certains types de cellules cancéreuses pulmonaires (Harris et al. 2014). Cette différence est attribuable à l'utilisation d'un modèle de cellules cancéreuses. Ces dernières peuvent accumuler plusieurs mutations nécessaires au maintien de leurs besoins énergétiques anormalement élevés associé à une prolifération cellulaire élevée. En effet, dans la même étude, l'oxydation β du palmitate mesurée dans les cellules cancéreuses de poumon est deux fois plus élevée que celle des cellules non cancéreuses du même type. De plus, l'invalidation d'ACBP dans les cellules non cancéreuses n'a aucun effet sur l'oxydation β du palmitate, ce qui est en accord avec nos observations sur le rôle d'ACBP dans le métabolisme des acides gras saturés versus insaturés.

Contrairement à ce qui aurait pu être attendu, l'invalidation d'ACBP dans les astrocytes n'est pas accompagnée d'une compensation de son activité de protéine de liaison par FABP7, l'isoforme astrocytaire de la protéine de liaison des acides gras qui a la capacité, quoi que relativement faible, à lier les Acyl-CoAs. Nous observons en fait une diminution de son expression à la fois dans les astrocytes corticaux et hypothalamiques. Bien que l'absence d'ACBP dans les astrocytes entraîne une diminution des taux d'oxydation et d'estérification des acides gras, ces diminutions ne sont observées que pour les acides gras insaturés. De plus, nous observons des taux d'oxydation et d'estérification non négligeables en absence d'ACBP, et ce, même pour les acides gras insaturés. Ceci nous indique que ces processus ne sont pas entièrement dépendants d'ACBP et que certains mécanismes compensatoires puissent entrer en jeu en son absence. Il est possible que d'autres protéines de liaison des acides gras, telles que FABP, soient capables de lier les Acyl-CoA, quoique son affinité pour ceux-ci est beaucoup plus faible qu'ACBP. Il existe aussi d'autres protéines qui possèdent les mêmes

Acyl-CoA Binding Domain qu'ACBP et qui pourraient être impliquées de la même façon dans le métabolisme intracellulaire des Acyl-CoA. Une autre possibilité est que les Acyl-CoA libres, quoi que présent à très faible concentration dans la cellule, soient métabolisés en l'absence d'une protéine de liaison.

Implication du double rôle d'ACBP

Nos observations supportent l'idée qu'ACBP puisse avoir des rôles similaires, quant au métabolisme intracellulaire des lipides, dans le cerveau que dans les tissus périphériques. ACBP est ainsi impliqué dans l'oxydation et l'estérification des acides gras insaturés dans les astrocytes et module les niveaux de certains Acyl-CoA, comme le stéaroyl-CoA, et dans l'accumulation et la sécrétion d'acides gras libres. Ces fonctions intracellulaires s'ajoutent à celles déjà connues dans la modulation des comportements liés à l'anxiété et au comportement alimentaire, impliquant probablement la sécrétion d'ACBP (De Mateos-Verchere et al. 1998, 2001, do Rego et al. 2007). Ce double rôle fait d'ACBP une protéine idéale dans la détection des acides gras insaturés ainsi que dans le contrôle de la prise alimentaire par ces derniers. Il est possible de spéculer qu'ACBP soit impliqué dans la détection des acides gras. En effet, ACBP favorise l'accumulation des Acyl-CoA intracellulaire en les stabilisant et en les protégeant contre l'hydrolyse, ce qui constitue une partie du signal anorexigène. De plus, il est possible que ce signal entraîne la sécrétion et le clivage d'ACBP pour diminuer la prise alimentaire. Les mécanismes de sécrétion d'ACBP, particulièrement *in vivo*, ne sont malheureusement pas bien caractérisés.

Plusieurs signaux sont capables d'induire la sécrétion d'ACBP dans des systèmes de cultures d'astrocytes et sont décrits dans les sections antérieures de cette thèse. Brièvement, ACBP serait sécrété par un mécanisme non conventionnel impliquant les systèmes de l'autophagie en réponse à divers signaux comme l'amyloïde β , le cortisol pour ne mentionner que quelques-uns (Tokay et al. 2005, Loomis et al. 2010, Manjithaya et al. 2010). Un des mécanismes de sécrétion d'ACBP pertinent à notre étude est celui proposé par Manjithaya. Selon lui, ACBP (Acb1 chez la levure) serait sécrété suite à sa liaison à des MCFA dérivés de l'oxydation peroxysomale des LCFA (Manjithaya et al. 2010). Ceci s'accorderait parfaitement avec nos observations sur ACBP dans les astrocytes, son rôle dans le

métabolisme des LCFA insaturés, son action anorexigène via sa sécrétion ainsi que les effets anorexigènes connus des LCFA insaturés (Obici et al. 2002, Schwinkendorf et al. 2011). En effet, nous montrons qu'ACBP est impliqué dans l'oxydation des LCFA insaturés. Nous avons suggéré, dans le cadre de notre première étude, que cette oxydation serait en grande partie effectuée dans le peroxysome. De plus, nous observons une sécrétion prononcée de MCFA, particulièrement l'octanoate, dans nos cultures primaires d'astrocytes, ce qui est possiblement le résultat d'un taux d'oxydation peroxysomal très élevé, tel que suggéré par notre deuxième étude. Finalement, si nous considérons l'effet inhibiteur du glucose sur l'oxydation des acides gras, que nous montrons dans l'étude 1, qui pourrait conduire à leur accumulation intracellulaire sous forme qu'Acyl-CoA, ainsi que la sécrétion potentielle d'ACBP suite à ce signal, il est possible de penser qu'ACBP soit bel et bien impliqué dans la détection des acides gras et leurs effets anorexigènes.

Nous pouvons donc penser qu'ACBP serait à l'intersection de la détection des acides gras insaturés et de leurs effets anorexigènes. Ainsi nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle les LCFA insaturés sont détectés dans l'hypothalamus via leur métabolisme ACBP dépendant dans le peroxysome, ces derniers généreraient des MCFA-CoA qui se lieraient à ACBP induisant leur sécrétion conjointe. Une fois sécrété, ACBP serait clivé en ODN et pourrait diminuer la prise alimentaire via son action sur le récepteur métabotrope d'ODN. Bien que les données générées dans le cadre de cette deuxième étude ne permettent pas d'affirmer la validité de cette hypothèse, nos observations sont compatibles avec cette dernière.

D'autres possibles mécanismes ne requièrent pas nécessairement le métabolisme des lipides peuvent aussi être envisagés pour expliquer la sécrétion ainsi que les différents effets d'ACBP, incluent son action anorexigène. En effet, les Acyl-CoA libres peuvent moduler l'activité de plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides (ACC, l'AMPK, CPT-1, etc.) et dans le métabolisme du glucose (Glucose-6-phosphatase, PDH, etc.) (Knudsen et al. 1999). En se liant à ACBP, la concentration d'Acyl-CoA libre est diminuée et prévient l'inhibition ou l'activation de ces diverses enzymes. Les Acyl-CoA, particulièrement les LCFA-CoA, peuvent agir en tant que molécules signalétiques. Dans les cellules β -pancréatiques, l'accumulation de LCFA-CoA active la protéine kinase C et a pour effet de potentialiser la sécrétion d'insuline (Yaney et al. 2000). Nous avons montré que les astrocytes hypothalamiques sont similaires aux cellules β -pancréatiques en ce qui concerne la détection des nutriments et le couplage métabolique des acides gras et du glucose. Ainsi, il est possible que les

effets anorexigènes d'ACBP dans le CNS soient le résultat d'un mécanisme de signalisation impliquant l'activation de la protéine kinase C similaire aux cellules β . Ceci est corroboré par une étude récente montrant que l'inhibition de cette kinase dans les neurones POMC augmente la prise alimentaire et la susceptibilité à développer l'obésité suite à la consommation de diètes riche en gras (Dorfman et al. 2017). De plus, nos données montrent que l'ablation d'ACBP dans les astrocytes hypothalamiques modifie le profil d'acides gras intracellulaire ainsi que sécrété par ces derniers. Cette altération de la sécrétion d'acides gras par les astrocytes pourrait ainsi avoir des effets sur l'activité neuronale.

Ceci pourrait être compatible avec une étude relativement récente montrant que l'oléate active les neurones POMC anorexigènes de l'ARC et que son oxydation, mais pas l'ATP générée par cette oxydation, est nécessaire à l'activation de ces neurones (Jo et al. 2009). Les auteurs suggèrent qu'un mécanisme signalétique serait impliqué. Finalement, une étude plus récente suggère que la synthèse *de novo* de céramides dans l'hippocampe à partir d'acides gras est associée à une diminution des dépenses énergétiques (Picard et al. 2014). Bien que nous n'ayons pas mesuré les niveaux de céramides ou de leur synthèse dans notre modèle d'astrocytes ACBP KO, nous observons une augmentation dans l'hypothalamus, mais pas dans le cortex, de l'expression des différentes enzymes impliquées dans leur synthèse. Nos observations sur l'effet de l'inactivation d'ACBP sur la synthèse des céramides ainsi que celles de (Picard et al. 2014) seraient compatibles avec l'hypothèse du contrôle de la prise alimentaire et des dépenses énergétiques par ACBP en réponse à la détection des acides gras insaturés.

Ainsi, l'ensemble des résultats de cette deuxième étude suggère qu'ACBP a un double rôle dans le SNC en montrant son implication dans le métabolisme intracellulaire des acides gras insaturés. Ce nouveau rôle s'ajoute à ceux déjà décrits en tant que peptide sécrété capable de moduler la transmission GABAergique via le récepteur GABA_A, une fonction que j'ai aussi évalué, en collaboration avec Lionel Budry postdoctorant dans le laboratoire, dans le cadre d'une étude qui sera décrite en annexe (Budry et al. 2016). L'implication d'ACBP dans le métabolisme intracellulaire dans le CNS est accentuée par le fait que la détection des acides gras dans l'hypothalamus implique leur métabolisme intracellulaire. Ceci pourrait suggérer un rôle d'ACBP dans leur détection ainsi que dans leurs effets anorexigènes. Ceci est d'autant plus intéressant si l'on considère que plusieurs ont déjà suggérés que la sécrétion et le clivage en ODN d'ACBP est un signal anorexigène puissant chez le rongeur. C'est ces deux rôles possiblement complémentaires d'ACBP qui nous ont ainsi poussés à évaluer son

implication potentielle dans le contrôle de la prise alimentaire et du métabolisme énergétique *in vivo*, particulièrement en réponse à la consommation de nourriture riche en acides gras.

Étude 3

Le contrôle de la prise alimentaire, la balance énergétique et de l'homéostasie du glucose par l'hypothalamus médiobasal sont des processus finement régulés. Cette régulation implique la détection et intégration de signaux hormonaux et nutritionnels résultants en l'activation de populations neuronales de l'ARC, soit les neurones orexigènes NPY et anorexigènes POMC (Myers and Olson 2012). La détection des acides gras dans le MBH est un élément essentiel du contrôle de l'homéostasie du glucose et des défauts dans ce processus sont associés à une dérégulation de l'homéostasie du glucose (Lam, Pocai, et al. 2005, Pocai et al. 2006). De plus, comme mentionné plusieurs fois, les effets centraux anorexigènes des lipides ne sont observés qu'avec des acides gras insaturés (Obici et al. 2002, Schwinkendorf et al. 2011). Ceci est corroboré par l'activation des neurones POMC dans l'ARC uniquement par l'oléate (acide gras insaturé) par rapport à l'octanoate (acide gras saturé) (Jo et al. 2009).

Dans le cerveau, ACBP, via son clivage en ODN, est impliqué dans la régulation de la prise alimentaire ainsi que dans le contrôle de l'homéostasie du glucose en périphérie (de Mateos-Verchere et al. 2001, Compere et al. 2003, Lanfray et al. 2013). En plus de ces effets en tant que peptide sécrété par les cellules gliales, ou gliotransmetteur, nous avons montré dans le cadre la deuxième étude qu'ACBP est aussi impliqué dans le métabolisme intracellulaire des acides gras insaturés.

Ce double rôle dans le cerveau place ACBP à l'intersection de deux voies de signalisation distinctes impliquées dans le contrôle hypothalamique de la prise alimentaire et le contrôle de l'homéostasie du glucose en périphérie. ACBP pourrait ainsi, via son double rôle dans l'hypothalamus, être impliqué dans la réponse anorexigène aux acides gras insaturés via son action en tant que gliotransmetteur sur la prise alimentaire et l'homéostasie du glucose suite à leur métabolisme intracellulaire par ce dernier. C'est cette hypothèse qui nous a conduits à l'élaboration de cette troisième étude menant à la publication potentielle d'un troisième article. L'objectif de cette troisième étude est ainsi de déterminer premièrement si ACBP astrocytaire est impliqué dans la régulation de la balance

énergétique, via une action sur la prise alimentaire et sur les dépenses énergétiques, et deuxièmement si ACBP est capable d'activer les neurones anorexigènes de l'ARC et les mécanismes potentiellement impliqués dans cette activation.

Pour répondre à ces différentes questions, nous ne pouvions pas utiliser nos souris ACBP Lox pour plusieurs raisons. Ces souris ont des défauts dans l'intégrité de leur barrière épidermique, ce qui entraîne une augmentation des dépenses énergétiques due à une perte de chaleur par la peau (Neess et al. 2013). Cette modulation des dépenses énergétiques due à la perte de chaleur peut potentiellement masquer toute modulation de la balance énergétique par ACBP dans le cerveau. En effet, des données non publiées de notre laboratoire montrent que ces souris sont résistantes aux diètes obésogènes riches en gras dû à cette perte de chaleur. De plus, nous avons besoin d'un modèle d'inactivation d'ACBP spécifiquement au niveau du cerveau pour pouvoir différencier son action centrale de son action en périphérie.

Nous avons choisi de nous focaliser sur le rôle d'ACBP dans les astrocytes pour les mêmes raisons qui nous ont conduits à utiliser les cultures primaires d'astrocytes lors de la deuxième étude. Les cellules gliales sont les principales cellules capables de métaboliser les acides gras dans le cerveau et les niveaux d'expression d'ACBP sont les plus élevés dans ce type cellulaire. De plus, les études portant sur la sécrétion d'ACBP chez les mammifères montrent que ce dernier est sécrété par les cellules gliales (Tokay et al. 2005, Masmoudi-Kouki et al. 2006, Qian et al. 2008, Tokay et al. 2008, Loomis et al. 2010). Finalement, les astrocytes sont de plus en plus reconnus pour leurs rôles dans la détection des nutriments ainsi que dans la régulation de la prise alimentaire et de la balance énergétique (Argente-Arizon et al. 2015). Finalement, l'activation des astrocytes dans l'hypothalamus est capable de moduler directement l'activité de neurones dans l'ARC, résultant en une modulation de la prise alimentaire (Yang et al. 2015, Chen et al. 2016).

La plupart des études clés sur les fonctions d'ACBP dans le cerveau ont été effectuées avant l'apparition des premières souris ACBP KO en 2007 (Lee et al. 2007, Landrock et al. 2010, Neess et al. 2011). Ces études sont toutes basées sur une approche pharmacologique via l'administration d'ACBP, de ses produits de clivages ou de ses agonistes et antagonistes. Des études plus récentes se sont aussi penchées sur l'implication d'ACBP et d'ODN sur la prise alimentaire et les comportements associés à l'anxiété ont, elles aussi, utilisé principalement ces mêmes approches.

Nous avons ainsi utilisé les souris ACBP Flox, développé par nos collaborateurs (Neess et al. 2013), qui ont été croisées avec des souris exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur GFAP (GFAP-Cre) pour produire invalider ACBP spécifiquement dans les astrocytes exprimant le marqueur GFAP. L'utilisation d'un modèle d'inactivation d'ACBP dans les astrocytes nous permet ainsi d'évaluer pour la première fois l'implication de la protéine endogène dans ces différents processus. De plus, cette approche a l'avantage de nous permettre d'évaluer l'influence de cette protéine sur la prise de poids à long terme chez les souris, chose qui serait impossible ou difficilement réalisable avec une approche pharmacologique.

Nous avons aussi mis à profit l'expertise en électrophysiologie de nos collaborateurs en France dans le but de déterminer par quel mécanisme ACBP agit pour moduler la prise alimentaire. L'utilisation de ces modèles *ex vivo* nous permet d'identifier les populations neuronales qui sont potentiellement activées par ODN. Ces techniques nous permettent aussi d'identifier les mécanismes potentiels par lesquels ces neurones sont activés.

Selon certains, ACBP dans le CNS serait principalement exprimé dans les cellules gliales ainsi que dans les épendymocytes et tanocytes bordant les ventricules (Lanfray et al. 2013), d'autres données suggèrent qu'ACBP est aussi exprimé dans certaines populations neuronales (Alho et al. 1985). Ainsi nous avons vérifié l'efficacité et l'étendue de l'ablation d'ACBP dans notre modèle d'inactivation astrocyte-spécifique de ce dernier. Nous observons, à la fois en immunohistochimie et par qPCR, une expression résiduelle d'ACBP dans le MBH de souris ACBP KO. Bien que nous ne puissions pas identifier la source de l'expression résiduelle d'ACBP observée par qPCR, les niveaux d'ACBP dans les souris KO correspondent aux différences d'expression relative entre des cultures primaires d'astrocytes et de neurones. L'absence d'expression d'ACBP dans les cellules GFAP positives ainsi que dans les tanocytes et épendymocytes, telle qu'observée par immunohistochimie, suggère que notre stratégie d'inactivation est bel et bien efficace et spécifique.

Implication d'ACBP dans le métabolisme énergétique chez la souris

Avant de pouvoir discuter des effets de l'inactivation d'ACBP sur la prise alimentaire et le métabolisme énergétique, il était important d'évaluer l'impact de cette inactivation sur les

comportements liés à l'anxiété. En effet, une des fonctions connues d'ODN, peptide issu du clivage extracellulaire d'ACBP, est son action anxiogène via le récepteur GABA_A et comme inhibiteur de la liaison des benzodiazépines sur ce dernier. Ainsi ACBP et ODN sont aussi connus respectivement en tant que « Diazepam Binding Inhibitor » et « Anxiety Peptide ». Le diazépam et autres agonistes du récepteur GABA_A peuvent augmenter la prise alimentaire (Naruse 1994, Soderpalm and Berridge 2000), l'ablation d'un inhibiteur endogène de ce récepteur pourrait être un facteur confondant sur la prise alimentaire dans notre étude. Nous avons ainsi voulu déterminer si l'invalidation astrocytaire d'ACBP avait une incidence sur les comportements liés à l'anxiété. Ceci m'a conduit à participer au projet de Lionel Budry sur les effets de l'ablation d'ACBP sur les comportements liés à l'anxiété ainsi que sur la réponse au diazépam. Une partie des données de cette étude seront présentées en annexe, brièvement, nous n'avons pas observé de modulation dans les comportements anxieux chez les souris ACBP KO (total ou spécifiquement dans les astrocytes). Ceci simplifie donc la discussion des résultats obtenus lors de l'étude 3, particulièrement les données sur la prise alimentaire.

L'invalidation astrocytaire d'ACBP ne semble pas avoir d'effets majeur sur la prise alimentaire et le gain de poids lorsque les animaux sont nourris avec une diète régulière. Malgré la diminution de leurs dépenses énergétiques, les souris déficientes en ACBP astrocytaire ont uniquement une augmentation de gain de poids modérée. C'est uniquement sous une diète riche en gras que l'invalidation d'ACBP a un effet sur le gain de poids. Cette augmentation semble être principalement expliquée par une augmentation de la prise alimentaire. Celle-ci est aussi accompagnée d'une augmentation dans la masse grasse, principalement composée de gras sous-cutané. Les souris KO nourries sur diète riche en gras ont en plus une diminution modérée de leur activité locomotrice, qui est probablement secondaire à leur poids. De plus, ces souris ont une plus faible tolérance au glucose durant les 60 premières minutes du test. Étant donné les niveaux d'obésité des souris KO, de l'augmentation significative de leur masse grasse, nous nous serions attendus à une sévère intolérance au glucose. Par contre, le fait que l'augmentation de la masse grasse soit principalement due à une accumulation de gras sous-cutané peut fort probablement expliquer l'absence d'intolérance plus sévère. En effet, les complications liées à l'obésité les plus sévères sont souvent associées à une accumulation de gras intrapéritonéal. Le lien entre le tonus endozépinergique central et la tolérance au glucose a déjà été proposé par d'autres (Lanfray et al. 2013). Bien que cette association s'accorde avec le phénotype de nos souris, augmentation de la prise alimentaire et de poids sur diète riche en gras, il serait nécessaire d'effectuer ces mêmes testes de tolérances au

glucose avant le gain de poids ou sur une diète régulière pour déterminer si cette légère intolérance est secondaire à l'obésité chez nos souris. Cette augmentation transitoire de la glycémie est probablement causée par un défaut dans la première phase de sécrétion d'insuline.

Le fait que l'augmentation du gain de poids ne soit observée qu'avec une diète riche en gras suggère qu'ACBP astrocytaire soit impliqué dans la réponse anorexigène des acides gras dans le cerveau. Ces derniers peuvent agir au niveau de l'hypothalamus pour diminuer la prise alimentaire en plus d'augmenter la sensibilité à l'insuline (Obici et al. 2002, Lam, Pocai, et al. 2005), deux paramètres qui sont affectés négativement par l'ablation astrocytaire d'ACBP dans un modèle de souris sur diète riche en gras. Une combinaison de ces deux facteurs, réponse centrale aux acides gras ainsi que de la détection du glucose, est probablement en cause pour l'augmentation de la prise alimentaire conduisant au gain de poids chez ces souris. Des études sont en cours afin de déterminer l'impact de la détection des acides gras et du glucose dans l'augmentation de la prise alimentaire chez les souris KO. Pour ce faire, je compare l'effet anorexigène d'une injection ICV d'oléate ou de glucose chez les souris WT aux mêmes injections faites chez les souris KO. Ainsi, une perte de l'effet anorexigène de l'un ou l'autre de ce nutriment serait une indication de son implication dans le phénotype observé.

De façon intéressante, une autre étude, utilisant des souris MC4R KO, montre une intolérance au glucose mesurée uniquement dans les 60 premières minutes d'un test de tolérance au glucose. Les auteurs concluent que cette intolérance au glucose est indépendante du poids de l'animal et serait due à des défauts de signalisation dans la voie des mélanocortines (Arble et al. 2015). Ceci est similaire au phénotype de nos souris où l'augmentation de la glycémie chez les KO observée uniquement dans les 60 premières minutes du test. De plus, l'augmentation de la masse grasse de nos souris n'est probablement pas la cause de cette légère intolérance puisque nous n'observons pas d'augmentation dans le gras intrapéritonéal, généralement associé aux désordres métaboliques, mais plutôt du gras sous-cutané.

Action via la voie des mélanocortines

Les neurones POMC de l'ARC sont une population de neurones anorexigènes qui, via l'activation de la voie des mélanocortines, peut moduler la prise alimentaire et la production hépatique du glucose en

réponse à divers signaux hormonaux et nutritionnels, tels le glucose et les acides gras (Myers and Olson 2012). Bien que l'action anorexigène de l'endozépine ODN soit relativement bien décrite, les mécanismes par lesquels ce peptide agit sur la prise alimentaire sont moins bien compris. Une possibilité est que ce dernier active les neurones POMC dans l'ARC pour ainsi moduler la prise alimentaire (Compere et al. 2003, Matsuda et al. 2010).

C'est dans ce contexte que nous avons testé les effets de l'administration centrale d'ODN sur des souris MC4R KO. L'effet anorexigène d'une administration ICV d'ODN observé chez des souris WT est complètement absent chez des souris MC4R KO. Ceci suggère que le peptide ODN agit en amont de ce récepteur. Les augmentations de l'activité locomotrice ainsi que du quotient respiratoire observées suite à l'injection ICV d'ODN chez les souris WT sont similaires à ce que d'autres groupes ont observé suite à une activation des neurones POMC de l'ARC (Berglund et al. 2012). L'abolition complète de ces effets d'ODN chez les souris MC4R KO renforce l'hypothèse selon laquelle l'action de ce peptide est médiée par l'activation de la voie des mélanocortines. De façon intéressante, l'action centrale d'ODN ne semble pas avoir d'effet sur les dépenses énergétiques, une conséquence bien connue de l'activation de la voie des mélanocortines par les neurones POMC de l'ARC (Ste Marie et al. 2000, Myers and Olson 2012). L'absence d'une augmentation des dépenses énergétiques par ODN est similaire à ce qui a été observé par les groupes d'Elmqvist et de Lowell. Ces derniers observent que la réactivation des neurones POMC dans le PVN diminue la prise alimentaire, mais n'affecte pas les dépenses énergétiques. Ils proposent ainsi que la régulation du métabolisme énergétique est modulée par une population distincte des neurones MC4R du PVN (Balthasar et al. 2005). Ceci pourrait vouloir dire qu'ODN est capable d'activer spécifiquement les neurones MC4R du PVN via les neurones POMC de l'ARC. Une autre possibilité est que la quantité d'ODN que nous avons administré lors de cette étude ne soit pas suffisante pour activer ces neurones à l'extérieur du PVN. De plus, puisque notre administration par ICV n'est pas limitée au MBH, il est possible qu'ODN ait des effets antagonistes sur les dépenses énergétiques à des sites extrahypothalamiques.

Bien que la voie des mélanocortines semble être essentielle à l'action d'ODN, particulièrement sur la prise alimentaire, ces observations ne sont pas suffisantes pour nous permettre de conclure que ce dernier active de façon directe les neurones POMC de l'ARC. En effet, le peptide ODN fait partie d'une classe de molécules, les endozépines, capables de moduler l'action de CBR au niveau du récepteur GABA_A, d'où elles dérivent leur nom : modulateur **endogène** du récepteur des benzodiazépines. Nos

données d'enregistrements électrophysiologiques sur les explants de souris POMC-eGFP montrent qu'ODN diminue les courants inhibiteurs spontanés, ou sIPSC, sur l'ensemble des neurones ayant été enregistrés montrent qu'ODN agit en tant que NAM du récepteur GABA_A dans l'ARC. Ceci est en accord avec d'autres observations sur cette protéine et son peptide dérivé (Alfonso et al. 2012). Cette inhibition des sIPSC par ODN serait le résultat d'une inhibition du récepteur GABA_A ou d'une action en tant que NAM dans cette région de l'hypothalamus.

Malgré cette diminution généralisée des courants inhibiteurs ou sIPSC dans l'ARC, seuls les neurones POMC sont activés par ODN, tel que mesuré par l'augmentation de la fréquence des AP dans les mêmes conditions d'enregistrement. Ceci indique que l'action en tant que NAM du récepteur GABA_A de ce peptide n'est pas suffisante pour induire une activation de tous les neurones de l'ARC, bien que cela n'exclue pas la possibilité qu'elle ait un rôle permissif à l'activation des neurones POMC. Il serait ainsi possible que l'activation des neurones POMC par ODN soit le résultat de la combinaison d'un signal activateur provenant d'un autre neurone de l'hypothalamus, possiblement via le neurotransmetteur activateur glutamate, ainsi que d'un tonus inhibiteur diminué par la liaison d'ODN sur les récepteurs GABA_A des neurones POMC. L'inhibition des courants inhibiteurs (récepteurs GABA_A) et activateurs (glutamate, via les récepteurs de type NMDA et AMPA/Kainate) n'a pas d'effet net sur l'activation des neurones POMC de l'ARC. L'addition d'ODN dans ces conditions où les courants inhibiteurs et excitateurs sont inhibés reste efficace pour activer les neurones POMC. Ceci suggère qu'ODN agit directement sur les neurones POMC de façon indépendante du récepteur GABA_A résultant en leur activation.

Cette activation directe de ces neurones impliquerait potentiellement l'existence d'un récepteur membranaire d'ODN distinct des récepteurs GABA_A et glutamate. Effectivement, le groupe de Vaudry et Tonon a montré qu'ODN est capable d'activer un récepteur de type GPCR et a synthétisé un antagoniste de ce récepteur (Patte et al. 1995, Leprince et al. 1998). Nous avons mis à profit cet antagoniste du récepteur GPCR d'ODN pour évaluer son implication dans l'activation neuronale induite par ODN. En utilisant un modèle de neurones hypothalamiques dissociés dans lequel l'activation neuronale est mesurée via l'élévation du calcium intracellulaire, nous montrons que l'activation de ces neurones par ODN est diminuée en présence de l'antagoniste de son récepteur. Contrairement aux enregistrements électrophysiologiques, nous ne pouvons conclure sur l'identité des neurones activés par ODN, et par le fait même inhibés par l'antagoniste. Par contre, le

pourcentage de neurones activés, soit d'environ 10 %, est relativement similaire au pourcentage de neurones POMC dans le MBH. De plus, lorsque l'on considère que seuls les neurones POMC étaient activés par ODN dans les explants hypothalamiques, il est tentant de conclure que les neurones dissociés sensibles à ODN et à son antagoniste sont des neurones POMC. De façon intéressante, l'administration ICV de l'antagoniste suggère que les effets anorexigènes d'ODN seraient médiés par l'activation de ce récepteur (do Rego et al. 2007). Ceci supporte parfaitement nos données montrant une activation spécifique des neurones POMC de l'ARC par ODN via un mécanisme indépendant du récepteur GABA_A, mais requérant l'activation d'un GPCR.

Nos conclusions sur l'activation des neurones POMC via l'activation d'un récepteur de type GPCR reposent sur les données utilisant l'antagoniste synthétique d'ODN. Cet antagoniste a été synthétisé à partir du peptide OP, formé des 8 derniers acides aminés d'ODN (voir Figure 10). Les peptides ODN et OP, en plus d'agir sur leur GPCR, sont des NAM du récepteur GABA_A. Il est donc difficile de conclure avec certitude que l'activation des neurones POMC par ODN est GABA_A indépendante et est entièrement médiée par l'activation de ce GPCR. Par contre, l'inhibition des signaux activateurs (glutamate) et inhibiteurs (GABA) dans nos enregistrements électrophysiologiques nous permet de déterminer que l'activation des neurones POMC par ODN ne requiert pas le récepteur GABA_A.

Nos données suggèrent qu'ODN active spécifiquement les neurones POMC dans l'ARC. Cette conclusion ne se limite qu'à cette région de l'hypothalamus. Avec les stratégies que nous avons employées dans cette étude, nous ne pouvons pas exclure une activation ou inhibition par ODN d'autres neurones dans d'autres noyaux hypothalamiques et/ou non-hypothalamiques.

Modulation de l'activité des neurones de l'ARC par les astrocytes

Nos observations s'ajoutent à plusieurs autres études sur le rôle grandissant des astrocytes hypothalamiques dans la détection des nutriments ainsi que dans la régulation de l'appétit et de la prise alimentaire (Argente-Arizon et al. 2015, Chowen et al. 2016). En lien avec notre hypothèse, de récentes études ont montré que les astrocytes hypothalamiques sont capables de moduler l'activité des neurones de l'ARC pour moduler la prise alimentaire via la relâche de divers gliotransmetteurs. Ces derniers peuvent activer les neurones AgRP/NPY via la mobilisation de leurs réserves de Ca⁺⁺

intracellulaire, résultant en une augmentation de la prise alimentaire, inversement, la perturbation de cette activation produit l'effet inverse (Chen et al. 2016). Une autre étude montre que les astrocytes hypothalamiques peuvent inhiber la prise alimentaire en inhibant cette même population de neurones AgRP/NPY via la relâche d'un gliotransmetteur inhibiteur, l'adénosine (Yang et al. 2015). Les conclusions de ces deux études supportent le concept général de mon projet proposant qu'ODN soit un gliotransmetteur sécrété par les astrocytes hypothalamiques capables d'activer les neurones POMC de l'ARC pour moduler la prise alimentaire. Ainsi, ces astrocytes hypothalamiques peuvent moduler la prise alimentaire via la sécrétion de différents gliotransmetteurs ciblant sur les neurones orexigènes et anorexigènes de l'ARC. Contrairement à nos observations, ces deux études montrent uniquement une action sur la prise alimentaire via les neurones orexigènes AgRP/NPY.

Nos stratégies *in vivo*, à la fois d'inactivation astrocytaire d'ACBP ainsi que d'administration centrale d'ODN par injection ICV sont des stratégies qui touchent le cerveau dans son ensemble. Nous avons émis l'hypothèse que les astrocytes de l'hypothalamus, via leur action sur les neurones POMC, sont responsables du phénotype de nos souris KO. Cependant l'inactivation via la recombinaise cre sous le contrôle du promoteur GFAP va entraîner l'ablation d'ACBP dans tous les astrocytes du cerveau ainsi que dans les tanocytes bordant les parois du troisième ventricule dans l'hypothalamus. De plus, étant donné l'implication d'ACBP dans la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices de la SVZ (Alfonso et al. 2012), il est possible que son absence dans les astrocytes et leurs progéniteurs durant le développement embryonnaire et postnatal puisse être un facteur contribuant au phénotype de nos souris.

Pour déterminer le rôle spécifique d'ACBP dans le MBH dans la régulation de la prise alimentaire et l'homéostasie énergétique en réponse à la consommation de diètes riches en gras, il serait pertinent d'utiliser une approche d'inactivation par l'administration virale de la recombinaise cre chez des animaux adultes. Une telle approche permettrait d'exclure les effets développementaux comme explication du phénotype observé chez nos souris. De plus, cela permettrait de déterminer si l'absence d'ACBP dans l'hypothalamus, plus précisément dans les astrocytes du MBH, est suffisante pour induire la prise de poids chez les souris. Cela nous permettra aussi d'exclure tout effet de la modulation de la transmission GABAergique ou via le récepteur GPCR d'ODN dans le reste du CNS. Ces différents outils viraux pour invalider et surexprimer ACBP dans les astrocytes sont disponibles dans le laboratoire. Je suis aussi impliqué dans la validation de ces outils, notamment quant à la

spécificité du promoteur sélectionné ainsi que l'efficacité de la recombinaison et de la surexpression d'ACBP.

Les résultats présentés dans le cadre de la troisième étude confirment le rôle anorexigène d'ACBP dans les astrocytes et sur la régulation des dépenses énergétiques. Notre approche se distingue de celle des autres groupes étudiant les effets d'ACBP et d'ODN sur la prise alimentaire et l'homéostasie énergétique puisqu'elle n'implique pas uniquement des approches de type pharmacologique (administration par injection ICV d'ODN ou de divers agonistes et antagonistes). Nous utilisons différents modèles d'inactivation génique (MC4R KO et ACBP KO astrocytaire) pour montrer la perte des effets d'ODN exogène ainsi que des rôles d'ACBP *in vivo* sur l'homéostasie énergétique. De plus, nous explorons les effets de la consommation de nourriture riche en gras sur les effets centraux d'ACBP. Nous montrons ainsi qu'ACBP, dans le CNS, a la capacité d'agir en tant que gliotransmetteur pour moduler l'activité des neurones POMC de l'ARC via un récepteur membranaire de type GPCR, et ce, particulièrement en réponse à la consommation de nourriture riche en gras.

Conclusion et perspectives

Conclusion

Le contrôle de la prise alimentaire et des dépenses énergétiques est une des fonctions clés de l'hypothalamus médiobasal, particulièrement dans l'ARC. Le bon fonctionnement de ces mécanismes dépend largement de la capacité de l'ARC à évaluer le statut nutritionnel de l'organisme et surtout de pouvoir apporter les correctifs requis au maintien de la balance énergétique. Ceci a amené plusieurs chercheurs à proposer l'existence de mécanismes de détection des nutriments et des hormones dans cette structure de l'hypothalamus incluant l'hypothèse lipostatique de Kennedy (Kennedy 1953) et l'hypothèse gluco-statique de Mayer (Mayer 1953, 1955). La détection du glucose et des acides gras, les deux types de nutriments principaux du corps, doivent être adéquatement évalués pour assurer une bonne régulation de la balance énergétique. Des perturbations dans la détection de ces nutriments peuvent ainsi entraîner des conséquences métaboliques importantes incluant l'obésité et le diabète de type 2.

Ainsi, dans un environnement où la consommation de diètes riches en gras, particulièrement les acides gras saturés, et en sucre est de plus en plus élevée, il est essentiel de bien comprendre les mécanismes et les types cellulaires impliqués dans leur détection. Le métabolisme des acides gras et du glucose ne peuvent être étudiés de façon séparée, effectivement la dégradation de ces deux substrats, glycolyse pour le glucose et oxydation β pour les acides gras, produit le même substrat oxydé dans le cycle TCA, soit l'Acétyl-CoA. Des études dans la cellule β ont montré que le métabolisme oxydatif des acides gras et du glucose sont couplés et que ce couplage exerce une fonction importante dans la détection de ces derniers. L'excès de glucose entraîne une diminution de l'oxydation des acides gras et son absence (ou faibles concentrations) est permissive à l'utilisation des acides gras comme substrat alternatif au glucose.

Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse mettent en lumière plusieurs aspects de la détection et du métabolisme des acides gras dans le cerveau et du développement de l'obésité associée à des défauts dans ces différents paramètres. En premier lieu, nous avons mis en évidence l'existence d'un couplage métabolique entre le glucose et les acides gras dans le cerveau. Ce couplage est observé dans l'hypothalamus, une région fortement associée à la détection des nutriments, mais pas dans le cortex. Nous mettons en évidence l'implication du senseur métabolique AMPK dans ce

couplage et que ce dernier dépend aussi du type d'acide gras. De plus nous observons ce couplage dans les deux types cellulaires principaux du cerveau, soit les cellules neuronales et les cellules gliales. De plus, nous confirmons le fait que les acides gras sont oxydés principalement dans les astrocytes.

Par la suite, nous avons démontré que le métabolisme central des acides gras, tout comme en périphérie, est en partie régulé par ACBP. De plus, nous montrons que le métabolisme des acides gras saturés et insaturés est régulé de façon différentielle par ACBP. Nous montrons cet effet différentiel en employant quatre acides gras saturés et insaturés, dont trois ayant la même longueur de chaîne et différenciée uniquement par le nombre d'insaturations. Finalement, nous observons un effet d'ACBP sur le profil d'acides gras libre intracellulaire ainsi que sur le profil d'acides gras sécrété par les astrocytes hypothalamiques.

En troisième lieu, nous avons mis en évidence l'implication d'ACBP astrocytaire dans la régulation *in vivo* de la balance énergétique, et par conséquent sur le développement de l'obésité, par les astrocytes en réponse aux diètes riches en gras. Nous avons par la suite montré qu'ACBP agit en tant que gliotransmetteur, via sa sécrétion et son clivage en ODN par les astrocyte pour moduler la prise alimentaire via la voie des mélanocortines. Nous avons, de plus, mis en évidence un mécanisme d'activation spécifique des neurones POMC de l'ARC par ODN. Finalement, nous montrons que l'activation de ces neurones par ODN n'est pas une conséquence de l'inhibition de la transmission GABAergique, mais nécessite l'activation, par ODN, d'un GPCR sur les neurones POMC.

Ainsi, nos travaux mettent en lumière divers mécanismes de régulation du métabolisme des acides gras dans le CNS et particulièrement dans le MBH. D'une part, le métabolisme oxydatif des acides gras est régulé par la disponibilité du glucose via des mécanismes impliquant une activation de l'AMPK. Bien que ce couplage entre le métabolisme des acides gras et du glucose soit observé à la fois dans les neurones et les cellules gliales, il semble être spécifique à l'hypothalamus, une région fortement impliquée dans la régulation de la balance énergétique. D'autre part, nos travaux démontrent l'importance de la protéine ACBP astrocytaire dans le métabolisme des acides gras insaturés, suggérant un rôle potentiel d'ACBP dans la détection hypothalamique des acides gras. Finalement, nous démontrons qu'ACBP est impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire et de l'homéostasie énergétique en réponse à la consommation de nourriture riche en gras via l'activation de neurones POMC via un récepteur de type GPCR.

Ces différentes données nous permettent d'émettre une hypothèse selon laquelle ACBP est un médiateur des effets centraux des acides gras insaturés dans l'hypothalamus, particulièrement leurs effets sur la prise alimentaire. Ceci nous amène à proposer un modèle de modulation de la prise alimentaire suite à la détection centrale des acides gras. Nous proposons ainsi que l'augmentation postprandiale du niveau sanguin de TAG, se traduisant par une augmentation du transport d'acides gras libre vers le CNS soit détectée dans le MBH. La détection de ces acides gras serait dépendante de leur métabolisme intracellulaire, qui est régulé à la fois par le glucose et ACBP, se traduirait par la sécrétion d'ACBP sous forme d'ODN et par l'activation subséquente des neurones anorexigènes POMC, entraînant une diminution de la prise alimentaire et une augmentation des dépenses énergétiques via l'activation de la voie de la mélanocortine. Ce modèle proposé est résumé dans la Figure 14.

Plusieurs aspects proposés dans ce modèle ne sont pas adressés dans le cadre de cette thèse. Bien que nous proposons que la détection hypothalamique des acides gras insaturés via leur métabolisme soit un signal induisant la sécrétion d'ACBP, nous ignorons si le métabolisme des acides gras est impliqué dans la sécrétion d'ACBP. De plus, le mécanisme par lequel il est sécrété n'est toujours pas identifié. Malgré nos données *ex vivo* et *in vivo*, nous ne montrons pas de façon définitive que l'invalidation d'ACBP astrocytaire entraîne une diminution de l'activation de la voie des mélanocortines. Finalement, il est important de noter que l'identité du récepteur de type GPCR d'ODN n'a pas encore été déterminée.

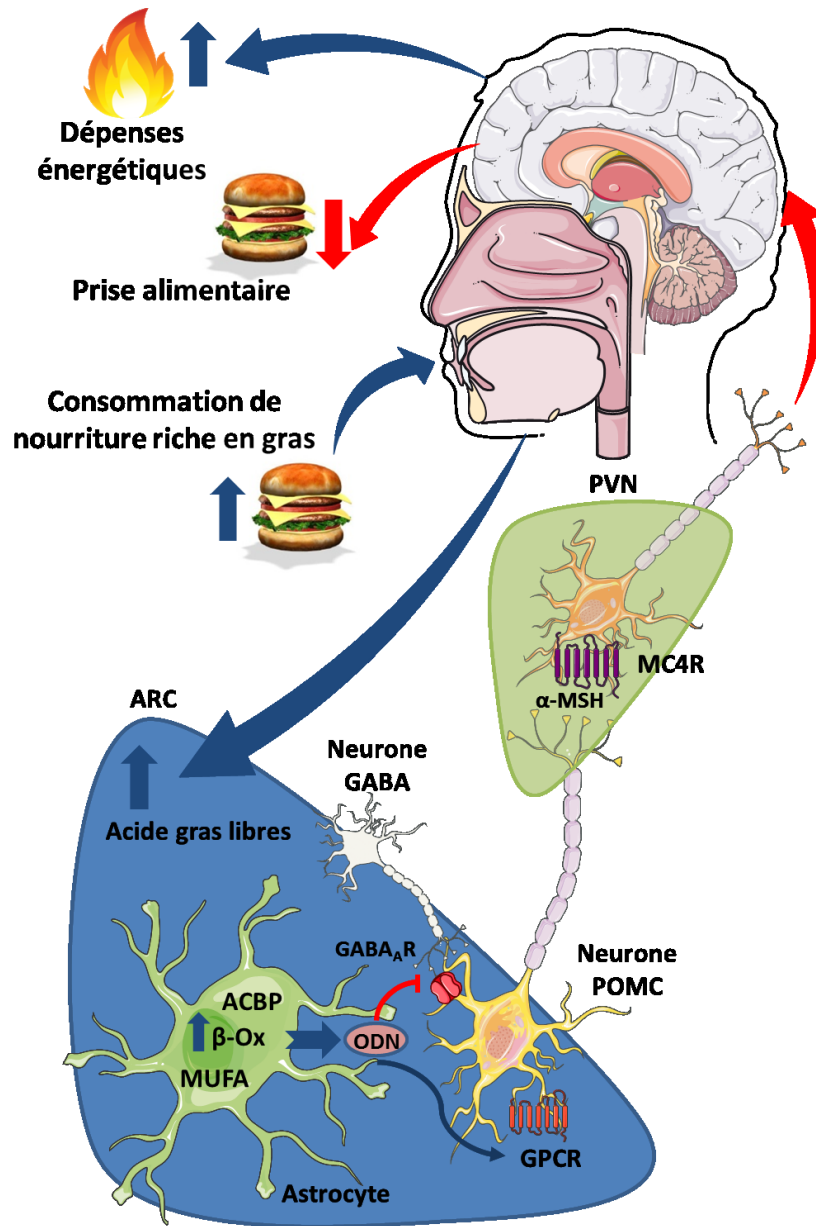


Figure 14 : Modèle proposé d'une régulation du métabolisme énergétique par ACBP.

La consommation de nourriture riche en gras produit une augmentation des niveaux d'acides gras insaturés qui est détectée par les astrocytes hypothalamiques, possiblement via leur métabolisme par ACBP. Ceci entraînerait une sécrétion et le clivage d'ACBP en ODN qui pourrait agir sur les neurones POMC, à la fois sur le récepteur GABA_A, pour prévenir leur inhibition, ainsi que sur son récepteur GPCR. L'activation subséquente des neurones POMC dans l'ARC entraîne une réponse anorexigène via l'activation des neurones MC4R du PVN par la sécrétion d' α -MSH.

Bien que la modulation de la prise alimentaire et l'homéostasie du glucose par les acides gras au niveau central ne soit pas un nouveau concept, il restait jusqu'à ce jour plusieurs éléments inconnus dans ce processus. Sans répondre à toutes ces interrogations, nous avons mis en lumière un mécanisme impliquant une détection astrocytaire des acides gras qui activent, via le gliotransmetteur ODN, les neurones POMC et la voie des mélanocortines pour ainsi moduler la prise alimentaire et l'homéostasie énergétique. De plus, nos travaux ouvrent la porte à l'identification de nouvelles cibles potentielles pour le traitement pharmacologique de l'obésité ainsi que des troubles qui y sont associés.

Perspectives

Bien que nos travaux apportent des réponses à plusieurs questions quant à l'action des acides gras dans l'hypothalamus, ils soulèvent d'autres interrogations quant à leurs mécanismes d'action via ACBP et ODN. Nous montrons, via notre approche d'inactivation d'ACBP dans les astrocytes, que ce dernier est important dans la réponse aux diètes riches en gras et que son absence rend les souris plus sensibles à ces diètes obésogènes. Cependant, cette approche ne nous permet pas de dissocier les effets du métabolisme des acides gras par ACBP de son action sur les neurones POMC via sa sécrétion en tant que gliotransmetteur. En d'autres termes, le métabolisme des acides gras insaturés via ACBP est-il essentiel à l'activation des neurones POMC par ODN? Deux approches peuvent être envisagées pour répondre à cette question, soit la restauration sélective de la fonction intracellulaire ou sécrétée d'ACBP. L'approche la plus simple est de restaurer les effets d'ODN dans le modèle d'inactivation astrocytaire d'ACBP. Cette approche nécessiterait une infusion chronique intra MBH du peptide ODN via l'utilisation de pompes osmotiques. Ceci nous permettrait d'évaluer l'action du peptide sécrété et son action sur la prise alimentaire et le gain de poids en réponse aux diètes riches en gras, mais serait limité par la durée d'infusion relativement limitée pouvant aller de 3 jours à 5 semaines. Cette approche rétablit les effets d'ODN sécrété tout en préservant les défauts potentiels du métabolisme central des acides gras. Ainsi, une amélioration du phénotype de nos souris invalidées indiquerait que les défauts du métabolisme astrocytaire des acides gras par ACBP ne contribuent pas au phénotype observé dans notre modèle. Par contre, ceci ne nous permet pas de déterminer si le métabolisme des acides gras par ACBP est un signal pour sa sécrétion. Inversement,

nous pourrions réexprimer une protéine ACBP qui ne peut être sécrétée et/ou clivée. Cependant, un tel système est compliqué à élaborer puisqu'il faut muter notre protéine d'intérêt pour éliminer sa fonction sécrétée tout en préservant ses fonctions intracellulaires. Une approche plus simple, quoique moins informative, est l'utilisation d'un système d'infusion de l'antagoniste du récepteur ODN. Ceci nous permet de conserver les fonctions intracellulaires d'ACBP et de bloquer uniquement l'effet d'ODN sur son récepteur.

Une deuxième question soulevée par nos travaux, particulièrement dans la troisième étude, est celle de l'identité du récepteur d'ODN. Il serait intéressant, voire essentiel, de pouvoir identifier le récepteur d'ODN pour pouvoir évaluer son potentiel en tant que cible pharmacologique pour les pathologies métaboliques. Bien que l'identité du récepteur ne soit pas connue, nous avons relativement beaucoup de données sur ce dernier. Il s'agit d'un GPCR couplé à la protéine $G\alpha_i$ (sensible à la toxine pertussique) et $G\alpha_q$ (sensible aux inhibiteurs de la PLC) et nos enregistrements électrophysiologiques suggèrent qu'il est fort probablement spécifique aux neurones POMC dans l'ARC. Deux types d'approches peuvent être utilisés pour identifier ce récepteur, soit les approches basées sur la liaison au ligand et/ou l'antagoniste, ou les approches basées sur son expression possiblement spécifique aux neurones POMC de l'ARC.

Une avenue intéressante à évaluer est la modulation de la sensibilité aux diètes obésogènes par ACBP. Nous avons montré que l'absence d'ACBP dans les astrocytes augmente la sensibilité à l'obésité induite par les diètes riches en gras. Il serait intéressant d'évaluer si ACBP peut protéger les souris contre les effets obésogènes de la diète, ou d'évaluer la capacité d'ACBP à renverser la prise de poids. Pour répondre à ces questions spécifiquement, nous pouvons utiliser une approche de surexpression virale d'ACBP et/ou d'ODN. Nous pourrions utiliser soit un modèle de souris obèse, comme les souris déficientes en leptine *ob/ob* ou un modèle d'obésité induite par la diète, comme celui utilisé dans notre troisième étude. Cette surexpression pourrait être effectuée avant ou après le développement de l'obésité pour répondre séparément à ces questions. Nous avons complété la validation de plusieurs des outils nécessaires à la surexpression d'ACBP dans les astrocytes. J'ai ainsi démontré la spécificité du promoteur GFAP utilisé ainsi que l'efficacité l'expression ectopique d'ACBP à l'aide de souris ACBP KO. Nous avons aussi démarré des études visant à évaluer les bénéfices potentiels sur la régulation du poids corporel de l'administration chronique d'ODN ou de ses

agonistes ou antagonistes. Une éventuelle capacité d'ACBP ou ODN à renverser la prise de poids dans un modèle d'obésité augmenterait le potentiel thérapeutique de cette protéine ou de son récepteur.

Annexes

Annexe 1 : Données supplémentaires à l'étude 3

L'ensemble des résultats de la troisième étude a été obtenu chez des souris mâles. En plus de ces données, nous avons aussi effectué ces mêmes mesures chez des souris femelles pour déterminer s'il pouvait y avoir des différences liées au sexe dans le phénotype observé. En effet, il est fréquemment rapporté que les souris femelles sont plus résistantes au gain de poids induit par la consommation de diètes obésogènes. Lorsque l'on compare les deux sexes, nous observons une prise de poids ainsi qu'un poids absolu plus élevé chez les mâles. Par contre, le gain de poids est observé de la même manière chez les souris femelles (Figure sup. 1A). Tout comme chez les mâles, cette augmentation dans la prise de poids est accompagnée d'une prise alimentaire plus élevée chez les souris femelles ACBP KO comparées aux souris témoin GFAP-Cre (Figure sup. 1B). Ce gain de poids n'est pas accompagné de changements dans l'activité locomotrice ou dans les dépenses énergétiques (Figure sup. 2)

L'analyse de la masse corporelle chez les femelles, tout comme chez les mâles, montre une augmentation de la masse grasse suite à l'invalidation astrocytaire d'ACBP (figure sup. 3A). Par contre, nous observons, chez les femelles, une augmentation significative dans le gras intrapéritonéal en plus des augmentations dans le gras sous-cutané, ce qui n'a pas été observé chez les mâles (Figure sup. 3B). Ainsi, nous montrons que le phénotype observé suite à l'ablation astrocytaire d'ACBP n'est pas lié au sexe et est tout aussi sévère chez les femelles.

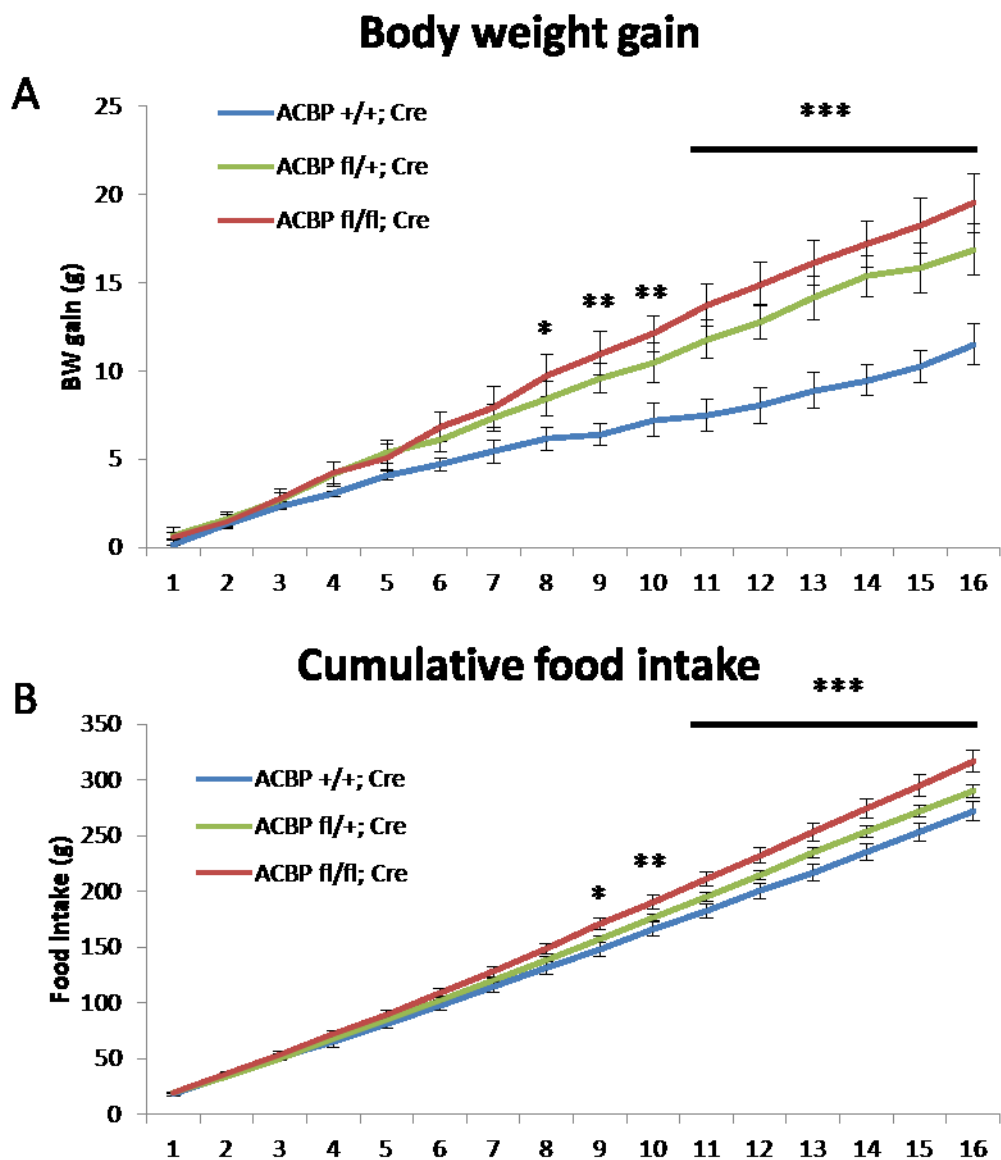


Figure supplémentaire 1 : Augmentation de la prise de poids et prise alimentaire des souris femelles ACBP KO.

Le gain de poids (A) et la prise alimentaire cumulative (B) de souris femelles ACBP +/+; Cre (WT), fl/+; Cre (HET) et fl/fl; Cre (KO) ont été mesurés sur diète riche en gras durant 16 semaines. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 Two-way ANOVA suivi d'un post-test Bonferroni, n=7-9/group.

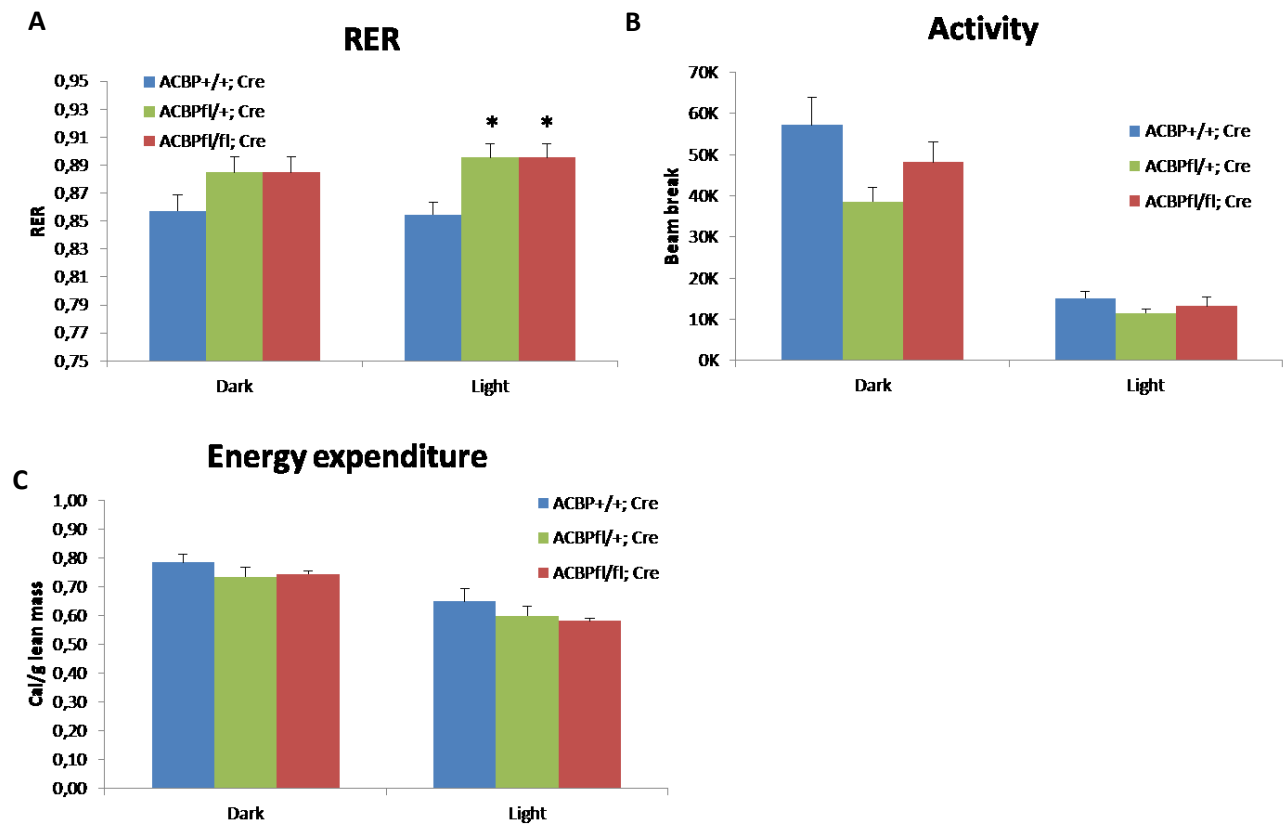


Figure supplémentaire 2: Modulation des paramètres métaboliques suite à l'inactivation d'ACBP chez les souris femelles sur diète riche en gras

Des souris femelles ACBP +/+; Cre (WT), fl/+; Cre (HET) et fl/fl; Cre (KO) ont été placées dans des cages métaboliques suite à une consommation de diète riche en gras durant 16 semaines. **(A)** Quotient respiratoire, **(B)** activité locomotrice et **(C)** dépenses énergétiques. * $p < 0.05$, Two-way ANOVA suivi d'un post-test Bonferroni, $n = 7-9$ /group.

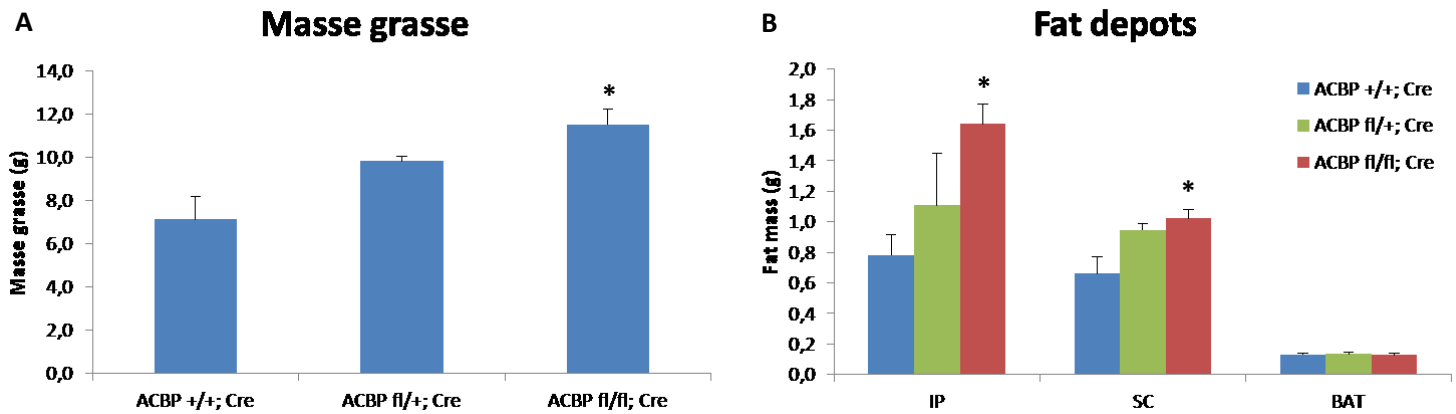


Figure supplémentaire 3 : Analyse de la composition corporelle et des divers dépôts de tissu adipeux chez les femelles.

(A) Mesure de la masse grasse mesuré par EchoMRI des souris femelles ACBP +/+; Cre, fl/+; Cre et fl/fl; Cre ayant été nourries durant 16 semaines sur une diète riche en gras. **B** masse de différents dépôts adipeux (IP) intrapéritonéal, (SC) sous-cutané et (BAT) tissu adipeux brun. * $p < 0.05$, Two-way ANOVA suivi d'un post-test Bonferroni, $n=7-9/\text{group}$.

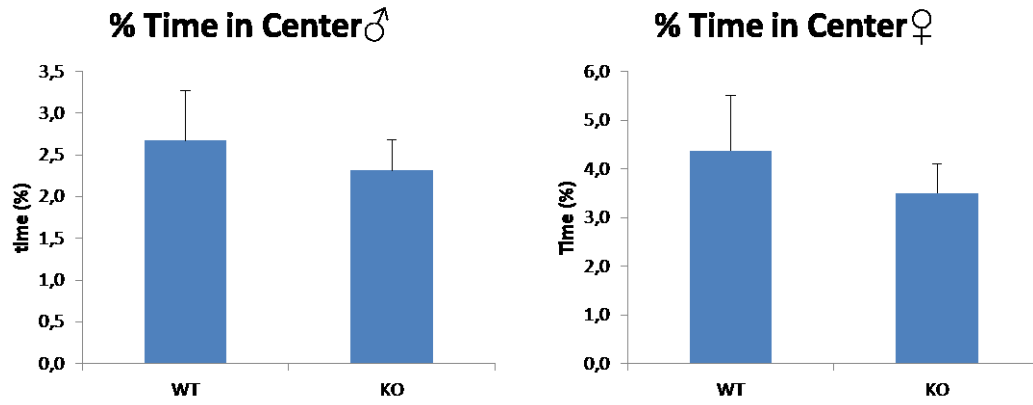
Modulation des comportements liés à l'anxiété par ACBP endogène

Les effets de l'inactivation d'ACBP sur la prise alimentaire, la régulation de la balance énergétique et le gain de poids associé à leurs dérégulations, ne peuvent être interprétés sans tenir compte des études suggérant qu'ACBP a des effets anxiogènes et est capable d'augmenter le comportement pro conflit. Ces études se sont basées principalement sur une administration exogène de la protéine entière ou de son produit de clivage, ODN, par ICV. Ce dernier peptide a même été décrit comme un peptide de l'anxiété. Les études les plus récentes sur l'effet anxiogène d'ODN montre que l'administration de ce dernier par ICV augmente les niveaux d'anxiété tels que mesurés par une diminution du temps passé dans les sections ouvertes de différents appareils comme le white/dark box, epm OFT. Cette action anxiogène serait médiée par l'inhibition du tonus GABAergique par ODN, ayant ainsi un mode d'action en opposition aux effets anxiolytiques des benzodiazépines tel le diazépam.

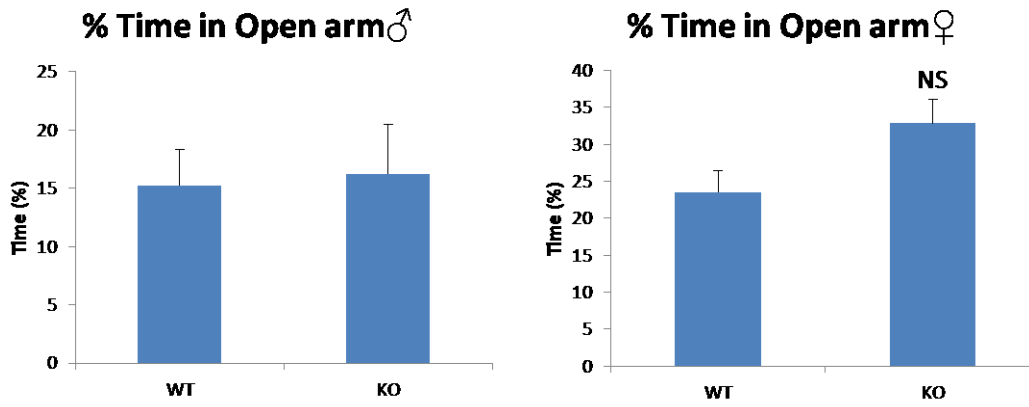
Ainsi, une modulation dans l'expression de cette protéine dite anxiogène peut avoir des effets sur la prise alimentaire et les dépenses énergétiques. Dans le cadre d'une étude plus approfondie sur les effets potentiellement anxiolytiques d'un KO d'ACBP (astrocytaire ou complet) où je figure en tant que deuxième auteur, nous avons mesuré les niveaux d'anxiété basale de souris invalidées pour ACBP dans les astrocytes ainsi que des souris complètement invalidées, comparée à des souris de type sauvage (WT). Nous avons ainsi mesuré les niveaux d'anxiété de ces différentes souris à l'aide d'un test en Open Field et d'un labyrinthe EPM. Le temps passé dans la zone centrale du test OFT est identique entre les souris ACBP KO et WT, tant chez les mâles que chez les femelles (Figure sup. 4A) indiquant qu'il n'y a pas de différences dans leurs niveaux d'anxiété. On observe la même tendance lorsque l'on évalue le niveau d'anxiété de ces souris dans un autre test, l'EPM. Le temps passé dans les bras ouverts est identique entre les souris WT et KO (Figure sup. 4B). Finalement, nous avons étudié les souris invalidées spécifiquement dans les astrocytes, soit les souris ACBP flox/flox (WT) et flox/flox; cre (KO) à l'aide d'un EPM. Tout comme pour l'inactivation totale d'ACBP, le temps passé dans les bras ouverts de l'EPM est identique entre les souris KO et WT mâles et femelles (Figure sup. 4C). Nous pouvons donc conclure que l'inactivation, complète ou astrocytaire, d'ACBP n'a aucun effet sur les niveaux d'anxiété basale de nos souris. Ceci nous permet ainsi d'éliminer la possibilité que les phénotypes observés lors de l'étude 3 soient dus à une diminution du comportement anxieux chez les souris invalidées pour ACBP dans les astrocytes. Ces tests comportementaux font partie d'une

publication dans laquelle je figure en deuxième auteur publié dans la revue Behavioral Brain Research le 15 Octobre 2016 (Budry et al. 2016).

A



B



C

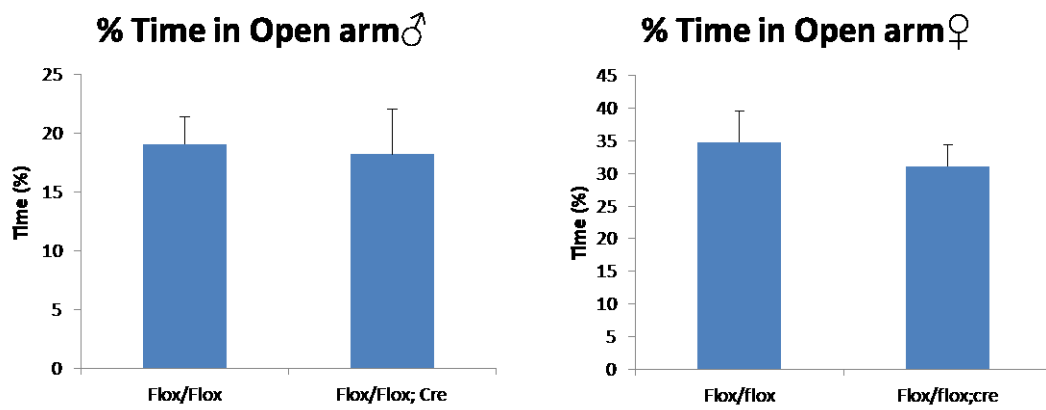


Figure supplémentaire 4 : Mesure des niveaux d'anxiété basals des souris ACBP KO.

(A) Pourcentage de temps passé dans la zone centrale dans un OFT chez les souris ACBP WT et KO mâles et femelles. **B** Pourcentage de temps passé dans le bras ouvert d'un test EPM chez les souris ACBP WT et KO mâles et femelles et **C** chez les souris ACBP invalidés dans les astrocytes flox/flox (WT) et flox/flox; Cre (KO). OFT : Open Field Test, EPM : Elevated Plus Maze

Annexe 2 : Régulation de la prise alimentaire et la balance énergétique par ATGL

En parallèle à mes travaux sur ACBP et son rôle dans le métabolisme central des acides gras et de la régulation de la balance énergétique, j'ai aussi évalué l'implication de la protéine adipeuse triglycéride lipase (ATGL) dans ces processus. ATGL est une protéine lipase responsable de la dégradation des TAG et est principalement exprimé dans les adipocytes. Par contre, dans le cerveau, ATGL serait une protéine associée aux membranes avec une activité en tant que phospholipase A2 (Alberdi et al. 1999). Des données suggèrent qu'ATGL peut être activé par un peptide pouvant être sécrété par les adipocytes, le pigment epithelium derived factor (PEDF) pour augmenter les niveaux de lipolyse dans le foie et les tissu adipeux (Borg et al. 2011). Certaines données suggèrent que PEDF peut atteindre le CNS et peut avoir un effet neuroprotecteur dépendant de sa liaison à un récepteur, soit potentiellement ATGL (Subramanian et al. 2013).

Nous avons donc voulu déterminer si PEDF pouvait avoir un effet anorexigène, lorsqu'administré centralement. Nous avons donc injecté par ICV 500 ng du peptide ou de salin sur des souris mises à jeun et mesurée la prise alimentaire durant 24 h. Nous constatons une diminution de la prise alimentaire cumulative entre 12 et 24 h suivant l'administration de PEDF par rapport aux souris contrôle (Figure sup. 5). Ceci suggère que PEDF peut, s'il est transporté à travers la BBB, moduler la prise alimentaire. D'autres administrations de ce peptide sont prévues sur des souris où le récepteur potentiel de PEDF, soit la lipase ATGL, est invalidé dans le cerveau, pour déterminer si son action sur la prise alimentaire est médiée par cette lipase.

Nous avons aussi mesuré l'expression d'ATGL dans l'hypothalamus médiobasal de souris placées sur diète normale ou riche en gras durant 8 semaines (Figure sup. 6). Ces souris ont été séparées en trois groupes soit les souris sur diète régulière, les souris sur diète riche en gras ont été divisées en deux groupes, celles n'ayant pas pris beaucoup de poids et celles dont le gain de poids est élevé. Les souris dites résistantes à la diète avaient une augmentation de l'expression d'ATGL qui n'a pas été observée chez les souris non résistantes. Ceci peut suggérer qu'ATGL dans le MBH ait un effet protecteur contre le gain de poids induit par la consommation de nourriture riche en gras. Ainsi, nous avons voulu déterminer si ATGL est un acteur potentiel dans la régulation de la prise alimentaire et du

métabolisme énergétique. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle de souris ATGL flox pour invalider cette lipase de façon spécifique dans les neurones de l'ARC. Ainsi, à l'aide d'un appareil stéréotaxique, nous avons injecté un virus exprimant la recombinaise Cre ou le contrôle GFP dont l'expression est contrôlée par le promoteur synapsine. Ces souris et leurs contrôles ont alors été placés sur diète régulière ou riche en gras durant 8 semaines.

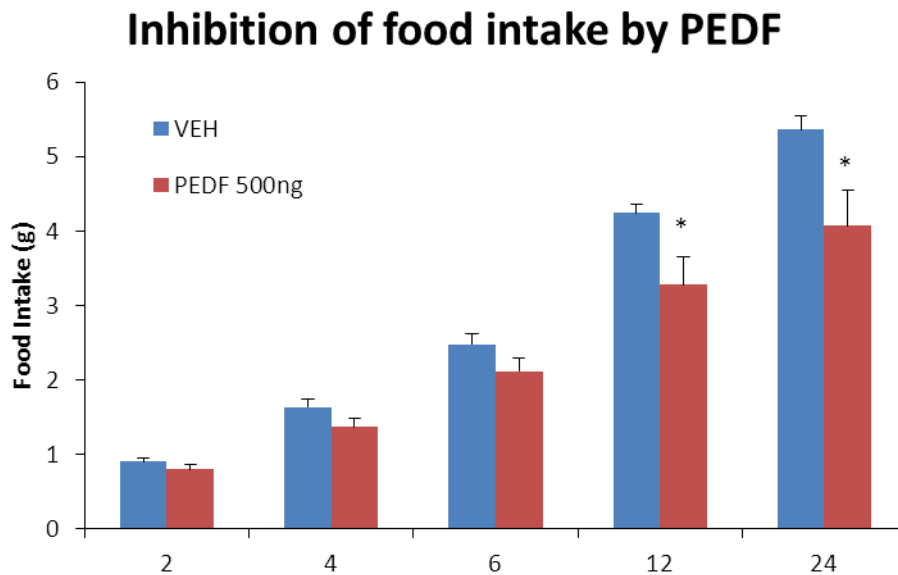


Figure supplémentaire 5 : Effet anorexigène de PEDF au niveau central.

500 ng du peptide PEDF ou de salin dans un volume total de 2 μ L ont été administrés en ICV dans le ventricule latéral de souris WT ayant été mis à jeun durant 18 h. L'accès à la nourriture a été restauré à 10:30 AM, 30 minutes suivant l'administration de PEDF ou de salin et la prise alimentaire cumulative a été mesurée durant 24h. * $p < 0.05$ t-test, $n = 8$.

ATGL expression

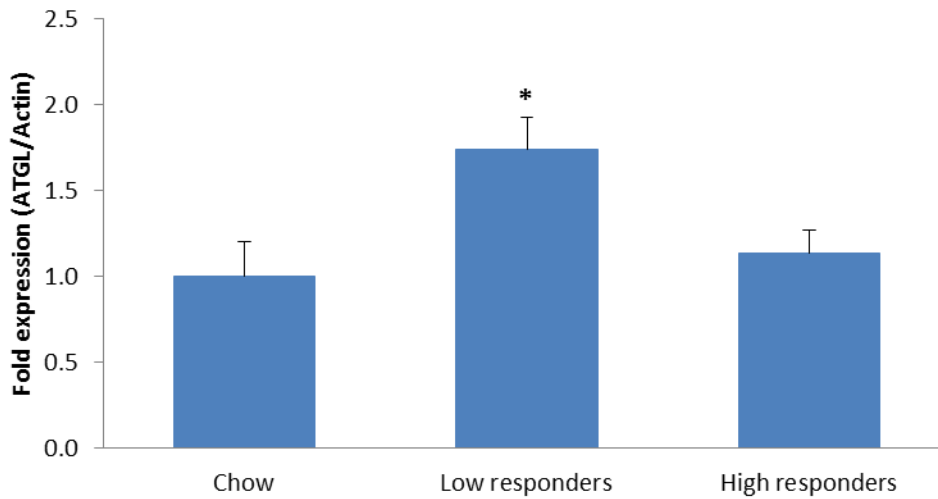


Figure supplémentaire 6 : Niveau d'expression d'ATGL dans l'ARC de souris dont l'obésité est induite par la diète (DIO).

Les niveaux d'expression d'ATGL par rapport à l'actine ont été mesurés par qPCR dans l'ARC de souris nourries avec une diète normale (Chow) ou riche en gras durant 8 semaines. Les souris nourries avec la diète riche en gras ont été séparées selon leur gain de poids, les souris avec un gain de poids minime (Low responders) et ayant un gain de poids élevé (High responders). * $P < 0.05$ t-test, $n = 8$.

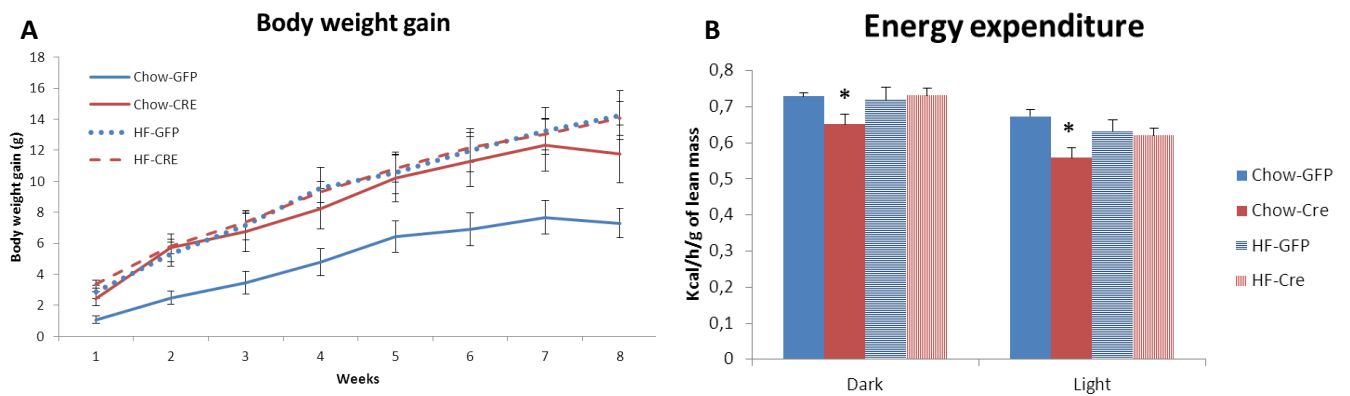


Figure supplémentaire 7 : L'inactivation d'ATGL dans les neurones de l'ARC de souris sur diète normale et riche en gras.

(A) Mesure du gain de poids durant 8 semaines suivant l'administration bilatérale dans l'ARC de 250 nL de virus Synapsine-Cre ou GFP à une concentration de 10^{12} GC/mL à des souris ATGL flox/flox à 8 semaines d'âge nourries avec diète normale (Chow) ou riche en gras (HF). **(B)** Mesure des dépenses énergétique au terme des 8 semaines sur diète régulière ou riche en gras. * $P < 0.05$ t-test, $n = 8$.

Annexe 3 : Collaboration à d'autres projets de recherche

En plus des différents projets ayant conduit ou non à la publication dans un journal scientifique au cours de ma thèse, j'ai aussi eu l'opportunité de collaborer sur la base de mes connaissances et expertises aux projets des autres étudiants du laboratoire, d'étudiants de laboratoires voisins ainsi que des études réalisées par des étudiants provenant d'autres institutions de recherches.

Le premier projet auquel j'ai participé est un projet débuté par Lionel Budry, stagiaire postdoctoral dans le laboratoire. Son projet consistait à évaluer l'impact de l'ablation d'ACBP sur les comportements liés à l'anxiété ainsi que dans la réponse anxiolytique au diazépam. ACBP a été identifié pour dans le cerveau via son activité de liaison au récepteur des benzodiazépines CBR et sa capacité à inhiber la liaison du diazépam à ce récepteur, d'où son nom Diazépam Binding Inhibitor. De plus, l'administration centrale d'ACBP ou de son produit de clivage ODN est considérée comme étant anxiogène (Bender and Hertz 1986, De Mateos-Verchere et al. 1998).

En utilisant diverses approches d'inactivation d'ACBP, nous avons étudié l'effet de l'ablation partielle ou complète d'ACBP, un inhibiteur du diazépam, sur les niveaux basaux d'anxiétés ainsi que sur l'action anxiolytique du diazépam. Cette étude montre que l'ablation d'ACBP n'a pas d'effet sur les niveaux basaux d'anxiété. De plus, les effets anxiolytiques du diazépam sont absents lorsqu'administrés à des souris invalidées pour ACBP, suggérant que ce dernier est essentiel à l'action anxiolytique des benzodiazépines.

Ma contribution à ce projet consistait à évaluer l'effet anxiolytique du diazépam sur des souris invalidées pour ACBP dans les astrocytes via deux tests comportementaux différents, soit le test en « Open field » et le « Elevated Plus Maze ». Ce travail a conduit à la publication d'un article dans le journal Behavioral Brain Research dans lequel je suis deuxième auteur.

DBI/ACBP loss-of-function does not affect anxiety-like behaviour but reduces anxiolytic responses to diazepam in mice.

Budry L, Bouyakdan K, Tobin S, Rodaros D, Marcher AB, Mandrup S, Fulton S, Alquier T.

[Behav Brain Res](#). 2016 Oct 15;313:201-7. doi: 10.1016/j.bbr.2016.06.052. Epub 2016 Jun 27.

J'ai aussi eu l'opportunité de participer au projet d'Alexandre Fiset, stagiaire postdoctoral en co-supervision dans les laboratoires des Drs Thierry Alquier et Stephanie Fulton.

Le sujet de cette étude était focalisé sur une hydrolase, α/β -Hydrolase Domain 6 (ABHD6), impliqué dans la dégradation du 2-arachidonoyl-glycérol (2-AG) un endocanabinoïde agissant sur le récepteur des endocanabinoïdes CB1. Le 2-AG est synthétisé au niveau du neurone postsynaptique et agit sur les récepteurs CB1 présynaptique pour inhiber de façon rétrograde l'activité du neurone présynaptique. ABHD6 agit en dégradant le 2-AG au site de synthèse pour bloquer l'inhibition rétrograde. Le but du projet visait donc à évaluer l'impact potentiel d'une délétion d'ABHD6 dans les neurones de l'hypothalamus ventromédian (VMH) sur la régulation du métabolisme énergétique et de la prise alimentaire. Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet suggèrent que cette hydrolase est impliquée dans l'adaptation, ou dans la réponse, à divers changements métaboliques telles la restriction alimentaire, la consommation de diète riche en gras ainsi que l'exposition au froid.

Ma participation à cette étude était au niveau des mesures des niveaux de 2-AG dans le VMH de souris contrôles ou ayant été invalidés pour ABHD6 dans le VMH suivant une période de jeûne de 0, 2, 4 ou 18 h. Ces travaux ont conduit à la publication récente d'un article dans le journal Cell Report.

α/β -Hydrolase Domain 6 in the Ventromedial Hypothalamus Controls Energy Metabolism Flexibility.

Fiset, Tobin S, Décarie-Spain L, [Bouyakdan K](#), Peyot ML, Madiraju SR, Prentki M, Fulton S, Alquier T.

[Cell Rep.](#) 2016 Oct 25;17(5):1217-1226. doi: 10.1016/j.celrep.2016.10.004.

J'ai aussi eu l'opportunité de collaborer à des études réalisées dans différents laboratoires, notamment avec le laboratoire du Dr Jennifer Estall à l'IRCM. L'expertise que j'ai acquise dans les mesures de flux métaboliques (oxydation des acides gras et du glucose dans des modèles cellulaires et d'explants) au cours de ma thèse m'a permis de participer à cette étude sur le rôle de PPAR γ coactivator 1 (PGC-1). Dans le cadre de cette étude, j'ai comparé les taux d'oxydations du palmitate dans un modèle de cellules β WT et doublement invalidés pour PGC-1 α/β . Je suis troisième auteur sur cette étude publiée dans le journal *Molecular Metabolism* en 2015.

PGC-1 coactivators in β -cells regulate lipid metabolism and are essential for insulin secretion coupled to fatty acids.

Oropeza D, Jouvett N, Bouyakdan K, Perron G, Ringuette LJ, Philipson LH, Kiss RS, Poitout V, Alquier T, Estall JL.

[Mol Metab.](#) 2015 Aug 14;4(11):811-22. doi: 10.1016/j.molmet.2015.08.001. eCollection 2015.

Les différentes méthodes d'inactivation génique tissu spécifique, notamment le système cre-lox, sont des outils indispensables pour les études de biologie moléculaire. L'utilisation de ces systèmes d'expression ou d'inactivation dans les cellules β est fréquemment associée à une expression ectopique dans le SNC et à des effets potentiels sur l'insulinémie et la glycémie. Le transgène MIP-CreERT1Lphi inducible a été développé pour pallier à ces différentes limitations et j'ai eu l'opportunité de participer à sa caractérisation. Dans cette étude j'ai mesuré l'expression ectopique du transgène Cre dans divers noyaux hypothalamiques pour déterminer si ce transgène est spécifique aux cellules β . J'ai aussi comparé les niveaux d'expression de l'hormone de croissance humaine, qui fait partie du construit MIP-CreERT1Lphi, dans l'hypothalamus et dans les îlots pancréatiques.

Je suis cinquième auteur sur cette étude publiée dans le journal Diabetes en 2015.

Phenotypic Characterization of MIP-CreERT1Lphi Mice With Transgene-Driven Islet Expression of Human Growth Hormone.

Oropeza D, Jouvét N, Budry L, Campbell JE, Bouyakdan K, Lacombe J, Perron G, Bergeron V, Neuman JC, Brar HK, Fenske RJ, Meunier C, Sczelecki S, Kimple ME, Drucker DJ, Sreaton RA, Poitout V, Ferron M, Alquier T, Estall JL. Diabetes. 2015 Nov;64(11):3798-807. doi: 10.2337/db15-0272. Epub 2015 Jul 7.

Bibliographie

A. Guidotti, A. B., A. Muhkin, and E. Costa (1990). "Diazepam-binding inhibitor: response to Knudsen & Nielsen." *Biochem J* **265**(3): 928–929.

Abbott, N. J. and I. A. Romero (1996). "Transporting therapeutics across the blood-brain barrier." *Mol Med Today* **2**(3): 106-113.

Abbott, N. J., L. Ronnback and E. Hansson (2006). "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier." *Nat Rev Neurosci* **7**(1): 41-53.

Abi-Saab, W. M., D. G. Maggs, T. Jones, R. Jacob, V. Srihari, J. Thompson, D. Kerr, P. Leone, J. H. Krystal, D. D. Spencer, M. J. During and R. S. Sherwin (2002). "Striking differences in glucose and lactate levels between brain extracellular fluid and plasma in conscious human subjects: effects of hyperglycemia and hypoglycemia." *J Cereb Blood Flow Metab* **22**(3): 271-279.

Abo-Hashema, K. A., M. H. Cake, M. A. Lukas and J. Knudsen (2001). "The interaction of acyl-CoA with acyl-CoA binding protein and carnitine palmitoyltransferase I." *Int J Biochem Cell Biol* **33**(8): 807-815.

Acuna-Goycolea, C., N. Tamamaki, Y. Yanagawa, K. Obata and A. N. van den Pol (2005). "Mechanisms of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide inhibition of identified green fluorescent protein-expressing GABA neurons in the hypothalamic neuroendocrine arcuate nucleus." *J Neurosci* **25**(32): 7406-7419.

Adinoff, B., R. Anton, M. Linnoila, A. Guidotti, C. B. Nemeroff and G. Bissette (1996). "Cerebrospinal fluid concentrations of corticotropin-releasing hormone (CRH) and diazepam-binding inhibitor (DBI) during alcohol withdrawal and abstinence." *Neuropsychopharmacology* **15**(3): 288-295.

Ahima, R. S. and D. A. Antwi (2008). "Brain regulation of appetite and satiety." *Endocrinol Metab Clin North Am* **37**(4): 811-823.

Alberdi, E., M. S. Aymerich and S. P. Becerra (1999). "Binding of pigment epithelium-derived factor (PEDF) to retinoblastoma cells and cerebellar granule neurons. Evidence for a PEDF receptor." *J Biol Chem* **274**(44): 31605-31612.

Alfonso, J., C. Le Magueresse, A. Zuccotti, K. Khodosevich and H. Monyer (2012). "Diazepam binding inhibitor promotes progenitor proliferation in the postnatal SVZ by reducing GABA signaling." *Cell Stem Cell* **10**(1): 76-87.

Alho, H., E. Costa, P. Ferrero, M. Fujimoto, D. Cosenza-Murphy and A. Guidotti (1985). "Diazepam-binding inhibitor: a neuropeptide located in selected neuronal populations of rat brain." *Science* **229**(4709): 179-182.

Allard, C., L. Carneiro, S. Grall, B. H. Cline, X. Fioramonti, C. Chretien, F. Baba-Aissa, C. Giaume, L. Penicaud and C. Leloup (2014). "Hypothalamic astroglial connexins are required for brain glucose sensing-induced insulin secretion." *J Cereb Blood Flow Metab* **34**(2): 339-346.

Allen, N. J. and B. A. Barres (2009). "Neuroscience: Glia - more than just brain glue." *Nature* **457**(7230): 675-677.

Alquier, T., J. Kawashima, Y. Tsuji and B. B. Kahn (2007). "Role of hypothalamic adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase in the impaired counterregulatory response induced by repetitive neuroglucopenia." *Endocrinology* **148**(3): 1367-1375.

Angulo, M. C., A. S. Kozlov, S. Charpak and E. Audinat (2004). "Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus." *J Neurosci* **24**(31): 6920-6927.

Aponte, Y., D. Atasoy and S. M. Sternson (2011). "AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training." *Nat Neurosci* **14**(3): 351-355.

Araque, A., G. Carmignoto, P. G. Haydon, S. H. Oliet, R. Robitaille and A. Volterra (2014). "Gliotransmitters travel in time and space." *Neuron* **81**(4): 728-739.

Araque, A., V. Parpura, R. P. Sanzgiri and P. G. Haydon (1998). "Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons." *Eur J Neurosci* **10**(6): 2129-2142.

Araque, A., V. Parpura, R. P. Sanzgiri and P. G. Haydon (1999). "Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner." *Trends Neurosci* **22**(5): 208-215.

Araque, A., R. P. Sanzgiri, V. Parpura and P. G. Haydon (1998). "Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons." *J Neurosci* **18**(17): 6822-6829.

Arble, D. M., J. Holland, N. Ottaway, J. Sorrell, J. W. Pressler, R. Morano, S. C. Woods, R. J. Seeley, J. P. Herman, D. A. Sandoval and D. Perez-Tilve (2015). "The melanocortin-4 receptor integrates circadian light cues and metabolism." *Endocrinology* **156**(5): 1685-1691.

Argente-Arizon, P., A. Freire-Regatillo, J. Argente and J. A. Chowen (2015). "Role of non-neuronal cells in body weight and appetite control." *Front Endocrinol (Lausanne)* **6**: 42.

Arluisson, M., M. Quignon, P. Nguyen, B. Thorens, C. Leloup and L. Penicaud (2004). "Distribution and anatomical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain--an immunohistochemical study." *J Chem Neuroanat* **28**(3): 117-136.

Arluisson, M., M. Quignon, B. Thorens, C. Leloup and L. Penicaud (2004). "Immunocytochemical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain. II. Electron microscopic study." *J Chem Neuroanat* **28**(3): 137-146.

Atasoy, D., J. N. Betley, H. H. Su and S. M. Sternson (2012). "Deconstruction of a neural circuit for hunger." *Nature* **488**(7410): 172-177.

Attwell, D. and S. B. Laughlin (2001). "An energy budget for signaling in the grey matter of the brain." *J Cereb Blood Flow Metab* **21**(10): 1133-1145.

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

Azevedo, F. A., L. R. Carvalho, L. T. Grinberg, J. M. Farfel, R. E. Ferretti, R. E. Leite, W. Jacob Filho, R. Lent and S. Herculano-Houzel (2009). "Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain." *J Comp Neurol* **513**(5): 532-541.

Baertschi, A. J., D. Monnier, U. Schmidt, E. S. Levitan, S. Fakan and A. Roatti (2001). "Acid prohormone sequence determines size, shape, and docking of secretory vesicles in atrial myocytes." *Circ Res* **89**(3): E23-29.

Baltan, S. (2015). "Can lactate serve as an energy substrate for axons in good times and in bad, in sickness and in health?" *Metab Brain Dis* **30**(1): 25-30.

Balthasar, N., L. T. Dalgaard, C. E. Lee, J. Yu, H. Funahashi, T. Williams, M. Ferreira, V. Tang, R. A. McGovern, C. D. Kenny, L. M. Christiansen, E. Edelstein, B. Choi, O. Boss, C. Aschkenasi, C. Y. Zhang, K. Mountjoy, T. Kishi, J. K. Elmquist and B. B. Lowell (2005). "Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure." *Cell* **123**(3): 493-505.

Banks, M. I. and R. A. Pearce (2000). "Kinetic differences between synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors in CA1 pyramidal cells." *J Neurosci* **20**(3): 937-948.

Barakat, L. and A. Bordey (2002). "GAT-1 and reversible GABA transport in Bergmann glia in slices." *J Neurophysiol* **88**(3): 1407-1419.

Barnard, E. A., P. Skolnick, R. W. Olsen, H. Mohler, W. Sieghart, G. Biggio, C. Braestrup, A. N. Bateson and S. Z. Langer (1998). "International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function." *Pharmacol Rev* **50**(2): 291-313.

Barros, L. F. (2013). "Metabolic signaling by lactate in the brain." *Trends Neurosci* **36**(7): 396-404.

Barros, L. F., R. Courjaret, P. Jakoby, A. Loaiza, C. Lohr and J. W. Deitmer (2009). "Preferential transport and metabolism of glucose in Bergmann glia over Purkinje cells: a multiphoton study of cerebellar slices." *Glia* **57**(9): 962-970.

Baumann, N. and D. Pham-Dinh (2001). "Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system." *Physiol Rev* **81**(2): 871-927.

Bazinet, R. P. and S. Laye (2014). "Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease." *Nat Rev Neurosci* **15**(12): 771-785.

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

Beattie, E. C., D. Stellwagen, W. Morishita, J. C. Bresnahan, B. K. Ha, M. Von Zastrow, M. S. Beattie and R. C. Malenka (2002). "Control of synaptic strength by glial TNF α ." *Science* **295**(5563): 2282-2285.

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

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

Bellesi, M., L. de Vivo, G. Tononi and C. Cirelli (2015). "Effects of sleep and wake on astrocytes: clues from molecular and ultrastructural studies." *BMC Biol* **13**: 66.

Ben-Yoseph, O., P. A. Boxer and B. D. Ross (1994). "Oxidative stress in the central nervous system: monitoring the metabolic response using the pentose phosphate pathway." *Dev Neurosci* **16**(5-6): 328-336.

Benatti, P., G. Peluso, R. Nicolai and M. Calvani (2004). "Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties." *J Am Coll Nutr* **23**(4): 281-302.

Bender, A. S. and L. Hertz (1986). "Octadecaneuropeptide (ODN; 'anxiety peptide') displaces diazepam more potently from astrocytic than from neuronal binding sites." *Eur J Pharmacol* **132**(2-3): 335-336.

Benington, J. H. and H. C. Heller (1995). "Restoration of brain energy metabolism as the function of sleep." *Prog Neurobiol* **45**(4): 347-360.

Bergami, M., S. Santi, E. Formaggio, C. Cagnoli, C. Verderio, R. Blum, B. Berninger, M. Matteoli and M. Canossa (2008). "Uptake and recycling of pro-BDNF for transmitter-induced secretion by cortical astrocytes." *J Cell Biol* **183**(2): 213-221.

Berger, J. and D. E. Moller (2002). "The mechanisms of action of PPARs." *Annu Rev Med* **53**: 409-435.

Berglund, E. D., C. R. Vianna, J. Donato, Jr., M. H. Kim, J. C. Chuang, C. E. Lee, D. A. Lauzon, P. Lin, L. J. Brule, M. M. Scott, R. Coppari and J. K. Elmquist (2012). "Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice." *J Clin Invest* **122**(3): 1000-1009.

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

Bezzi, P., G. Carmignoto, L. Pasti, S. Vesce, D. Rossi, B. L. Rizzini, T. Pozzan and A. Volterra (1998). "Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes." *Nature* **391**(6664): 281-285.

Bezzi, P., V. Gundersen, J. L. Galbete, G. Seifert, C. Steinhauser, E. Pilati and A. Volterra (2004). "Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate." *Nat Neurosci* **7**(6): 613-620.

Bhuiyan, J., P. H. Pritchard, S. V. Pande and D. W. Secombe (1995). "Effects of high-fat diet and fasting on levels of acyl-coenzyme A binding protein in liver, kidney, and heart of rat." *Metabolism* **44**(9): 1185-1189.

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

Birnbaum, M. J., H. C. Haspel and O. M. Rosen (1986). "Cloning and characterization of a cDNA encoding the rat brain glucose-transporter protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(16): 5784-5788.

Bittar, P. G., Y. Charnay, L. Pellerin, C. Bouras and P. J. Magistretti (1996). "Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain." *J Cereb Blood Flow Metab* **16**(6): 1079-1089.

Bixel, M. G. and B. Hamprecht (1995). "Generation of ketone bodies from leucine by cultured astroglial cells." *J Neurochem* **65**(6): 2450-2461.

Blazquez, C., C. Sanchez, G. Velasco and M. Guzman (1998). "Role of carnitine palmitoyltransferase I in the control of ketogenesis in primary cultures of rat astrocytes." *J Neurochem* **71**(4): 1597-1606.

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

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

Blutstein, T. and P. G. Haydon (2013). "The Importance of astrocyte-derived purines in the modulation of sleep." *Glia* **61**(2): 129-139.

Boghossian, S., M. Park and D. A. York (2010). "Melanocortin activity in the amygdala controls appetite for dietary fat." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **298**(2): R385-393.

Borg, M. L., Z. B. Andrews, E. J. Duh, R. Zechner, P. J. Meikle and M. J. Watt (2011). "Pigment epithelium-derived factor regulates lipid metabolism via adipose triglyceride lipase." *Diabetes* **60**(5): 1458-1466.

Boury-Jamot, B., A. Carrard, J. L. Martin, O. Halfon, P. J. Magistretti and B. Boutrel (2016). "Disrupting astrocyte-neuron lactate transfer persistently reduces conditioned responses to cocaine." *Mol Psychiatry* **21**(8): 1070-1076.

Bouzier-Sore, A. K., P. Voisin, P. Canioni, P. J. Magistretti and L. Pellerin (2003). "Lactate is a preferential oxidative energy substrate over glucose for neurons in culture." *J Cereb Blood Flow Metab* **23**(11): 1298-1306.

Bowery, N. G., B. Bettler, W. Froestl, J. P. Gallagher, F. Marshall, M. Raiteri, T. I. Bonner and S. J. Enna (2002). "International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function." *Pharmacol Rev* **54**(2): 247-264.

Braat, S. and R. F. Kooy (2015). "The GABAA Receptor as a Therapeutic Target for Neurodevelopmental Disorders." *Neuron* **86**(5): 1119-1130.

Bradl, M. and H. Lassmann (2010). "Oligodendrocytes: biology and pathology." *Acta Neuropathol* **119**(1): 37-53.

Brecher, P. and H. T. Kuan (1979). "Lipoprotein lipase and acid lipase activity in rabbit brain microvessels." *J Lipid Res* **20**(4): 464-471.

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

Broer, S., B. Rahman, G. Pellegrini, L. Pellerin, J. L. Martin, S. Verleysdonk, B. Hamprecht and P. J. Magistretti (1997). "Comparison of lactate transport in astroglial cells and monocarboxylate transporter 1 (MCT 1) expressing *Xenopus laevis* oocytes. Expression of two different monocarboxylate transporters in astroglial cells and neurons." *J Biol Chem* **272**(48): 30096-30102.

Brown, A. M. and B. R. Ransom (2007). "Astrocyte glycogen and brain energy metabolism." *Glia* **55**(12): 1263-1271.

Brown, A. M. and B. R. Ransom (2015). "Astrocyte glycogen as an emergency fuel under conditions of glucose deprivation or intense neural activity." *Metab Brain Dis* **30**(1): 233-239.

Brown, A. M., H. M. Sickmann, K. Fosgerau, T. M. Lund, A. Schousboe, H. S. Waagepetersen and B. R. Ransom (2005). "Astrocyte glycogen metabolism is required for neural activity during aglycemia or intense stimulation in mouse white matter." *J Neurosci Res* **79**(1-2): 74-80.

Bruce, J. H., A. M. Ramirez, L. Lin, A. Oracion, R. P. Agarwal and M. D. Norenberg (1991). "Peripheral-type benzodiazepines inhibit proliferation of astrocytes in culture." *Brain Res* **564**(1): 167-170.

Budry, L., K. Bouyakdan, S. Tobin, D. Rodaros, A. B. Marcher, S. Mandrup, S. Fulton and T. Alquier (2016). "DBI/ACBP loss-of-function does not affect anxiety-like behaviour but reduces anxiolytic responses to diazepam in mice." *Behav Brain Res* **313**: 201-207.

Burcelin, R. and B. Thorens (2001). "Evidence that extrapancreatic GLUT2-dependent glucose sensors control glucagon secretion." *Diabetes* **50**(6): 1282-1289.

Burgi, B., W. Lichtensteiger, M. E. Lauber and M. Schlumpf (1999). "Ontogeny of diazepam binding inhibitor/acyl-CoA binding protein mRNA and peripheral benzodiazepine receptor mRNA expression in the rat." *J Neuroendocrinol* **11**(2): 85-100.

Cansell, C., J. Castel, R. G. Denis, C. Rouch, A. S. Delbes, S. Martinez, D. Mestivier, B. Finan, J. G. Maldonado-Aviles, M. Rijnsburger, M. H. Tschop, R. J. DiLeone, R. H. Eckel, S. E. la Fleur, C. Magnan, T. S. Hnasko and S. Luquet (2014). "Dietary triglycerides act on mesolimbic structures to regulate the rewarding and motivational aspects of feeding." *Mol Psychiatry* **19**(10): 1095-1105.

Cao, D., K. Kevala, J. Kim, H. S. Moon, S. B. Jun, D. Lovinger and H. Y. Kim (2009). "Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function." *J Neurochem* **111**(2): 510-521.

Casano, A. M. and F. Peri (2015). "Microglia: multitasking specialists of the brain." *Dev Cell* **32**(4): 469-477.

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

Charles, A. C., J. E. Merrill, E. R. Dirksen and M. J. Sanderson (1991). "Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate." *Neuron* **6**(6): 983-992.

Chaturvedi, R. K. and M. Flint Beal (2013). "Mitochondrial diseases of the brain." *Free Radic Biol Med* **63**: 1-29.

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

Chen, C. T. and R. P. Bazinet (2015). "beta-oxidation and rapid metabolism, but not uptake regulate brain eicosapentaenoic acid levels." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **92**: 33-40.

Chen, C. T., J. T. Green, S. K. Orr and R. P. Bazinet (2008). "Regulation of brain polyunsaturated fatty acid uptake and turnover." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **79**(3-5): 85-91.

Chen, C. T., Z. Liu, M. Ouellet, F. Calon and R. P. Bazinet (2009). "Rapid beta-oxidation of eicosapentaenoic acid in mouse brain: an in situ study." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **80**(2-3): 157-163.

Chen, C. T., M. O. Trepanier, K. E. Hopperton, A. F. Domenichiello, M. Masoodi and R. P. Bazinet (2014). "Inhibiting mitochondrial beta-oxidation selectively reduces levels of nonenzymatic oxidative polyunsaturated fatty acid metabolites in the brain." *J Cereb Blood Flow Metab* **34**(3): 376-379.

Chen, N., H. Sugihara, J. Kim, Z. Fu, B. Barak, M. Sur, G. Feng and W. Han (2016). "Direct modulation of GFAP-expressing glia in the arcuate nucleus bi-directionally regulates feeding." *Elife* **5**.

Chen, T. T., E. I. Maevisky and M. L. Uchitel (2015). "Maintenance of homeostasis in the aging hypothalamus: the central and peripheral roles of succinate." *Front Endocrinol (Lausanne)* **6**: 7.

Chen, Z. W., B. Agerberth, K. Gell, M. Andersson, V. Mutt, C. G. Ostenson, S. Efendic, J. Barros-Soderling, B. Persson and H. Jornvall (1988). "Isolation and characterization of porcine diazepam-binding inhibitor, a polypeptide not only of cerebral occurrence but also common in intestinal tissues and with effects on regulation of insulin release." *Eur J Biochem* **174**(2): 239-245.

Chow, B. W. and C. Gu (2015). "The Molecular Constituents of the Blood-Brain Barrier." *Trends Neurosci* **38**(10): 598-608.

Chowen, J. A., P. Argente-Arizon, A. Freire-Regatillo, L. M. Frago, T. L. Horvath and J. Argente (2016). "The role of astrocytes in the hypothalamic response and adaptation to metabolic signals." *Prog Neurobiol*.

Christian, C. A., A. G. Herbert, R. L. Holt, K. Peng, K. D. Sherwood, S. Pangratz-Fuehrer, U. Rudolph and J. R. Huguenard (2013). "Endogenous positive allosteric modulation of GABA(A) receptors by diazepam binding inhibitor." *Neuron* **78**(6): 1063-1074.

Christian, C. A. and J. R. Huguenard (2013). "Astrocytes potentiate GABAergic transmission in the thalamic reticular nucleus via endozepine signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(50): 20278-20283.

Chuquet, J., P. Quilichini, E. A. Nimchinsky and G. Buzsaki (2010). "Predominant enhancement of glucose uptake in astrocytes versus neurons during activation of the somatosensory cortex." *J Neurosci* **30**(45): 15298-15303.

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

Clark, J. T., P. S. Kalra, W. R. Crowley and S. P. Kalra (1984). "Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats." *Endocrinology* **115**(1): 427-429.

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

Coll, A. P., I. S. Farooqi, B. G. Challis, G. S. Yeo and S. O'Rahilly (2004). "Proopiomelanocortin and energy balance: insights from human and murine genetics." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(6): 2557-2562.

Compere, V., D. Lanfray, H. Castel, F. Morin, J. Leprince, B. Dureuil, H. Vaudry, G. Pelletier and M. C. Tonon (2010). "Acute food deprivation reduces expression of diazepam-binding inhibitor, the precursor of the anorexigenic octadecaneuropeptide ODN, in mouse glial cells." *J Mol Endocrinol* **44**(5): 295-299.

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

Conn, A. R., D. I. Fell and R. D. Steele (1983). "Characterization of alpha-keto acid transport across blood-brain barrier in rats." *Am J Physiol* **245**(3): E253-260.

Cooper, S. J., D. J. Barber, D. B. Gilbert and W. R. Moores (1985). "Benzodiazepine receptor ligands and the consumption of a highly palatable diet in non-deprived male rats." *Psychopharmacology (Berl)* **86**(3): 348-355.

Cornell-Bell, A. H. and S. M. Finkbeiner (1991). "Ca²⁺ waves in astrocytes." *Cell Calcium* **12**(2-3): 185-204.

Cornell-Bell, A. H., S. M. Finkbeiner, M. S. Cooper and S. J. Smith (1990). "Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling." *Science* **247**(4941): 470-473.

Cornford, E. M. and M. E. Cornford (1986). "Nutrient transport and the blood-brain barrier in developing animals." *Fed Proc* **45**(7): 2065-2072.

Cotrina, M. L., J. H. Lin, A. Alves-Rodrigues, S. Liu, J. Li, H. Azmi-Ghadimi, J. Kang, C. C. Naus and M. Nedergaard (1998). "Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26): 15735-15740.

Cotter, D. G., D. A. d'Avignon, A. E. Wentz, M. L. Weber and P. A. Crawford (2011). "Obligate role for ketone body oxidation in neonatal metabolic homeostasis." *J Biol Chem* **286**(9): 6902-6910.

Coulter, D. A. and T. Eid (2012). "Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy." *Glia* **60**(8): 1215-1226.

Craddock, N., L. Jones, I. R. Jones, G. Kirov, E. K. Green, D. Grozeva, V. Moskvina, I. Nikolov, M. L. Hamshere, D. Vukcevic, S. Caesar, K. Gordon-Smith, C. Fraser, E. Russell, N. Norton, G. Breen, D. St Clair, D. A. Collier, A. H. Young, I. N. Ferrier, A. Farmer, P. McGuffin, P. A. Holmans, C. Wellcome Trust Case Control, P. Donnelly, M. J. Owen and M. C. O'Donovan (2010). "Strong genetic evidence for a selective influence of GABAA receptors on a component of the bipolar disorder phenotype." *Mol Psychiatry* **15**(2): 146-153.

Crawford, A. H., J. H. Stockley, R. B. Tripathi, W. D. Richardson and R. J. Franklin (2014). "Oligodendrocyte progenitors: adult stem cells of the central nervous system?" *Exp Neurol* **260**: 50-55.

Crestani, F., M. Lorez, K. Baer, C. Essrich, D. Benke, J. P. Laurent, C. Belzung, J. M. Fritschy, B. Luscher and H. Mohler (1999). "Decreased GABAA-receptor clustering results in enhanced anxiety and a bias for threat cues." *Nat Neurosci* **2**(9): 833-839.

Cristiano, L., A. Cimini, S. Moreno, A. M. Ragnelli and M. Paola Ceru (2005). "Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and related transcription factors in differentiating astrocyte cultures." *Neuroscience* **131**(3): 577-587.

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

Cruciani-Guglielmacci, C., M. Vincent-Lamon, C. Rouch, M. Orosco, A. Ktorza and C. Magnan (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**(1): E148-154.

Cruz, N. F. and G. A. Dienel (2002). "High glycogen levels in brains of rats with minimal environmental stimuli: implications for metabolic contributions of working astrocytes." *J Cereb Blood Flow Metab* **22**(12): 1476-1489.

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

Dale Purves, G. J. A., David Fitzpatrick, Lawrence C Katz, Anthony-Samuel LaMantia, James O McNamara, and S Mark Williams (2011). *Neuroglial cells. Neuroscience.* A. G. Purves D, Fitzpatrick D, et al. Sunderland (MA), Sinauer Associates.

Dannies, P. S. (1999). "Protein hormone storage in secretory granules: mechanisms for concentration and sorting." *Endocr Rev* **20**(1): 3-21.

De Mateos-Verchere, J. G., J. Leprince, M. C. Tonon, H. Vaudry and J. Costentin (1998). "The octadecaneuropeptide ODN induces anxiety in rodents: possible involvement of a shorter biologically active fragment." *Peptides* **19**(5): 841-848.

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

DeMar, J. C., Jr., H. J. Lee, K. Ma, L. Chang, J. M. Bell, S. I. Rapoport and R. P. Bazinet (2006). "Brain elongation of linoleic acid is a negligible source of the arachidonate in brain phospholipids of adult rats." *Biochim Biophys Acta* **1761**(9): 1050-1059.

Demar, J. C., Jr., K. Ma, L. Chang, J. M. Bell and S. I. Rapoport (2005). "alpha-Linolenic acid does not contribute appreciably to docosahexaenoic acid within brain phospholipids of adult rats fed a diet enriched in docosahexaenoic acid." *J Neurochem* **94**(4): 1063-1076.

Demerens, C., B. Stankoff, M. Logak, P. Anglade, B. Allinquant, F. Couraud, B. Zalc and C. Lubetzki (1996). "Induction of myelination in the central nervous system by electrical activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(18): 9887-9892.

Do-Rego, J. L., A. G. Mensah-Nyagan, D. Beaujean, J. Leprince, M. C. Tonon, V. Luu-The, G. Pelletier and H. Vaudry (2001). "The octadecaneuropeptide ODN stimulates neurosteroid biosynthesis through activation of central-type benzodiazepine receptors." *J Neurochem* **76**(1): 128-138.

Do-Rego, J. L., A. G. Mensah-Nyagan, M. Feuilloley, P. Ferrara, G. Pelletier and H. Vaudry (1998). "The endozepine triakontatetrapeptide diazepam-binding inhibitor [17-50] stimulates neurosteroid biosynthesis in the frog hypothalamus." *Neuroscience* **83**(2): 555-570.

Do-Rego, J. L., G. A. Mensah-Nyagan, D. Beaujean, D. Vaudry, W. Sieghart, V. Luu-The, G. Pelletier and H. Vaudry (2000). "gamma-Aminobutyric acid, acting through gamma-aminobutyric acid type A receptors, inhibits the biosynthesis of neurosteroids in the frog hypothalamus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25): 13925-13930.

do Rego, J. C., M. H. Orta, J. Leprince, M. C. Tonon, H. Vaudry and J. Costentin (2007). "Pharmacological characterization of the receptor mediating the anorexigenic action of the octadecaneuropeptide: evidence for an endozepineric tone regulating food intake." *Neuropsychopharmacology* **32**(7): 1641-1648.

Do Rego, J. L., J. Y. Seong, D. Burel, J. Leprince, V. Luu-The, K. Tsutsui, M. C. Tonon, G. Pelletier and H. Vaudry (2009). "Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides." *Front Neuroendocrinol* **30**(3): 259-301.

Domercq, M., E. Etxebarría, A. Perez-Samartin and C. Matute (2005). "Excitotoxic oligodendrocyte death and axonal damage induced by glutamate transporter inhibition." *Glia* **52**(1): 36-46.

Dorfman, M. D., J. E. Krull, J. M. Scarlett, S. J. Guyenet, M. P. Sajan, V. Damian, H. T. Nguyen, M. Leitges, G. J. Morton, R. V. Farese, M. W. Schwartz and J. P. Thaler (2017). "Deletion of Protein Kinase C Lambda in POMC Neurons Predisposes to Diet-Induced Obesity." *Diabetes*.

Dowell, J. A., J. A. Johnson and L. Li (2009). "Identification of astrocyte secreted proteins with a combination of shotgun proteomics and bioinformatics." *J Proteome Res* **8**(8): 4135-4143.

Duran, J. M., C. Anjard, C. Stefan, W. F. Loomis and V. Malhotra (2010). "Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes." *J Cell Biol* **188**(4): 527-536.

Ebert, D., R. G. Haller and M. E. Walton (2003). "Energy contribution of octanoate to intact rat brain metabolism measured by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy." *J Neurosci* **23**(13): 5928-5935.

Eckel, R. H. and R. J. Robbins (1984). "Lipoprotein lipase is produced, regulated, and functional in rat brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(23): 7604-7607.

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

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

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

Edwards, C. M., C. R. Abbott, D. Sunter, M. Kim, C. L. Dakin, K. G. Murphy, S. Abusnana, S. Taheri, M. Rossi and S. R. Bloom (2000). "Cocaine- and amphetamine-regulated transcript, glucagon-like peptide-1 and corticotrophin releasing factor inhibit feeding via agouti-related protein independent pathways in the rat." *Brain Res* **866**(1-2): 128-134.

Edwards, F. A., A. J. Gibb and D. Colquhoun (1992). "ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system." *Nature* **359**(6391): 144-147.

Eide, F. F., D. H. Lowenstein and L. F. Reichardt (1993). "Neurotrophins and their receptors--current concepts and implications for neurologic disease." *Exp Neurol* **121**(2): 200-214.

Elholm, M., A. Garras, S. Neve, D. Tornehave, T. B. Lund, J. Skorve, T. Flatmark, K. Kristiansen and R. K. Berge (2000). "Long-chain acyl-CoA esters and acyl-CoA binding protein are present in the nucleus of rat liver cells." *J Lipid Res* **41**(4): 538-545.

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

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

Erecinska, M. and I. A. Silver (2001). "Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia." *Respir Physiol* **128**(3): 263-276.

Escartin, C., K. Pierre, A. Colin, E. Brouillet, T. Delzescaux, M. Guillermier, M. Dhenain, N. Deglon, P. Hantraye, L. Pellerin and G. Bonvento (2007). "Activation of astrocytes by CNTF induces metabolic plasticity and increases resistance to metabolic insults." *J Neurosci* **27**(27): 7094-7104.

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

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

Farzampour, Z., R. J. Reimer and J. Huguenard (2015). "Endozepines." *Adv Pharmacol* **72**: 147-164.

Fellin, T., O. Pascual, S. Gobbo, T. Pozzan, P. G. Haydon and G. Carmignoto (2004). "Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors." *Neuron* **43**(5): 729-743.

Ferrarese, C., F. Vaccarino, H. Alho, B. Mellstrom, E. Costa and A. Guidotti (1987). "Subcellular location and neuronal release of diazepam binding inhibitor." *J Neurochem* **48**(4): 1093-1102.

Ferrero, P., E. Costa, B. Conti-Tronconi and A. Guidotti (1986). "A diazepam binding inhibitor (DBI)-like neuropeptide is detected in human brain." *Brain Res* **399**(1): 136-142.

Ferrero, P., M. R. Santi, B. Conti-Tronconi, E. Costa and A. Guidotti (1986). "Study of an octadecaneuropeptide derived from diazepam binding inhibitor (DBI): biological activity and presence in rat brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(3): 827-831.

Fossat, P., F. R. Turpin, S. Sacchi, J. Dulong, T. Shi, J. M. Rivet, J. V. Sweedler, L. Pollegioni, M. J. Millan, S. H. Oliet and J. P. Mothet (2012). "Glial D-serine gates NMDA receptors at excitatory synapses in prefrontal cortex." *Cereb Cortex* **22**(3): 595-606.

Frank, M. G. (2013). "Astroglial regulation of sleep homeostasis." *Curr Opin Neurobiol* **23**(5): 812-818.

Gach, K., O. Belkacemi, B. Lefranc, P. Perlikowski, J. Masson, M. L. Walet-Balieu, J. C. Do-Rego, L. Galas, **D. Schapman**, R. Lamtahri, M. C. Tonon, D. Vaudry, J. Chuquet and J. Leprince (2015). "Detection, characterization and biological activities of [bisphospho-thr3,9]ODN, an endogenous molecular form of ODN released by astrocytes." *Neuroscience* **290**: 472-484.

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

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

Galanopoulou, A. S. (2010). "Mutations affecting GABAergic signaling in seizures and epilepsy." *Pflugers Arch* **460**(2): 505-523.

Gandolfo, P., E. Louiset, C. Patte, J. Leprince, O. Masmoudi, M. Malagon, F. Gracia-Navarro, H. Vaudry and M. C. Tonon (2001). "The triakontatetrapeptide TTN increases [Ca²⁺]_i in rat astrocytes through activation of peripheral-type benzodiazepine receptors." *Glia* **35**(2): 90-100.

Gandolfo, P., C. Patte, J. Leprince, J. L. Rego, A. G. Mensah-Nyagan, H. Vaudry and M. C. Tonon (2000). "The triakontatetrapeptide (TTN) stimulates thymidine incorporation in rat astrocytes through peripheral-type benzodiazepine receptors." *J Neurochem* **75**(2): 701-707.

Gandolfo, P., C. Patte, J. Leprince, J. L. Thoumas, H. Vaudry and M. C. Tonon (1997). "The stimulatory effect of the octadecaneuropeptide (ODN) on cytosolic Ca²⁺ in rat astrocytes is not mediated through classical benzodiazepine receptors." *Eur J Pharmacol* **322**(2-3): 275-281.

Gandolfo, P., C. Patte, J. L. Thoumas, J. Leprince, H. Vaudry and M. C. Tonon (1999). "The endozepine ODN stimulates [3H]thymidine incorporation in cultured rat astrocytes." *Neuropharmacology* **38**(5): 725-732.

Garcia-Caceres, C., E. Fuente-Martin, J. Argente and J. A. Chowen (2012). "Emerging role of glial cells in the control of body weight." *Mol Metab* **1**(1-2): 37-46.

Garcia-Caceres, C., C. X. Yi and M. H. Tschop (2013). "Hypothalamic astrocytes in obesity." *Endocrinol Metab Clin North Am* **42**(1): 57-66.

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

Gassmann, M. and B. Bettler (2012). "Regulation of neuronal GABA(B) receptor functions by subunit composition." *Nat Rev Neurosci* **13**(6): 380-394.

Gjedde, A. and C. Crone (1975). "Induction processes in blood-brain transfer of ketone bodies during starvation." *Am J Physiol* **229**(5): 1165-1169.

Gordon, G. R., K. J. Iremonger, S. Kantevari, G. C. Ellis-Davies, B. A. MacVicar and J. S. Bains (2009). "Astrocyte-mediated distributed plasticity at hypothalamic glutamate synapses." *Neuron* **64**(3): 391-403.

Grassi, F., A. M. Mileo, L. Monaco, A. Punturieri, A. Santoni and F. Eusebi (1994). "TNF-alpha increases the frequency of spontaneous miniature synaptic currents in cultured rat hippocampal neurons." *Brain Res* **659**(1-2): 226-230.

Grevengoed, T. J., E. L. Klett and R. A. Coleman (2014). "Acyl-CoA metabolism and partitioning." *Annu Rev Nutr* **34**: 1-30.

Gropp, E., M. Shanabrough, E. Borok, A. W. Xu, R. Janoschek, T. Buch, L. Plum, N. Balthasar, B. Hampel, A. Waisman, G. S. Barsh, T. L. Horvath and J. C. Bruning (2005). "Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding." *Nat Neurosci* **8**(10): 1289-1291.

Gruetter, R. (2003). "Glycogen: the forgotten cerebral energy store." *J Neurosci Res* **74**(2): 179-183.

Guidotti, A., C. M. Forchetti, M. G. Corda, D. Konkel, C. D. Bennett and E. Costa (1983). "Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(11): 3531-3535.

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

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

Guthrie, P. B., J. Knappenberger, M. Segal, M. V. Bennett, A. C. Charles and S. B. Kater (1999). "ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves." *J Neurosci* **19**(2): 520-528.

Guyenet, S. J., H. T. Nguyen, B. H. Hwang, M. W. Schwartz, D. G. Baskin and J. P. Thaler (2013). "High-fat diet feeding causes rapid, non-apoptotic cleavage of caspase-3 in astrocytes." *Brain Res* **1512**: 97-105.

Guzman, M. and C. Blazquez (2001). "Is there an astrocyte-neuron ketone body shuttle?" *Trends Endocrinol Metab* **12**(4): 169-173.

Gyllenstein, L. and T. Malmfors (1963). "Myelination of the optic nerve and its dependence on visual function--a quantitative investigation in mice." *J Embryol Exp Morphol* **11**: 255-266.

Hagan, M. M., P. A. Rushing, M. W. Schwartz, K. A. Yagaloff, P. Burn, S. C. Woods and R. J. Seeley (1999). "Role of the CNS melanocortin system in the response to overfeeding." *J Neurosci* **19**(6): 2362-2367.

Halassa, M. M., C. Florian, T. Fellin, J. R. Munoz, S. Y. Lee, T. Abel, P. G. Haydon and M. G. Frank (2009). "Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss." *Neuron* **61**(2): 213-219.

Hamdi, Y., H. Kaddour, D. Vaudry, S. Douiri, S. Bahdoudi, J. Leprince, H. Castel, H. Vaudry, M. Amri, M. C. Tonon and O. Masmoudi-Kouki (2012). "The stimulatory effect of the octadecaneuropeptide ODN on astroglial antioxidant enzyme systems is mediated through a GPCR." *Front Endocrinol (Lausanne)* **3**: 138.

Hamdi, Y., H. Kaddour, D. Vaudry, J. Leprince, A. Zarrouk, M. Hammami, H. Vaudry, M. C. Tonon, M. Amri and O. Masmoudi-Kouki (2015). "Octadecaneuropeptide ODN prevents hydrogen peroxide-induced oxidative damage of biomolecules in cultured rat astrocytes." *Peptides* **71**: 56-65.

Hamdi, Y., O. Masmoudi-Kouki, H. Kaddour, F. Belhadj, P. Gandolfo, D. Vaudry, M. Mokni, J. Leprince, R. Hachem, H. Vaudry, M. C. Tonon and M. Amri (2011). "Protective effect of the octadecaneuropeptide on hydrogen peroxide-induced oxidative stress and cell death in cultured rat astrocytes." *J Neurochem* **118**(3): 416-428.

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

Hamilton, N. B. and D. Attwell (2010). "Do astrocytes really exocytose neurotransmitters?" *Nat Rev Neurosci* **11**(4): 227-238.

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

Hansen, J. S., N. J. Faergeman, B. B. Kragelund and J. Knudsen (2008). "Acyl-CoA-binding protein (ACBP) localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi in a ligand-dependent manner in mammalian cells." *Biochem J* **410**(3): 463-472.

Harris, F. T., S. M. Rahman, M. Hassanein, J. Qian, M. D. Hoeksema, H. Chen, R. Eisenberg, P. Chaurand, R. M. Caprioli, M. Shiota and P. P. Massion (2014). "Acyl-coenzyme A-binding protein regulates Beta-oxidation required for growth and survival of non-small cell lung cancer." *Cancer Prev Res (Phila)* **7**(7): 748-757.

Harris, J. J., R. Jolivet and D. Attwell (2012). "Synaptic energy use and supply." *Neuron* **75**(5): 762-777.

Harvey Lodish, A. B., S. Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell. (2000). *Molecular Cell Biology*. Molecular Cell Biology. W. H. Freeman. New York.

Hasselbalch, S. G., G. M. Knudsen, J. Jakobsen, L. P. Hageman, S. Holm and O. B. Paulson (1995). "Blood-brain barrier permeability of glucose and ketone bodies during short-term starvation in humans." *Am J Physiol* **268**(6 Pt 1): E1161-1166.

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

Hayhurst, G. P., Y. H. Lee, G. Lambert, J. M. Ward and F. J. Gonzalez (2001). "Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis." *Mol Cell Biol* **21**(4): 1393-1403.

Heneka, M. T. and G. E. Landreth (2007). "PPARs in the brain." *Biochim Biophys Acta* **1771**(8): 1031-1045.

Henneberger, C., R. Juttner, T. Rothe and R. Grantyn (2002). "Postsynaptic action of BDNF on GABAergic synaptic transmission in the superficial layers of the mouse superior colliculus." *J Neurophysiol* **88**(2): 595-603.

Hepp, R., M. Perraut, S. Chasserot-Golaz, T. Galli, D. Aunis, K. Langley and N. J. Grant (1999). "Cultured glial cells express the SNAP-25 analogue SNAP-23." *Glia* **27**(2): 181-187.

Herculano-Houzel, S. (2014). "The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution." *Glia* **62**(9): 1377-1391.

Hermann, G. E., E. Viard and R. C. Rogers (2014). "Hindbrain glucoprivation effects on gastric vagal reflex circuits and gastric motility in the rat are suppressed by the astrocyte inhibitor fluorocitrate." *J Neurosci* **34**(32): 10488-10496.

Hertz, L. (2006). "Glutamate, a neurotransmitter--and so much more. A synopsis of Wierzba III." *Neurochem Int* **48**(6-7): 416-425.

Hertz, L., R. Dringen, A. Schousboe and S. R. Robinson (1999). "Astrocytes: glutamate producers for neurons." *J Neurosci Res* **57**(4): 417-428.

Hertz, L., L. Peng and G. A. Dienel (2007). "Energy metabolism in astrocytes: high rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis." *J Cereb Blood Flow Metab* **27**(2): 219-249.

Hildebrand, C., S. Remahl, H. Persson and C. Bjartmar (1993). "Myelinated nerve fibres in the CNS." *Prog Neurobiol* **40**(3): 319-384.

Hiltunen, J. K. and Y. Qin (2000). "beta-oxidation - strategies for the metabolism of a wide variety of acyl-CoA esters." *Biochim Biophys Acta* **1484**(2-3): 117-128.

Hines, D. J., R. M. Hines, S. J. Mulligan and B. A. Macvicar (2009). "Microglia processes block the spread of damage in the brain and require functional chloride channels." *Glia* **57**(15): 1610-1618.

Houades, V., A. Koulakoff, P. Ezan, I. Seif and C. Giaume (2008). "Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex." *J Neurosci* **28**(20): 5207-5217.

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

Hryhorczuk, C., M. Florea, D. Rodaros, I. Poirier, C. Daneault, C. Des Rosiers, A. Arvanitogiannis, T. Alquier and S. Fulton (2016). "Dampened Mesolimbic Dopamine Function and Signaling by Saturated but not Monounsaturated Dietary Lipids." *Neuropsychopharmacology* **41**(3): 811-821.

Hua, X., E. B. Malarkey, V. Sunjara, S. E. Rosenwald, W. H. Li and V. Parpura (2004). "Ca²⁺-dependent glutamate release involves two classes of endoplasmic reticulum Ca²⁺ stores in astrocytes." *J Neurosci Res* **76**(1): 86-97.

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

Hyder, F., D. L. Rothman and M. R. Bennett (2013). "Cortical energy demands of signaling and nonsignaling components in brain are conserved across mammalian species and activity levels." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(9): 3549-3554.

Itoh, Y., T. Esaki, K. Shimoji, M. Cook, M. J. Law, E. Kaufman and L. Sokoloff (2003). "Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(8): 4879-4884.

Ivanov, A., M. Mukhtarov, P. Bregestovski and Y. Zilberter (2011). "Lactate Effectively Covers Energy Demands during Neuronal Network Activity in Neonatal Hippocampal Slices." *Front Neuroenergetics* **3**: 2.

Izumi, Y., K. Ishii, H. Katsuki, A. M. Benz and C. F. Zorumski (1998). "beta-Hydroxybutyrate fuels synaptic function during development. Histological and physiological evidence in rat hippocampal slices." *J Clin Invest* **101**(5): 1121-1132.

Jacob, T. C., S. J. Moss and R. Jurd (2008). "GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition." *Nat Rev Neurosci* **9**(5): 331-343.

Jahn, O., S. Tenzer and H. B. Werner (2009). "Myelin proteomics: molecular anatomy of an insulating sheath." *Mol Neurobiol* **40**(1): 55-72.

Jakoby, P., E. Schmidt, I. Ruminot, R. Gutierrez, L. F. Barros and J. W. Deitmer (2014). "Higher transport and metabolism of glucose in astrocytes compared with neurons: a multiphoton study of hippocampal and cerebellar tissue slices." *Cereb Cortex* **24**(1): 222-231.

Jiménez-González, C., T. Pirttimaki, D. W. Cope and H. R. Parri (2011). "Non-neuronal, slow GABA signalling in the ventrobasal thalamus targets δ -subunit-containing GABA(A) receptors." *Eur J Neurosci* **33**(8): 1471-1482.

Jo, Y. H., Y. Su, R. Gutierrez-Juarez and S. Chua, Jr. (2009). "Oleic acid directly regulates POMC neuron excitability in the hypothalamus." *J Neurophysiol* **101**(5): 2305-2316.

Jourdain, P., L. H. Bergersen, K. Bhaukaurally, P. Bezzi, M. Santello, M. Domercq, C. Matute, F. Tonello, V. Gundersen and A. Volterra (2007). "Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength." *Nat Neurosci* **10**(3): 331-339.

Jow, F., D. Chiu, H. K. Lim, T. Novak and S. Lin (2004). "Production of GABA by cultured hippocampal glial cells." *Neurochem Int* **45**(2-3): 273-283.

Kacem, K., P. Lacombe, J. Seylaz and G. Bonvento (1998). "Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study." *Glia* **23**(1): 1-10.

Kalra, S. P., M. G. Dube, S. Pu, B. Xu, T. L. Horvath and P. S. Kalra (1999). "Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight." *Endocr Rev* **20**(1): 68-100.

Karatayev, O., V. Gaysinskaya, G. Q. Chang and S. F. Leibowitz (2009). "Circulating triglycerides after a high-fat meal: predictor of increased caloric intake, orexigenic peptide expression, and dietary obesity." *Brain Res* **1298**: 111-122.

Kasser, T. R., R. B. Harris and R. J. Martin (1985). "Level of satiety: fatty acid and glucose metabolism in three brain sites associated with feeding." *Am J Physiol* **248**(4 Pt 2): R447-452.

Kassis, S., M. Olasmaa, L. Terenius and P. H. Fishman (1987). "Neuropeptide Y inhibits cardiac adenylate cyclase through a pertussis toxin-sensitive G protein." *J Biol Chem* **262**(8): 3429-3431.

Katoh-Semba, R., H. Keino and S. Kashiwamata (1988). "A possible contribution by glial cells to neuronal energy production: enzyme-histochemical studies in the developing rat cerebellum." *Cell Tissue Res* **252**(1): 133-139.

Kavaliers, M. and M. Hirst (1986). "An octadecaneuropeptide (ODN) derived from diazepam binding inhibitor increases aggressive interactions in mice." *Brain Res* **383**(1-2): 343-349.

Kennedy, G. C. (1953). "The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **140**(901): 578-596.

Kew, J. N. and J. A. Kemp (2005). "Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology." *Psychopharmacology (Berl)* **179**(1): 4-29.

Kierdorf, K., D. Erny, T. Goldmann, V. Sander, C. Schulz, E. G. Perdiguero, P. Wieghofer, A. Heinrich, P. Riemke, C. Holscher, D. N. Muller, B. Luckow, T. Brocker, K. Debowski, G. Fritz, G. Opdenakker, A. Diefenbach, K. Biber, M. Heikenwalder, F. Geissmann, F. Rosenbauer and M. Prinz (2013). "Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways." *Nat Neurosci* **16**(3): 273-280.

Kimelberg, H. K. (2004). "The problem of astrocyte identity." *Neurochem Int* **45**(2-3): 191-202.

Kinseth, M. A., C. Anjard, D. Fuller, G. Guizzunti, W. F. Loomis and V. Malhotra (2007). "The Golgi-associated protein GRASP is required for unconventional protein secretion during development." *Cell* **130**(3): 524-534.

Kirmse, K., M. Kummer, Y. Kovalchuk, O. W. Witte, O. Garaschuk and K. Holthoff (2015). "GABA depolarizes immature neurons and inhibits network activity in the neonatal neocortex in vivo." *Nat Commun* **6**: 7750.

Kishi, T., C. J. Aschkenasi, C. E. Lee, K. G. Mountjoy, C. B. Saper and J. K. Elmquist (2003). "Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat." *J Comp Neurol* **457**(3): 213-235.

Kitson, A. P., T. L. Smith, K. A. Marks and K. D. Stark (2012). "Tissue-specific sex differences in docosahexaenoic acid and Delta6-desaturase in rats fed a standard chow diet." *Appl Physiol Nutr Metab* **37**(6): 1200-1211.

Knudsen, J., N. J. Faergeman, H. Skott, R. Hummel, C. Borsting, T. M. Rose, J. S. Andersen, P. Hojrup, P. Roepstorff and K. Kristiansen (1994). "Yeast acyl-CoA-binding protein: acyl-CoA-binding affinity and effect on intracellular acyl-CoA pool size." *Biochem J* **302** (Pt 2): 479-485.

Knudsen, J., P. Hojrup, H. O. Hansen, H. F. Hansen and P. Roepstorff (1989). "Acyl-CoA-binding protein in the rat. Purification, binding characteristics, tissue concentrations and amino acid sequence." *Biochem J* **262**(2): 513-519.

Knudsen, J., M. V. Jensen, J. K. Hansen, N. J. Faergeman, T. B. Neergaard and B. Gaigg (1999). "Role of acylCoA binding protein in acylCoA transport, metabolism and cell signaling." *Mol Cell Biochem* **192**(1-2): 95-103.

Knudsen, J., S. Mandrup, J. T. Rasmussen, P. H. Andreasen, F. Poulsen and K. Kristiansen (1993). "The function of acyl-CoA-binding protein (ACBP)/diazepam binding inhibitor (DBI)." *Mol Cell Biochem* **123**(1-2): 129-138.

Knudsen, J. and M. Nielsen (1990). "Diazepam-binding inhibitor: a neuropeptide and/or an acyl-CoA ester binding protein?" *Biochem J* **265**(3): 927-929.

Koulen, P., M. Sassoe-Pognetto, U. Grunert and H. Wassle (1996). "Selective clustering of GABA(A) and glycine receptors in the mammalian retina." *J Neurosci* **16**(6): 2127-2140.

Kozlov, A. S., M. C. Angulo, E. Audinat and S. Charpak (2006). "Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(26): 10058-10063.

Krueger, J. M. (2008). "The role of cytokines in sleep regulation." *Curr Pharm Des* **14**(32): 3408-3416.

Krueger, K. E. and V. Papadopoulos (1990). "Peripheral-type benzodiazepine receptors mediate translocation of cholesterol from outer to inner mitochondrial membranes in adrenocortical cells." *J Biol Chem* **265**(25): 15015-15022.

Krzan, M., M. Stenovec, M. Kreft, T. Pangrsic, S. Grilc, P. G. Haydon and R. Zorec (2003). "Calcium-dependent exocytosis of atrial natriuretic peptide from astrocytes." *J Neurosci* **23**(5): 1580-1583.

Kunau, W. H., V. Dommes and H. Schulz (1995). "beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress." *Prog Lipid Res* **34**(4): 267-342.

Lafon-Cazal, M., O. Adjali, N. Galeotti, J. Poncet, P. Jouin, V. Homburger, J. Bockaert and P. Marin (2003). "Proteomic analysis of astrocytic secretion in the mouse. Comparison with the cerebrospinal fluid proteome." *J Biol Chem* **278**(27): 24438-24448.

Lam, T. K., A. Pocai, R. Gutierrez-Juarez, S. Obici, J. Bryan, L. Aguilar-Bryan, G. J. Schwartz and L. Rossetti (2005). "Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis." *Nat Med* **11**(3): 320-327.

Lam, T. K., G. J. Schwartz and L. Rossetti (2005). "Hypothalamic sensing of fatty acids." *Nat Neurosci* **8**(5): 579-584.

Lamacz, M., M. C. Tonon, F. Smih-Rouet, C. Patte, P. Gasque, M. Fontaine and H. Vaudry (1996). "The endogenous benzodiazepine receptor ligand ODN increases cytosolic calcium in cultured rat astrocytes." *Brain Res Mol Brain Res* **37**(1-2): 290-296.

Lambert, P. D., P. R. Couceyro, K. M. McGirr, S. E. Dall Vechia, Y. Smith and M. J. Kuhar (1998). "CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y." *Synapse* **29**(4): 293-298.

Landrock, D., B. P. Atshaves, A. L. McIntosh, K. K. Landrock, F. Schroeder and A. B. Kier (2010). "Acyl-CoA binding protein gene ablation induces pre-implantation embryonic lethality in mice." *Lipids* **45**(7): 567-580.

Lanfray, D., S. Arthaud, J. Ouellet, V. Compere, J. L. Do Rego, J. Leprince, B. Lefranc, H. Castel, C. Bouchard, B. Monge-Roffarello, D. Richard, G. Pelletier, H. Vaudry, M. C. Tonon and F. Morin (2013). "Gliotransmission and brain glucose sensing: critical role of endozepines." *Diabetes* **62**(3): 801-810.

Lau, L. T. and A. C. Yu (2001). "Astrocytes produce and release interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma following traumatic and metabolic injury." *J Neurotrauma* **18**(3): 351-359.

Le Foll, C., A. A. Dunn-Meynell, H. M. Mizioroko and B. E. Levin (2014). "Regulation of hypothalamic neuronal sensing and food intake by ketone bodies and Fatty acids." *Diabetes* **63**(4): 1259-1269.

Le Foll, C., A. A. Dunn-Meynell, H. M. Mizioroko and B. E. Levin (2015). "Role of VMH ketone bodies in adjusting caloric intake to increased dietary fat content in DIO and DR rats." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **308**(10): R872-878.

Le Meur, K., J. Mendizabal-Zubiaga, P. Grandes and E. Audinat (2012). "GABA release by hippocampal astrocytes." *Front Comput Neurosci* **6**: 59.

Lebon, V., K. F. Petersen, G. W. Cline, J. Shen, G. F. Mason, S. Dufour, K. L. Behar, G. I. Shulman and D. L. Rothman (2002). "Astroglial contribution to brain energy metabolism in humans revealed by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy: elucidation of the dominant pathway for neurotransmitter glutamate repletion and measurement of astrocytic oxidative metabolism." *J Neurosci* **22**(5): 1523-1531.

Lee, D. A., J. L. Bedont, T. Pak, H. Wang, J. Song, A. Miranda-Angulo, V. Takiar, V. Charubhumi, F. Balordi, H. Takebayashi, S. Aja, E. Ford, G. Fishell and S. Blackshaw (2012). "Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche." *Nat Neurosci* **15**(5): 700-702.

Lee, L., C. A. DeBono, D. R. Campagna, D. C. Young, D. B. Moody and M. D. Fleming (2007). "Loss of the acyl-CoA binding protein (Acbp) results in fatty acid metabolism abnormalities in mouse hair and skin." *J Invest Dermatol* **127**(1): 16-23.

Leino, R. L., D. Z. Gerhart and L. R. Drewes (1999). "Monocarboxylate transporter (MCT1) abundance in brains of suckling and adult rats: a quantitative electron microscopic immunogold study." *Brain Res Dev Brain Res* **113**(1-2): 47-54.

Leprince, J., P. Gandolfo, J. L. Thoumas, C. Patte, J. L. Fauchere, H. Vaudry and M. C. Tonon (1998). "Structure-activity relationships of a series of analogues of the octadecaneuropeptide ODN on calcium mobilization in rat astrocytes." *J Med Chem* **41**(23): 4433-4438.

Leprince, J., H. Oulyadi, D. Vaudry, O. Masmoudi, P. Gandolfo, C. Patte, J. Costentin, J. L. Fauchere, D. Davoust, H. Vaudry and M. C. Tonon (2001). "Synthesis, conformational analysis and biological activity

of cyclic analogs of the octadecaneuropeptide ODN. Design of a potent endozepine antagonist." *Eur J Biochem* **268**(23): 6045-6057.

Lewandowski, E. D., M. V. Chari, R. Roberts and D. L. Johnston (1991). "NMR studies of beta-oxidation and short-chain fatty acid metabolism during recovery of reperfused hearts." *Am J Physiol* **261**(2 Pt 2): H354-363.

Lewis, S. E., L. L. Listenberger, D. S. Ory and J. E. Schaffer (2001). "Membrane topology of the murine fatty acid transport protein 1." *J Biol Chem* **276**(40): 37042-37050.

Li, Y. X., Y. Zhang, H. A. Lester, E. M. Schuman and N. Davidson (1998). "Enhancement of neurotransmitter release induced by brain-derived neurotrophic factor in cultured hippocampal neurons." *J Neurosci* **18**(24): 10231-10240.

Libby, A. E., H. Wang, R. Mittal, M. Sungelo, E. Potma and R. H. Eckel (2015). "Lipoprotein lipase is an important modulator of lipid uptake and storage in hypothalamic neurons." *Biochem Biophys Res Commun* **465**(2): 287-292.

Liu, J. J., P. Green, J. John Mann, S. I. Rapoport and M. E. Sublette (2015). "Pathways of polyunsaturated fatty acid utilization: implications for brain function in neuropsychiatric health and disease." *Brain Res* **1597**: 220-246.

Liu, Q. S., Q. Xu, J. Kang and M. Nedergaard (2004). "Astrocyte activation of presynaptic metabotropic glutamate receptors modulates hippocampal inhibitory synaptic transmission." *Neuron Glia Biol* **1**(4): 307-316.

Loftus, T. M., D. E. Jaworsky, G. L. Frehywot, C. A. Townsend, G. V. Ronnett, M. D. Lane and F. P. Kuhajda (2000). "Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors." *Science* **288**(5475): 2379-2381.

Loh, K., H. Herzog and Y. C. Shi (2015). "Regulation of energy homeostasis by the NPY system." *Trends Endocrinol Metab* **26**(3): 125-135.

Lohof, A. M., N. Y. Ip and M. M. Poo (1993). "Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF." *Nature* **363**(6427): 350-353.

Loomis, W. F., M. M. Behrens, M. E. Williams and C. Anjard (2010). "Pregnenolone sulfate and cortisol induce secretion of acyl-CoA-binding protein and its conversion into endozepines from astrocytes." *J Biol Chem* **285**(28): 21359-21365.

Lopaschuk, G. D., J. R. Ussher, C. D. Folmes, J. S. Jaswal and W. C. Stanley (2010). "Myocardial fatty acid metabolism in health and disease." *Physiol Rev* **90**(1): 207-258.

Lukats, B., R. Egyed and Z. Karadi (2005). "Single neuron activity changes to interleukin-1beta in the orbitofrontal cortex of the rat." *Brain Res* **1038**(2): 243-246.

Luquet, S. and C. Magnan (2009). "The central nervous system at the core of the regulation of energy homeostasis." *Front Biosci (Schol Ed)* **1**: 448-465.

Luquet, S., F. A. Perez, T. S. Hnasko and R. D. Palmiter (2005). "NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates." *Science* **310**(5748): 683-685.

MacDonald, P. E., J. W. Joseph and P. Rorsman (2005). "Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**(1464): 2211-2225.

Madadi, G., P. S. Dalvi and D. D. Belsham (2008). "Regulation of brain insulin mRNA by glucose and glucagon-like peptide 1." *Biochem Biophys Res Commun* **376**(4): 694-699.

Maekawa, M., Y. Iwayama, T. Ohnishi, M. Toyoshima, C. Shimamoto, Y. Hisano, T. Toyota, S. Balan, H. Matsuzaki, Y. Iwata, S. Takagai, K. Yamada, M. Ota, S. Fukuchi, Y. Okada, W. Akamatsu, M. Tsujii, N. Kojima, Y. Owada, H. Okano, N. Mori and T. Yoshikawa (2015). "Investigation of the fatty acid transporter-encoding genes SLC27A3 and SLC27A4 in autism." *Sci Rep* **5**: 16239.

Magistretti, P. J. (2006). "Neuron-glia metabolic coupling and plasticity." *J Exp Biol* **209**(Pt 12): 2304-2311.

Magistretti, P. J. and L. Pellerin (1999). "Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain." *News Physiol Sci* **14**: 177-182.

Magnan, C., S. Collins, M. F. Berthault, N. Kassis, M. Vincent, M. Gilbert, L. Penicaud, A. Ktorza and F. Assimacopoulos-Jeannet (1999). "Lipid infusion lowers sympathetic nervous activity and leads to increased beta-cell responsiveness to glucose." *J Clin Invest* **103**(3): 413-419.

Manjithaya, R., C. Anjard, W. F. Loomis and S. Subramani (2010). "Unconventional secretion of *Pichia pastoris* Acb1 is dependent on GRASP protein, peroxisomal functions, and autophagosome formation." *J Cell Biol* **188**(4): 537-546.

Marshall, F. H., K. A. Jones, K. Kaupmann and B. Bettler (1999). "GABAB receptors - the first 7TM heterodimers." *Trends Pharmacol Sci* **20**(10): 396-399.

Martin, G. G., H. Huang, B. P. Atshaves, B. Binas and F. Schroeder (2003). "Ablation of the liver fatty acid binding protein gene decreases fatty acyl CoA binding capacity and alters fatty acyl CoA pool distribution in mouse liver." *Biochemistry* **42**(39): 11520-11532.

Martineau, M., G. Baux and J. P. Mothet (2006). "Gliotransmission at central glutamatergic synapses: D-serine on stage." *J Physiol Paris* **99**(2-3): 103-110.

Marty, N., M. Dallaporta, M. Foretz, M. Emery, D. Tarussio, I. Bady, C. Binnert, F. Beermann and B. Thorens (2005). "Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors." *J Clin Invest* **115**(12): 3545-3553.

Marty, N., M. Dallaporta and B. Thorens (2007). "Brain glucose sensing, counterregulation, and energy homeostasis." *Physiology (Bethesda)* **22**: 241-251.

Masmoudi-Kouki, O., P. Gandolfo, J. Leprince, D. Vaudry, G. Pelletier, A. Fournier, H. Vaudry and M. C. Tonon (2006). "PACAP stimulates biosynthesis and release of endozepines from rat astrocytes." *Ann N Y Acad Sci* **1070**: 411-416.

Massotti, M. and A. Guidotti (1980). "Endogenous regulators of benzodiazepine recognition sites." *Life Sci* **27**(10): 847-854.

Mathiisen, T. M., K. P. Lehre, N. C. Danbolt and O. P. Ottersen (2010). "The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction." *Glia* **58**(9): 1094-1103.

Matsuda, K., K. Kojima, K. Wada, K. Maruyama, J. Leprince, M. C. Tonon, M. Uchiyama and H. Vaudry (2010). "The anorexigenic action of the octadecaneuropeptide (ODN) in goldfish is mediated through the MC4R- and subsequently the CRH receptor-signaling pathways." *J Mol Neurosci* **42**(1): 74-79.

Matsuda, K., K. Wada, T. Miura, K. Maruyama, S. I. Shimakura, M. Uchiyama, J. Leprince, M. C. Tonon and H. Vaudry (2007). "Effect of the diazepam-binding inhibitor-derived peptide, octadecaneuropeptide, on food intake in goldfish." *Neuroscience* **150**(2): 425-432.

Mayer, J. (1953). "Glucostatic mechanism of regulation of food intake." *N Engl J Med* **249**(1): 13-16.

Mayer, J. (1955). "Regulation of energy intake and the body weight: the glucostatic theory and the lipostatic hypothesis." *Ann N Y Acad Sci* **63**(1): 15-43.

McDougal, D. H., G. E. Hermann and R. C. Rogers (2013). "Astrocytes in the nucleus of the solitary tract are activated by low glucose or glucoprivation: evidence for glial involvement in glucose homeostasis." *Front Neurosci* **7**: 249.

McKenna, M. C. (2012). "Substrate competition studies demonstrate oxidative metabolism of glucose, glutamate, glutamine, lactate and 3-hydroxybutyrate in cortical astrocytes from rat brain." *Neurochem Res* **37**(11): 2613-2626.

McKenzie, J. C., Y. W. Juan, C. R. Thomas, N. E. Berman and R. M. Klein (2001). "Atrial natriuretic peptide-like immunoreactivity in neurons and astrocytes of human cerebellum and inferior olivary complex." *J Histochem Cytochem* **49**(11): 1453-1467.

- Mehta, A. K.** and M. K. Ticku (1999). "An update on GABAA receptors." *Brain Res Brain Res Rev* **29**(2-3): 196-217.
- Millington, G. W.** (2007). "The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour." *Nutr Metab (Lond)* **4**: 18.
- Minokoshi, Y.,** T. Alquier, N. Furukawa, Y. B. Kim, A. Lee, B. Xue, J. Mu, F. Fofelle, P. Ferre, M. J. Birnbaum, B. J. Stuck and B. B. Kahn (2004). "AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus." *Nature* **428**(6982): 569-574.
- Mitchell, R. W.,** N. H. On, M. R. Del Bigio, D. W. Miller and G. M. Hatch (2011). "Fatty acid transport protein expression in human brain and potential role in fatty acid transport across human brain microvessel endothelial cells." *J Neurochem* **117**(4): 735-746.
- Mizuno, M.,** K. Yamada, J. He, A. Nakajima and T. Nabeshima (2003). "Involvement of BDNF receptor TrkB in spatial memory formation." *Learn Mem* **10**(2): 108-115.
- Mizuno, T. M.,** S. P. Kleopoulos, H. T. Bergen, J. L. Roberts, C. A. Priest and C. V. Mobbs (1998). "Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin." *Diabetes* **47**(2): 294-297.
- Mogensen, I. B.,** H. Schulenberg, H. O. Hansen, F. Spener and J. Knudsen (1987). "A novel acyl-CoA-binding protein from bovine liver. Effect on fatty acid synthesis." *Biochem J* **241**(1): 189-192.
- Mohler, H.** (2014). "Endogenous benzodiazepine site peptide ligands operating bidirectionally in vivo in neurogenesis and thalamic oscillations." *Neurochem Res* **39**(6): 1032-1036.
- Montana, V.,** E. B. Malarkey, C. Verderio, M. Matteoli and V. Parpura (2006). "Vesicular transmitter release from astrocytes." *Glia* **54**(7): 700-715.
- Moraga-Amaro, R.,** J. M. Jerez-Baraona, F. Simon and J. Stehberg (2014). "Role of astrocytes in memory and psychiatric disorders." *J Physiol Paris* **108**(4-6): 240-251.
- Morgan, J. I.,** M. D. Johnson, J. K. Wang, K. H. Sonnenfeld and S. Spector (1985). "Peripheral-type benzodiazepines influence ornithine decarboxylase levels and neurite outgrowth in PC12 cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(15): 5223-5226.
- Morgan, K.,** S. Obici and L. Rossetti (2004). "Hypothalamic responses to long-chain fatty acids are nutritionally regulated." *J Biol Chem* **279**(30): 31139-31148.
- Morohaku, K.,** S. H. Pelton, D. J. Daugherty, W. R. Butler, W. Deng and V. Selvaraj (2014). "Translocator protein/peripheral benzodiazepine receptor is not required for steroid hormone biosynthesis." *Endocrinology* **155**(1): 89-97.
- Morris, A. A.** (2005). "Cerebral ketone body metabolism." *J Inherit Metab Dis* **28**(2): 109-121.
- Mothet, J. P.,** A. T. Parent, H. Wolosker, R. O. Brady, Jr., D. J. Linden, C. D. Ferris, M. A. Rogawski and S. H. Snyder (2000). "D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(9): 4926-4931.
- Mothet, J. P.,** L. Pollegioni, G. Ouanounou, M. Martineau, P. Fossier and G. Baux (2005). "Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(15): 5606-5611.
- Mouille, V. S.,** C. Le Foll, E. Philippe, N. Kassis, C. Rouch, N. Marsollier, L. C. Bui, C. Guissard, J. Dairou, A. Lorsignol, L. Penicaud, B. E. Levin, C. Cruciani-Guglielmacci and C. Magnan (2013). "Fatty acid transporter CD36 mediates hypothalamic effect of fatty acids on food intake in rats." *PLoS One* **8**(9): e74021.
- Myers, M. G., Jr.** and D. P. Olson (2012). "Central nervous system control of metabolism." *Nature* **491**(7424): 357-363.
- Naruse, T.** (1994). "Effects of repeated intravenous administration of diazepam on food intake in rats." *Fundam Clin Pharmacol* **8**(4): 379-384.

Ndubaku, U. and M. E. de Bellard (2008). "Glial cells: old cells with new twists." *Acta Histochem* **110**(3): 182-195.

Nedergaard, M., B. Ransom and S. A. Goldman (2003). "New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain." *Trends Neurosci* **26**(10): 523-530.

Neess, D., S. Bek, M. Bloksgaard, A. B. Marcher, N. J. Faergeman and S. Mandrup (2013). "Delayed hepatic adaptation to weaning in ACBP-/- mice is caused by disruption of the epidermal barrier." *Cell Rep* **5**(5): 1403-1412.

Neess, D., M. Bloksgaard, S. Bek, A. B. Marcher, I. C. Elle, T. Helledie, M. Due, V. Pagmantidis, B. Finsen, J. Wilbertz, M. Kruhoffer, N. Faergeman and S. Mandrup (2011). "Disruption of the acyl-CoA-binding protein gene delays hepatic adaptation to metabolic changes at weaning." *J Biol Chem* **286**(5): 3460-3472.

Neess, D., P. Kiilerich, M. B. Sandberg, T. Helledie, R. Nielsen and S. Mandrup (2006). "ACBP--a PPAR and SREBP modulated housekeeping gene." *Mol Cell Biochem* **284**(1-2): 149-157.

Nehlig, A. (2004). "Brain uptake and metabolism of ketone bodies in animal models." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **70**(3): 265-275.

Newman, L. A., D. L. Korol and P. E. Gold (2011). "Lactate produced by glycogenolysis in astrocytes regulates memory processing." *PLoS One* **6**(12): e28427.

Nikawa, J., T. Tanabe, H. Ogiwara, T. Shiba and S. Numa (1979). "Inhibitory effects of long-chain acyl coenzyme A analogues on rat liver acetyl coenzyme A carboxylase." *FEBS Lett* **102**(2): 223-226.

Nishiyama, A., A. Chang and B. D. Trapp (1999). "NG2+ glial cells: a novel glial cell population in the adult brain." *J Neuropathol Exp Neurol* **58**(11): 1113-1124.

Nishiyama, A., Z. Yang and A. Butt (2005). "Astrocytes and NG2-glia: what's in a name?" *J Anat* **207**(6): 687-693.

Niswender, K. D. and M. W. Schwartz (2003). "Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities." *Front Neuroendocrinol* **24**(1): 1-10.

Nogami, M., J. Shiga, A. Takatsu, N. Endo and I. Ishiyama (2001). "Immunohistochemistry of atrial natriuretic peptide in brain infarction." *Histochem J* **33**(2): 87-90.

Oberheim, N. A., T. Takano, X. Han, W. He, J. H. Lin, F. Wang, Q. Xu, J. D. Wyatt, W. Pilcher, J. G. Ojemann, B. R. Ransom, S. A. Goldman and M. Nedergaard (2009). "Uniquely hominid features of adult human astrocytes." *J Neurosci* **29**(10): 3276-3287.

Oberheim, N. A., X. Wang, S. Goldman and M. Nedergaard (2006). "Astrocytic complexity distinguishes the human brain." *Trends Neurosci* **29**(10): 547-553.

Obici, S., Z. Feng, A. Arduini, R. Conti and L. Rossetti (2003). "Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production." *Nat Med* **9**(6): 756-761.

Obici, S., Z. Feng, K. Morgan, D. Stein, G. Karkanas and L. Rossetti (2002). "Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake." *Diabetes* **51**(2): 271-275.

Ogata, K. and T. Kosaka (2002). "Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus." *Neuroscience* **113**(1): 221-233.

Ogiwara, H., T. Tanabe, J. Nikawa and S. Numa (1978). "Inhibition of rat-liver acetyl-coenzyme-A carboxylase by palmitoyl-coenzyme A. Formation of equimolar enzyme-inhibitor complex." *Eur J Biochem* **89**(1): 33-41.

Ogunbode, A. M., M. Ladipo, I. O. Ajayi and A. A. Fatiregun (2011). "Obesity: an emerging disease." *Niger J Clin Pract* **14**(4): 390-394.

Oh, Y. T., J. Kim, I. Kang and J. H. Youn (2014). "Regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis by circulating free fatty acids in male Wistar rats: role of individual free fatty acids." *Endocrinology* **155**(3): 923-931.

Oh, Y. T., K. S. Oh, I. Kang and J. H. Youn (2012). "A Fall in plasma free fatty acid (FFA) level activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis independent of plasma glucose: evidence for brain sensing of circulating FFA." *Endocrinology* **153**(8): 3587-3592.

Oikari, S., T. Ahtialansaari, M. V. Heinonen, T. Mauriala, S. Auriola, K. Kiehne, U. R. Folsch, J. Janne, L. Alhonen and K. H. Herzig (2008). "Downregulation of PPARs and SREBP by acyl-CoA-binding protein overexpression in transgenic rats." *Pflugers Arch* **456**(2): 369-377.

Ollmann, M. M., B. D. Wilson, Y. K. Yang, J. A. Kerns, Y. Chen, I. Gantz and G. S. Barsh (1997). "Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein." *Science* **278**(5335): 135-138.

Oomura, Y., T. Nakamura, M. Sugimori and Y. Yamada (1975). "Effect of free fatty acid on the rat lateral hypothalamic neurons." *Physiol Behav* **14**(04): 483-486.

Ouellet, M., V. Emond, C. T. Chen, C. Julien, F. Bourasset, S. Oddo, F. LaFerla, R. P. Bazinet and F. Calon (2009). "Diffusion of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids through the blood-brain barrier: An in situ cerebral perfusion study." *Neurochem Int* **55**(7): 476-482.

Pál, B. (2015). "Astrocytic Actions on Extrasynaptic Neuronal Currents." *Front Cell Neurosci* **9**: 474.

Pan, J. W., T. L. Rothman, K. L. Behar, D. T. Stein and H. P. Hetherington (2000). "Human brain beta-hydroxybutyrate and lactate increase in fasting-induced ketosis." *J Cereb Blood Flow Metab* **20**(10): 1502-1507.

Panatier, A., M. Arizono and U. V. Nägerl (2014). "Dissecting tripartite synapses with STED microscopy." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **369**(1654): 20130597.

Panatier, A., D. T. Theodosis, J. P. Mothet, B. Touquet, L. Pollegioni, D. A. Poulain and S. H. Oliet (2006). "Glial-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory." *Cell* **125**(4): 775-784.

Papadopoulos, V., H. Amri, N. Boujrad, C. Cascio, M. Culty, M. Garnier, M. Hardwick, H. Li, B. Vidic, A. S. Brown, J. L. Reversa, J. M. Bernassau and K. Drieu (1997). "Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis." *Steroids* **62**(1): 21-28.

Papadopoulos, V., M. Baraldi, T. R. Guilarte, T. B. Knudsen, J. J. Lacapere, P. Lindemann, M. D. Norenberg, D. Nutt, A. Weizman, M. R. Zhang and M. Gavish (2006). "Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function." *Trends Pharmacol Sci* **27**(8): 402-409.

Parish, C. L., D. I. Finkelstein, W. Tripanichkul, A. R. Satoskar, J. Drago and M. K. Horne (2002). "The role of interleukin-1, interleukin-6, and glia in inducing growth of neuronal terminal arbors in mice." *J Neurosci* **22**(18): 8034-8041.

Parker, J. A. and S. R. Bloom (2012). "Hypothalamic neuropeptides and the regulation of appetite." *Neuropharmacology* **63**(1): 18-30.

Parpura, V., T. A. Basarsky, F. Liu, K. Jeftinija, S. Jeftinija and P. G. Haydon (1994). "Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling." *Nature* **369**(6483): 744-747.

Parpura, V. and R. Zorec (2010). "Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes." *Brain Res Rev* **63**(1-2): 83-92.

Parton, L. E., C. P. Ye, R. Coppari, P. J. Enriori, B. Choi, C. Y. Zhang, C. Xu, C. R. Vianna, N. Balthasar, C. E. Lee, J. K. Elmquist, M. A. Cowley and B. B. Lowell (2007). "Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity." *Nature* **449**(7159): 228-232.

Patte, C., H. Vaudry, L. Desrues, P. Gandolfo, I. Strijdsveen, M. Lamacz and M. C. Tonon (1995). "The endozepine ODN stimulates polyphosphoinositide metabolism in rat astrocytes." *FEBS Lett* **362**(2): 106-110.

Pawlikowski, M., J. Kunert-Radek, A. Radek and H. Stepien (1988). "Inhibition of cell proliferation of human gliomas by benzodiazepines in vitro." *Acta Neurol Scand* **77**(3): 231-233.

Pellerin, L. and P. J. Magistretti (1994). "Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(22): 10625-10629.

Pellerin, L. and P. J. Magistretti (2004). "Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons." *Neuroscientist* **10**(1): 53-62.

Pellerin, L., G. Pellegrini, P. G. Bittar, Y. Charnay, C. Bouras, J. L. Martin, N. Stella and P. J. Magistretti (1998). "Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle." *Dev Neurosci* **20**(4-5): 291-299.

Pelvig, D. P., H. Pakkenberg, A. K. Stark and B. Pakkenberg (2008). "Neocortical glial cell numbers in human brains." *Neurobiol Aging* **29**(11): 1754-1762.

Perea, G. and A. Araque (2005). "Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes." *J Neurosci* **25**(9): 2192-2203.

Perea, G. and A. Araque (2010). "GLIA modulates synaptic transmission." *Brain Res Rev* **63**(1-2): 93-102.

Perea, G., M. Navarrete and A. Araque (2009). "Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information." *Trends Neurosci* **32**(8): 421-431.

Perea, G., M. Sur and A. Araque (2014). "Neuron-glia networks: integral gear of brain function." *Front Cell Neurosci* **8**: 378.

Petrescu, A. D., H. R. Payne, A. Boedecker, H. Chao, R. Hertz, J. Bar-Tana, F. Schroeder and A. B. Kier (2003). "Physical and functional interaction of Acyl-CoA-binding protein with hepatocyte nuclear factor-4 alpha." *J Biol Chem* **278**(51): 51813-51824.

Picard, A., C. Rouch, N. Kassis, V. S. Moulle, S. Croizier, R. G. Denis, J. Castel, N. Coant, K. Davis, D. J. Clegg, S. C. Benoit, V. Prevot, S. Bouret, S. Luquet, H. Le Stunff, C. Cruciani-Guglielmacci and C. Magnan (2014). "Hippocampal lipoprotein lipase regulates energy balance in rodents." *Mol Metab* **3**(2): 167-176.

Pilone, M. S. (2000). "D-Amino acid oxidase: new findings." *Cell Mol Life Sci* **57**(12): 1732-1747.

Pistell, P. J., C. D. Morrison, S. Gupta, A. G. Knight, J. N. Keller, D. K. Ingram and A. J. Bruce-Keller (2010). "Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation." *J Neuroimmunol* **219**(1-2): 25-32.

Pleasure, D. (2008). "Diagnostic and pathogenic significance of glutamate receptor autoantibodies." *Arch Neurol* **65**(5): 589-592.

Pocai, A., T. K. Lam, S. Obici, R. Gutierrez-Juarez, E. D. Muse, A. Arduini and L. Rossetti (2006). "Restoration of hypothalamic lipid sensing normalizes energy and glucose homeostasis in overfed rats." *J Clin Invest* **116**(4): 1081-1091.

Pocai, A., S. Obici, G. J. Schwartz and L. Rossetti (2005). "A brain-liver circuit regulates glucose homeostasis." *Cell Metab* **1**(1): 53-61.

Prentki, M., S. Vischer, M. C. Glennon, R. Regazzi, J. T. Deeney and B. E. Corkey (1992). "Malonyl-CoA and long chain acyl-CoA esters as metabolic coupling factors in nutrient-induced insulin secretion." *J Biol Chem* **267**(9): 5802-5810.

Qian, Z., T. R. Bilderback and N. H. Barmack (2008). "Acyl coenzyme A-binding protein (ACBP) is phosphorylated and secreted by retinal Muller astrocytes following protein kinase C activation." *J Neurochem* **105**(4): 1287-1299.

Rasmussen, J. T., N. J. Faergeman, K. Kristiansen and J. Knudsen (1994). "Acyl-CoA-binding protein (ACBP) can mediate intermembrane acyl-CoA transport and donate acyl-CoA for beta-oxidation and glycerolipid synthesis." *Biochem J* **299** (Pt 1): 165-170.

Rasmussen, J. T., J. Rosendal and J. Knudsen (1993). "Interaction of acyl-CoA binding protein (ACBP) on processes for which acyl-CoA is a substrate, product or inhibitor." *Biochem J* **292** (Pt 3): 907-913.

Reichenbach, A. and H. Wolburg (2005). Astrocytes and Ependymal Glia. *Neuroglia*.

Richardson, W. D., K. M. Young, R. B. Tripathi and I. McKenzie (2011). "NG2-glia as multipotent neural stem cells: fact or fantasy?" *Neuron* **70**(4): 661-673.

Robinson, M. B. and J. G. Jackson (2016). "Astroglial glutamate transporters coordinate excitatory signaling and brain energetics." *Neurochem Int* **98**: 56-71.

Roselli-Rehfuss, L., K. G. Mountjoy, L. S. Robbins, M. T. Mortrud, M. J. Low, J. B. Tatro, M. L. Entwistle, R. B. Simerly and R. D. Cone (1993). "Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(19): 8856-8860.

Rosendal, J., P. Ertbjerg and J. Knudsen (1993). "Characterization of ligand binding to acyl-CoA-binding protein." *Biochem J* **290 (Pt 2)**: 321-326.

Ross, R. A., L. Rossetti, T. K. Lam and G. J. Schwartz (2010). "Differential effects of hypothalamic long-chain fatty acid infusions on suppression of hepatic glucose production." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**(4): E633-639.

Rossi, M., M. S. Kim, D. G. Morgan, C. J. Small, C. M. Edwards, D. Sunter, S. Abusnana, A. P. Goldstone, S. H. Russell, S. A. Stanley, D. M. Smith, K. Yagaloff, M. A. Ghattei and S. R. Bloom (1998). "A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo." *Endocrinology* **139**(10): 4428-4431.

Rothstein, J. D., L. Martin, A. I. Levey, M. Dykes-Hoberg, L. Jin, D. Wu, N. Nash and R. W. Kuncl (1994). "Localization of neuronal and glial glutamate transporters." *Neuron* **13**(3): 713-725.

Rouach, N., A. Koulakoff, V. Abudara, K. Willecke and C. Giaume (2008). "Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission." *Science* **322**(5907): 1551-1555.

Routh, V. H., L. Hao, A. M. Santiago, Z. Sheng and C. Zhou (2014). "Hypothalamic glucose sensing: making ends meet." *Front Syst Neurosci* **8**: 236.

Rudge, J. S., E. M. Pasnikowski, P. Holst and R. M. Lindsay (1995). "Changes in neurotrophic factor expression and receptor activation following exposure of hippocampal neuron/astrocyte cocultures to kainic acid." *J Neurosci* **15**(10): 6856-6867.

Sanacora, G., R. Gueorguieva, C. N. Epperson, Y. T. Wu, M. Appel, D. L. Rothman, J. H. Krystal and G. F. Mason (2004). "Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression." *Arch Gen Psychiatry* **61**(7): 705-713.

Sanchez-Alvarez, R., A. Tabernero and J. M. Medina (2004). "Endothelin-1 stimulates the translocation and upregulation of both glucose transporter and hexokinase in astrocytes: relationship with gap junctional communication." *J Neurochem* **89**(3): 703-714.

Sandoval, D. A., S. Obici and R. J. Seeley (2009). "Targeting the CNS to treat type 2 diabetes." *Nat Rev Drug Discov* **8**(5): 386-398.

Santello, M., P. Bezzi and A. Volterra (2011). "TNFalpha controls glutamatergic gliotransmission in the hippocampal dentate gyrus." *Neuron* **69**(5): 988-1001.

Santello, M., C. Cali and P. Bezzi (2012). "Gliotransmission and the tripartite synapse." *Adv Exp Med Biol* **970**: 307-331.

Schonfeld, P. and G. Reiser (2013). "Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy? Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain." *J Cereb Blood Flow Metab* **33**(10): 1493-1499.

Schousboe, A., L. K. Bak and H. S. Waagepetersen (2013). "Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA." *Front Endocrinol (Lausanne)* **4**: 102.

Schwerk, C. and K. Schulze-Osthoff (2003). "Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation." *Biochem Pharmacol* **66**(8): 1453-1458.

Schwinkendorf, D. R., N. G. Tsatsos, B. A. Gosnell and D. G. Mashek (2011). "Effects of central administration of distinct fatty acids on hypothalamic neuropeptide expression and energy metabolism." *Int J Obes (Lond)* **35**(3): 336-344.

Serrano, A., N. Haddjeri, J. C. Lacaille and R. Robitaille (2006). "GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression." *J Neurosci* **26**(20): 5370-5382.

Shank, R. P., G. S. Bennett, S. O. Freytag and G. L. Campbell (1985). "Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino acid neurotransmitter pools." *Brain Res* **329**(1-2): 364-367.

Shen, L., P. Tso, D. Q. Wang, S. C. Woods, W. S. Davidson, R. Sakai and M. Liu (2009). "Up-regulation of apolipoprotein E by leptin in the hypothalamus of mice and rats." *Physiol Behav* **98**(1-2): 223-228.

Shen, L., P. Tso, S. C. Woods, D. J. Clegg, K. L. Barber, K. Carey and M. Liu (2008). "Brain apolipoprotein E: an important regulator of food intake in rats." *Diabetes* **57**(8): 2092-2098.

Shoyab, M., L. E. Gentry, H. Marquardt and G. J. Todaro (1986). "Isolation and characterization of a putative endogenous benzodiazepineoid (endozepine) from bovine and human brain." *J Biol Chem* **261**(26): 11968-11973.

Simpson, I. A., A. Carruthers and S. J. Vannucci (2007). "Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters." *J Cereb Blood Flow Metab* **27**(11): 1766-1791.

Slobodyansky, E., A. Guidotti, C. Wambebe, A. Berkovich and E. Costa (1989). "Isolation and characterization of a rat brain triakontatetrapeptide, a posttranslational product of diazepam binding inhibitor: specific action at the Ro 5-4864 recognition site." *J Neurochem* **53**(4): 1276-1284.

Smith, Q. R. and H. Nagura (2001). "Fatty acid uptake and incorporation in brain: studies with the perfusion model." *J Mol Neurosci* **16**(2-3): 167-172; discussion 215-121.

Soderpalm, A. H. and K. C. Berridge (2000). "Food intake after diazepam, morphine or muscimol: microinjections in the nucleus accumbens shell." *Pharmacol Biochem Behav* **66**(2): 429-434.

Sofroniew, M. V. and H. V. Vinters (2010). "Astrocytes: biology and pathology." *Acta Neuropathol* **119**(1): 7-35.

Song, C., C. H. Shieh, Y. S. Wu, A. Kalueff, S. Gaikwad and K. P. Su (2016). "The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in the treatment of major depression and Alzheimer's disease: Acting separately or synergistically?" *Prog Lipid Res*.

Spector, A. A. (2001). "Plasma free fatty acid and lipoproteins as sources of polyunsaturated fatty acid for the brain." *J Mol Neurosci* **16**(2-3): 159-165; discussion 215-121.

Stanley, B. G. and S. F. Leibowitz (1985). "Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(11): 3940-3943.

Ste Marie, L., G. I. Miura, D. J. Marsh, K. Yagaloff and R. D. Palmiter (2000). "A metabolic defect promotes obesity in mice lacking melanocortin-4 receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(22): 12339-12344.

Stellwagen, D., E. C. Beattie, J. Y. Seo and R. C. Malenka (2005). "Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha." *J Neurosci* **25**(12): 3219-3228.

Stellwagen, D. and R. C. Malenka (2006). "Synaptic scaling mediated by glial TNF-alpha." *Nature* **440**(7087): 1054-1059.

Stenovec, M., E. Lasic, M. Bozic, S. T. Bobnar, R. F. Stout, Jr., V. Grubisic, V. Parpura and R. Zorec (2015). "Ketamine Inhibits ATP-Evoked Exocytotic Release of Brain-Derived Neurotrophic Factor from Vesicles in Cultured Rat Astrocytes." *Mol Neurobiol*.

Stoll, E. A., R. Makin, I. R. Sweet, A. J. Trevelyan, S. Miwa, P. J. Horner and D. M. Turnbull (2015). "Neural Stem Cells in the Adult Subventricular Zone Oxidize Fatty Acids to Produce Energy and Support Neurogenic Activity." *Stem Cells* **33**(7): 2306-2319.

Subramanian, P., S. Locatelli-Hoops, J. Kenealey, J. DesJardin, L. Notari and S. P. Becerra (2013). "Pigment epithelium-derived factor (PEDF) prevents retinal cell death via PEDF Receptor (PEDF-R): identification of a functional ligand binding site." *J Biol Chem* **288**(33): 23928-23942.

Suzuki, A., S. A. Stern, O. Bozdagi, G. W. Huntley, R. H. Walker, P. J. Magistretti and C. M. Alberini (2011). "Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation." *Cell* **144**(5): 810-823.

Sweeney, P., Y. Qi, Z. Xu and Y. Yang (2016). "Activation of hypothalamic astrocytes suppresses feeding without altering emotional states." *Glia* **64**(12): 2263-2273.

Szatkowski, M., B. Barbour and D. Attwell (1990). "Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake." *Nature* **348**(6300): 443-446.

Taishi, P., C. J. Davis, O. Bayomy, M. R. Zielinski, F. Liao, J. M. Clinton, D. E. Smith and J. M. Krueger (2012). "Brain-specific interleukin-1 receptor accessory protein in sleep regulation." *J Appl Physiol* (1985) **112**(6): 1015-1022.

Takahashi, S., T. Iizumi, K. Mashima, T. Abe and N. Suzuki (2014). "Roles and regulation of ketogenesis in cultured astroglia and neurons under hypoxia and hypoglycemia." *ASN Neuro* **6**(5).

Takemoto, T., Y. Ishihara, A. Ishida and T. Yamazaki (2015). "Neuroprotection elicited by nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor released from astrocytes in response to methylmercury." *Environ Toxicol Pharmacol* **40**(1): 199-205.

Tanaka, T., H. Saito and N. Matsuki (1997). "Inhibition of GABAA synaptic responses by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat hippocampus." *J Neurosci* **17**(9): 2959-2966.

Tancredi, V., G. D'Arcangelo, F. Grassi, P. Tarroni, G. Palmieri, A. Santoni and F. Eusebi (1992). "Tumor necrosis factor alters synaptic transmission in rat hippocampal slices." *Neurosci Lett* **146**(2): 176-178.

Thaler, J. P., C. X. Yi, E. A. Schur, S. J. Guyenet, B. H. Hwang, M. O. Dietrich, X. Zhao, D. A. Sarruf, V. Izgur, K. R. Maravilla, H. T. Nguyen, J. D. Fischer, M. E. Matsen, B. E. Wisse, G. J. Morton, T. L. Horvath, D. G. Baskin, M. H. Tschoop and M. W. Schwartz (2012). "Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans." *J Clin Invest* **122**(1): 153-162.

Thorens, B. (2012). "Sensing of glucose in the brain." *Handb Exp Pharmacol*(209): 277-294.

Thorens, B. (2015). "GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis." *Diabetologia* **58**(2): 221-232.

Tilleux, S. and E. Hermans (2007). "Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders." *J Neurosci Res* **85**(10): 2059-2070.

Tobler, I., A. A. Borbely, M. Schwyzer and A. Fontana (1984). "Interleukin-1 derived from astrocytes enhances slow wave activity in sleep EEG of the rat." *Eur J Pharmacol* **104**(1-2): 191-192.

Tokay, T., R. Hachem, O. Masmoudi-Kouki, P. Gandolfo, L. Desrues, J. Leprince, H. Castel, M. Diallo, M. Amri, H. Vaudry and M. C. Tonon (2008). "Beta-amyloid peptide stimulates endozepline release in cultured rat astrocytes through activation of N-formyl peptide receptors." *Glia* **56**(13): 1380-1389.

Tokay, T., O. Masmoudi, P. Gandolfo, J. Leprince, G. Pelletier, H. Vaudry and M. C. Tonon (2005). "Beta-amyloid peptides stimulate endozepline biosynthesis in cultured rat astrocytes." *J Neurochem* **94**(3): 607-616.

Tso, M. C. and E. D. Herzog (2015). "Was Cajal right about sleep?" *BMC Biol* **13**: 67.

Tu, L. N., K. Morohaku, P. R. Manna, S. H. Pelton, W. R. Butler, D. M. Stocco and V. Selvaraj (2014). "Peripheral benzodiazepine receptor/translocator protein global knock-out mice are viable with no effects on steroid hormone biosynthesis." *J Biol Chem* **289**(40): 27444-27454.

Tung, Y. C., D. Rimmington, S. O'Rahilly and A. P. Coll (2007). "Pro-opiomelanocortin modulates the thermogenic and physical activity responses to high-fat feeding and markedly influences dietary fat preference." *Endocrinology* **148**(11): 5331-5338.

Uchoa, E. T., G. Aguilera, J. P. Herman, J. L. Fiedler, T. Deak and M. B. de Sousa (2014). "Novel aspects of glucocorticoid actions." *J Neuroendocrinol* **26**(9): 557-572.

Vaisse, C., K. Clement, B. Guy-Grand and P. Froguel (1998). "A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity." *Nat Genet* **20**(2): 113-114.

Vilchez, D., S. Ros, D. Cifuentes, L. Pujadas, J. Valles, B. Garcia-Fojeda, O. Criado-Garcia, E. Fernandez-Sanchez, I. Medrano-Fernandez, J. Dominguez, M. Garcia-Rocha, E. Soriano, S. Rodriguez de Cordoba and J. J. Guinovart (2007). "Mechanism suppressing glycogen synthesis in neurons and its demise in progressive myoclonus epilepsy." *Nat Neurosci* **10**(11): 1407-1413.

Vrang, N., P. J. Larsen, J. T. Clausen and P. Kristensen (1999). "Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine- amphetamine-regulated transcript neurons." *J Neurosci* **19**(10): RC5.

Wajner, M. and A. U. Amaral (2015). "Mitochondrial dysfunction in fatty acid oxidation disorders: insights from human and animal studies." *Biosci Rep* **36**(1): e00281.

Wang, D. D. and A. Bordey (2008). "The astrocyte odyssey." *Prog Neurobiol* **86**(4): 342-367.

Wang, H., G. Astarita, M. D. Taussig, K. G. Bharadwaj, N. V. DiPatrizio, K. A. Nave, D. Piomelli, I. J. Goldberg and R. H. Eckel (2011). "Deficiency of lipoprotein lipase in neurons modifies the regulation of energy balance and leads to obesity." *Cell Metab* **13**(1): 105-113.

Wang, H. and R. H. Eckel (2009). "Lipoprotein lipase: from gene to obesity." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**(2): E271-288.

Wang, H. and R. H. Eckel (2012). "Lipoprotein lipase in the brain and nervous system." *Annu Rev Nutr* **32**: 147-160.

Wang, J. K., J. I. Morgan and S. Spector (1984). "Benzodiazepines that bind at peripheral sites inhibit cell proliferation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(3): 753-756.

Wang, R., C. Cruciani-Guglielmacci, S. Migrenne, C. Magnan, V. E. Coterio and V. H. Routh (2006). "Effects of oleic acid on distinct populations of neurons in the hypothalamic arcuate nucleus are dependent on extracellular glucose levels." *J Neurophysiol* **95**(3): 1491-1498.

Wang, X., N. Lou, Q. Xu, G. F. Tian, W. G. Peng, X. Han, J. Kang, T. Takano and M. Nedergaard (2006). "Astrocytic Ca²⁺ signaling evoked by sensory stimulation in vivo." *Nat Neurosci* **9**(6): 816-823.

Wang, Z. V., D. L. Li and J. A. Hill (2014). "Heart failure and loss of metabolic control." *J Cardiovasc Pharmacol* **63**(4): 302-313.

Watkins, P. A., J. A. Hamilton, A. Leaf, A. A. Spector, S. A. Moore, R. E. Anderson, H. W. Moser, M. J. Noetzel and R. Katz (2001). "Brain uptake and utilization of fatty acids: applications to peroxisomal biogenesis diseases." *J Mol Neurosci* **16**(2-3): 87-92; discussion 151-157.

Westergaard, N., U. Sonnewald and A. Schousboe (1995). "Metabolic trafficking between neurons and astrocytes: the glutamate/glutamine cycle revisited." *Dev Neurosci* **17**(4): 203-211.

Wiesinger, H., B. Hamprecht and R. Dringen (1997). "Metabolic pathways for glucose in astrocytes." *Glia* **21**(1): 22-34.

Witcher, M. R., Y. D. Park, M. R. Lee, S. Sharma, K. M. Harris and S. A. Kirov (2010). "Three-dimensional relationships between perisynaptic astroglia and human hippocampal synapses." *Glia* **58**(5): 572-587.

Wolosker, H., S. Blackshaw and S. H. Snyder (1999). "Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(23): 13409-13414.

Wu, Q., M. P. Boyle and R. D. Palmiter (2009). "Loss of GABAergic signaling by AgRP neurons to the parabrachial nucleus leads to starvation." *Cell* **137**(7): 1225-1234.

Wyss, M. T., R. Jolivet, A. Buck, P. J. Magistretti and B. Weber (2011). "In vivo evidence for lactate as a neuronal energy source." *J Neurosci* **31**(20): 7477-7485.

Xu, L., D. Janssen, N. van der Knaap, E. W. Roubos, R. L. Leshan, M. G. Myers, Jr., B. Gaszner and T. Kozicz (2014). "Integration of stress and leptin signaling by CART producing neurons in the rodent midbrain centrally projecting Edinger-Westphal nucleus." *Front Neuroanat* **8**: 8.

Xu, S., A. Jay, K. Brunaldi, N. Huang and J. A. Hamilton (2013). "CD36 enhances fatty acid uptake by increasing the rate of intracellular esterification but not transport across the plasma membrane." *Biochemistry* **52**(41): 7254-7261.

Yanagibashi, K., Y. Ohno, M. Kawamura and P. F. Hall (1988). "The regulation of intracellular transport of cholesterol in bovine adrenal cells: purification of a novel protein." *Endocrinology* **123**(4): 2075-2082.

Yaney, G. C., H. M. Korchak and B. E. Corkey (2000). "Long-chain acyl CoA regulation of protein kinase C and fatty acid potentiation of glucose-stimulated insulin secretion in clonal beta-cells." *Endocrinology* **141**(6): 1989-1998.

Yang, L., Y. Qi and Y. Yang (2015). "Astrocytes control food intake by inhibiting AGRP neuron activity via adenosine A1 receptors." *Cell Rep* **11**(5): 798-807.

Yang, Y., W. Ge, Y. Chen, Z. Zhang, W. Shen, C. Wu, M. Poo and S. Duan (2003). "Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(25): 15194-15199.

Yang, Y., P. H. Pritchard, J. Bhuiyan, D. W. Secombe and M. H. Moghadasian (2001). "Overexpression of acyl-coA binding protein and its effects on the flux of free fatty acids in McA-RH 7777 cells." *Lipids* **36**(6): 595-600.

Yeh, W. L., C. J. Lin and W. M. Fu (2008). "Enhancement of glucose transporter expression of brain endothelial cells by vascular endothelial growth factor derived from glioma exposed to hypoxia." *Mol Pharmacol* **73**(1): 170-177.

Yeo, G. S., I. S. Farooqi, S. Aminian, D. J. Halsall, R. G. Stanhope and S. O'Rahilly (1998). "A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity." *Nat Genet* **20**(2): 111-112.

Yin, P., A. M. Knolhoff, H. J. Rosenberg, L. J. Millet, M. U. Gillette and J. V. Sweedler (2012). "Peptidomic analyses of mouse astrocytic cell lines and rat primary cultured astrocytes." *J Proteome Res* **11**(8): 3965-3973.

Yoon, B. E., J. Woo and C. J. Lee (2012). "Astrocytes as GABA-ergic and GABA-ceptive cells." *Neurochem Res* **37**(11): 2474-2479.

Young, J. K., J. H. Baker and M. I. Montes (2000). "The brain response to 2-deoxy glucose is blocked by a glial drug." *Pharmacol Biochem Behav* **67**(2): 233-239.

Yue, J. T., M. A. Abraham, M. P. LaPierre, P. I. Mighiu, P. E. Light, B. M. Filippi and T. K. Lam (2015). "A fatty acid-dependent hypothalamic-DVC neurocircuitry that regulates hepatic secretion of triglyceride-rich lipoproteins." *Nat Commun* **6**: 5970.

Zarjevski, N., I. Cusin, R. Vettor, F. Rohner-Jeanrenaud and B. Jeanrenaud (1993). "Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity." *Endocrinology* **133**(4): 1753-1758.

Zhao, F. Q. and A. F. Keating (2007). "Functional properties and genomics of glucose transporters." *Curr Genomics* **8**(2): 113-128.

Zorec, R., A. Araque, G. Carmignoto, P. G. Haydon, A. Verkhratsky and V. Parpura (2012). "Astroglial excitability and gliotransmission: an appraisal of Ca²⁺ as a signalling route." *ASN Neuro* **4**(2).

Zwingmann, C. and D. Leibfritz (2003). "Regulation of glial metabolism studied by ¹³C-NMR." *NMR Biomed* **16**(6-7): 370-399.