



**HAL**  
open science

# Rôle des endozépinines dans la régulation hypothalamique de l'homéostasie énergétique

Damien Lanfray

► **To cite this version:**

Damien Lanfray. Rôle des endozépinines dans la régulation hypothalamique de l'homéostasie énergétique. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Rouen Normandie, 2010. Français. NNT: . tel-02295754

**HAL Id: tel-02295754**

**<https://normandie-univ.hal.science/tel-02295754>**

Submitted on 24 Sep 2019

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

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

# THESE

*Présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Rouen*

*en vue de l'obtention du Doctorat en Sciences*

*Spécialité Biologie Cellulaire, Option Neurosciences*

---

## Rôle des endozépines dans la régulation hypothalamique de l'homéostasie énergétique

---

*Par*

***Damien Lanfray***

Soutenue le 01 décembre 2010 devant le jury composé de :

<b>Dr Vincent Prévot</b>	Directeur de Recherche à l'Inserm, Lille	Rapporteur
<b>Pr Jean Denis Troadec</b>	Professeur à l'Université de Marseille	Rapporteur
<b>Dr Luc Pénicaud</b>	Directeur de Recherche au CNRS, Dijon	Examineur
<b>Dr Hubert Vaudry</b>	Directeur de Recherche à l'Inserm, Rouen	Examineur
<b>Dr Fabrice Morin</b>	Maître de Conférences à l'Université de Rouen	Co-Directeur
<b>Dr Marie-Christine Tonon</b>	Directeur de Recherche à l'Inserm, Rouen	Co-Directeur



Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé dans le Laboratoire de Neuroendocrinologie Cellulaire et Moléculaire, Inserm U413, dirigé par le Dr Hubert Vaudry, puis dans l'U982 dirigé par le Dr Youssef Anouar au sein de l'Institut Fédératif de Recherches Multidisciplinaires sur les Peptides (IFRMP23) en collaboration avec Pr Pelletier du Centre de Recherche en Endocrinologie Moléculaire, Oncologie et Génétique du CHU Laval, Québec.

*Durant la préparation de ma thèse, j'ai bénéficié du soutien financier de l'Inserm et du Conseil Régional de Haute-Normandie.*

*Ce travail a bénéficié du soutien de :*

- *l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm)*
- *l'Institut Fédératif de Recherches Multidisciplinaires sur les Peptides (IFRMP23)*
- *la Plate-forme Régional de Recherche en Imagerie Cellulaire de Haute-Normandie (PRIMACEN)*
- *L'Université de Rouen*
- *Le Conseil Régional de Haute-Normandie*













## SOMMAIRE

<b>Liste des articles publiés dans le cadre de ma formation doctorale .....</b>	<b>10</b>
<b>Résumé .....</b>	<b>12</b>
<b>Summary .....</b>	<b>14</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>18</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>20</b>
<b>1. Les cellules astrogliales .....</b>	<b>22</b>
1.1. Caractéristiques morphologiques et marqueurs cellulaires .....	22
1.2. Rôles des astrocytes dans l'homéostasie et le métabolisme du SNC .....	23
1.3. Rôles des astrocytes dans la neurotransmission .....	24
<b>2. Les endozépinines .....</b>	<b>28</b>
2.1. Découverte, phylogénie et structure du DBI .....	28
2.1.1. Structure du gène DBI .....	28
2.1.2. Séquence, maturation et structure tridimensionnelle de la protéine.....	30
2.2. Localisation tissulaire et cellulaire des endozépinines .....	32
2.3. Pharmacologie, structure et distribution des récepteurs des endozépinines .....	35
2.3.1. Récepteur des benzodiazépinines de type central .....	35
2.3.2. Récepteur des benzodiazépinines de type périphérique .....	37
2.3.3. Récepteur métabotropique.....	39
2.4. Activités biologiques des endozépinines .....	40
2.4.1. Effets comportementaux.....	40
2.4.2. Effets sur la stéroïdogénèse .....	40
2.4.3. Effets des endozépinines sur le métabolisme lipidique .....	41
2.4.4. Autres effets des endozépinines .....	42
a) Effets des endozépinines sur les glandes endocrines.....	42
b) Effets des endozépinines sur la prolifération cellulaire .....	42
c) Effets des endozépinines sur le système immunitaire .....	43
2.5. Contrôle de la libération des endozépinines .....	43
<b>3. Régulation centrale de l'homéostasie énergétique.....</b>	<b>44</b>
3.1. Structures hypothalamiques et comportement alimentaire.....	44
3.1.1. Neurones de 1 <sup>er</sup> ordre du noyau arqué.....	45
a) Neurones à $\alpha$ -MSH/CART .....	45
b) Neurones à NPY/AgRP .....	47
3.1.2. Populations neuronales de second ordre .....	48
3.2. Structures cérébrales et métabolisme périphérique .....	49
3.2.1. Interactions entre le tronc cérébral et le système nerveux autonome.....	50
3.2.2. Interactions entre l'hypothalamus et le système nerveux autonome.....	51
<b>4. Sensibilité hypothalamique aux informations métaboliques.....</b>	<b>52</b>
4.1. Sensibilité aux hormones .....	52
4.1.1. L'insuline .....	53

4.1.2. La leptine.....	53
4.2- Sensibilité aux métabolites .....	54
4.2.1. Les acides aminés.....	55
4.2.2. Les acides gras .....	55
4.2.3. Le glucose .....	56
a) Réponses physiologiques aux variations de la glycémie cérébrale .....	56
b) Les acteurs moléculaires de la détection centrale de glucose.....	57
c) Structures cérébrales gluco-sensibles .....	58
i) Le tronc cérébral .....	58
ii) L'hypothalamus .....	58
d) Acteurs cellulaires impliqués.....	59
i) Rôles des neurones.....	59
ii) Rôle des cellules astrogliales.....	59
<b>5. Objectifs de la thèse.....</b>	<b>60</b>
<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>64</b>
1. Analyse promoteur/rapporteur .....	66
2. Culture cellulaire et transfection .....	66
3. Reverse transcription et PCR-Quantitative .....	67
4. Canulation intraventriculaire.....	68
5. Incubations statiques d'explants hypothalamiques .....	69
6. Dosage radioimmunologique des endozépines .....	69
7. Hybridation <i>in situ</i> semi quantitative .....	70
8. Immunohistochimie.....	71
9. Mesure de la prise alimentaire .....	72
10. Test de tolérance au glucose.....	72
<b>Résultats.....</b>	<b>74</b>
Le jeûne réduit l'expression hypothalamique du <i>diazepam-binding inhibitor</i> , le précurseur du peptide ODN, un gliopeptide anorexigène, chez la souris .....	76
Gliotransmission et sensibilité cérébrale au glucose: rôle des endozépines .....	84
Mécanismes intracellulaires relayant les effets du glucose sur l'expression du DBI .....	108
<b>Discussion.....</b>	<b>114</b>
<b>Conclusions &amp; Perspectives.....</b>	<b>124</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>130</b>

# Liste des articles publiés dans le cadre de ma formation doctorale

## Articles Originaux

Compère V, **Lanfray D**, Castel H, Morin F, Leprince J, Dureuil B, Vaudry H, Pelletier G, Tonon MC (2010) Acute food deprivation reduces expression of diazepam-binding inhibitor, the precursor of the anorexigenic octadecaneuropeptide ODN, in mouse glial cells. *J Mol Endocrinol* 44:295-299

**Lanfray D**, Arthaud S, Ouellet J, Compère V, Do Rego JL, Leprince J, Lefranc B, Castel H, Pelletier G, Vaudry H, Tonon MC, Morin F Gliotransmission and brain glucose sensing: critical role of endozepines. (soumis à *J Neurosci*)

## Résumé de congrès publié

Morin F, **Lanfray D**, Ouellet J, Artaud S, Pelletier G, Vaudry H and Tonon MC (2009) Glucose stimulates the expression of endozepines in glial cells: potential involvement in brain glucose sensing and Feeding behaviour. 9<sup>th</sup> European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, Paris, September 8-12, 2009. *Glia* 57:S41-S41.

## Présentation orale

**Lanfray D**, Ouellet J, Arthaud S, Pelletier G, Vaudry H, Tonon MC and Morin F (2009) Implication des cellules gliales dans le glucosensing hypothalamique: rôle des endozépines. 36<sup>ème</sup> Colloque de la Société de Neuroendocrinologie, Nice, 15-18 septembre 2009, Abst. N° 32.



## Résumé

On désigne sous le terme endozépine une famille de peptides initialement isolés à partir du cerveau de rat sur la base de leur capacité à déplacer les benzodiazépines de leurs sites de liaison. Elle inclut le *diazepam-binding inhibitor* (DBI) et ses produits de maturation, dont l'octadécaneuropeptide ODN (DBI<sub>33-50</sub>). Les endozépines peuvent être considérées comme de véritables gliotransmetteurs puisque (i) le DBI est exprimé par les cellules gliales du SNC et notamment dans les tanocytes bordant le 3<sup>ème</sup> ventricule de l'hypothalamus, (ii) la libération des endozépines est régulée par plusieurs neuropeptides, (iii) injecté par voie icv, l'ODN augmente l'expression de la POMC et diminue celle du NPY au niveau du noyau arqué, (iv) l'ODN exerce un puissant effet anorexigène qui s'accompagne d'une réduction de la prise de poids chez le rongeur. Cet effet anorexigène est relayé par un récepteur couplé à une PLC distinct des récepteurs classiques des benzodiazépines. Quelques travaux suggèrent que les cellules astrogliales hypothalamiques seraient capables de percevoir certains signaux circulants reflétant le statut énergétique de l'organisme. En particulier, les tanocytes serviraient de relais dans la perception des variations du glucose sanguin par les neurones impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Toutefois, la nature des signaux impliqués dans le couplage « glie-neurone » reste inconnue. L'ensemble de ces données nous a conduits à émettre l'hypothèse selon laquelle l'ODN pourrait constituer un relais entre les facteurs périphériques et les populations neuronales du noyau arqué impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire.

En raison du puissant effet anorexigène de l'ODN, nous avons recherché dans un premier temps l'influence du jeûne et de deux hormones anorexigènes, la leptine et l'insuline, sur l'expression hypothalamique de DBI. Nous montrons pour la première fois qu'un jeûne aigu de 18 h réduit de façon drastique le taux des ARNm codant le DBI dans les cellules astrogliales de l'hypothalamus médiobasal. Le marquage de coupes consécutives, à l'aide d'anticorps dirigés contre le récepteur de l'insuline ou celui de la leptine, révèle que ceux-ci sont présents sur des cellules exprimant le DBI. Toutefois, l'injection intrapéritonéale d'insuline ou de leptine est incapable de réverser l'effet du jeûne.

Dans un second temps, nous avons focalisé nos travaux sur les liens qui pouvaient exister entre le glucose sanguin et les endozépines produites par les cellules astrogliales. Ainsi, nous avons montré que l'injection centrale de glucose augmente le niveau des transcrits codant le DBI au niveau de la zone périventriculaire de

l'hypothalamus de rats préalablement affamés. De plus, une augmentation de glucose dans le milieu extracellulaire est capable d'induire une libération d'endozépine à partir d'explants hypothalamiques. Dans la suite de ces travaux, nous avons évalué l'implication de l'ODN dans la gluco-sensibilité cérébrale. Nos travaux montrent que, chez des rats préalablement privés de nourriture, l'injection centrale ou périphérique de glucose réduit la prise de nourriture. Cet effet anorexigène est bloqué par l'injection icv de cyclo<sub>1-8</sub>[DLeu<sup>5</sup>]OP, un antagoniste du récepteur métabotropique de l'ODN. A l'inverse, nous montrons que l'effet orexigène d'une injection centrale de 2-DG chez des rats non affamés est aboli par la co-injection d'OP, un agoniste du récepteur métabotropique. Nos données expérimentales indiquent également que l'effet anorexigène d'une injection centrale de glucose ou d'OP est aboli par la co-injection d'un antagoniste des récepteurs MCR3/4, le SHU-9119, démontrant pour la première fois que les endozépines, produites par les cellules gliales, constituent un relais essentiel dans la réponse du système mélanocortinique aux variations de la glycémie. Nous avons par la suite évalué l'implication de l'ODN dans la régulation centrale de la glycémie périphérique. L'injection centrale de cyclo<sub>1-8</sub>[DLeu<sup>5</sup>]OP entraîne une augmentation de la glycémie chez des rats normalement nourris suggérant que, dans ces conditions, le système endozépinergique central exerce un effet tonique hypoglycémiant. Inversement, chez des animaux affamés, l'injection icv d'ODN augmente la tolérance au glucose, confirmant le rôle des endozépines centrales dans la régulation de la glycémie périphérique.

Dans le troisième volet de ce travail, nous nous sommes intéressés aux mécanismes intracellulaires mis en jeu dans l'effet du glucose sur la production d'endozépines. A l'aide de cellules de la lignée C6 et de la stratégie promoteur/rapporteur, nous montrons l'existence d'un élément de réponse au glucose dans le promoteur proximal du gène DBI. Des travaux préliminaires menés *in vitro* indiquent que l'activation du promoteur DBI par le glucose est relayée par la voie des hexosamines, une voie annexe de la glycolyse contrôlant la O-glycosylation des protéines. La localisation immunohistochimique des résidus O-glycosylés dans l'hypothalamus de rat révèle l'existence d'un marquage intense dans les cellules gliales exprimant le DBI, indiquant que cette voie est fonctionnelle *in vivo*.

L'ensemble de nos travaux suggère que les endozépines produites par les cellules gliales hypothalamiques participent à un mécanisme de rétroaction contrôlant l'homéostasie glucidique de l'organisme.

## Summary

The term endozepines designates a family of neuropeptides originally isolated from rat brain on the basis of their ability to displace the binding of benzodiazepines from their receptors. All endozepines, including the octadecaneuropeptide ODN (DBI<sub>33-50</sub>), derive from diazepam-binding inhibitor (DBI). Endozepines could be considered as authentic gliotransmitters: *(i)* they are exclusively produced by glial cells in the central nervous system, *(ii)* their synthesis and release are controlled by several neuropeptides, *(iii)* ODN modifies the activity of hypothalamic NPY- and POMC-synthesizing neurons, *(iv)* central administration of low doses of ODN markedly inhibits food intake and induces substantial weight loss. The anorexigenic effect of ODN is mediated through a recently discovered metabotropic receptor positively coupled to phospholipase C. Some studies suggest that hypothalamic astroglial cells are able to sense several signals which reflect energy status. Many studies suggest a functional coupling between astroglial cells and neurons for central detection of glucose. However, the signaling molecules involved in this crosstalk are still unidentified. We hypothesized that astrocytes are a major relay between peripheral signals which inform the brain on energy status and neurons that control food intake.

Therefore, in the present study, we have first examined the effect of food deprivation as well as insulin and leptin administration on DBI mRNA levels in astroglial cells. We have shown for the first time that overnight fasting markedly reduced DBI mRNA levels in the astroglial cells of the mediobasal hypothalamus. Moreover, we have shown that insulin and leptin receptors are present in numerous cells in the area bordering the third ventricle that also expressed DBI. Nevertheless, peripheral injection of insulin and leptin had no effect on hypothalamic DBI mRNA levels of overnight fasting rodents.

In the second part of our work, we tested the potential involvement of glucose in the stimulation of endozepine expression. We have shown that central administration of glucose in food-deprived rats induces an increase of DBI mRNA levels in periventricular cells lining the floor and infralateral walls of the third ventricle. These cells were identified as tanycytes in co-labeling experiments. Then, we demonstrated that glucose stimulates endozepine secretion from hypothalamic explants. Next,



feeding behavior experiments were conducted to test the involvement of endozepines in brain glucose sensing. We found that the feeding-suppressing effect of central administration of glucose was blunted by co-injection of an ODN antagonist. Conversely, the hyperphagic response elicited by central glucoprivation was suppressed by an ODN agonist. The anorexigenic effects of centrally-injected glucose or ODN agonist were suppressed by blockade of the melanocortin-3/4 receptors, suggesting that glucose sensing involves endozepinergic control on POMC neurons. We next investigated the involvement of the endozepinergic system in central control of peripheral glucose metabolism and found that central injection of the antagonist cyclo<sub>1-8</sub>[DLeu<sup>5</sup>]OP in normally fed rats significantly increased, by its own, blood glucose levels. Moreover, central injection of ODN increased glucose tolerance in overnight fasted rats.

In the third part of this work, we investigated the intracellular mechanisms involved in the stimulation of endozepine expression by glucose. Using the C6 glioma cell line and the promoter/reporter strategy, we have shown that glucose induces an increase of DBI promoter activity. Preliminary pharmacological data indicate that this effect is mediated by the hexosamine biosynthetic pathway, a branch pathway of glycolysis which is involved in the O-linked glycosylation of proteins. Hypothalamic immunohistochemical localisation of O-linked *N*-acetylglucosamine (O-GlcNAc)-modified proteins reveals intense labelling in the periventricular cells producing DBI, suggesting that this pathway could relay the effects of glucose observed *in vitro*.

Altogether, our data suggest that endozepines produced by hypothalamic glial cells are involved in a feedback loop controlling whole-body glucose homeostasis.





## Liste des abréviations

<b>2-DG :</b>	2-desoxyglucose
<b>5-TG :</b>	5-thiogluucose
<b>26-RFa :</b>	26-RFamide
<b>43-RFa :</b>	43-RFamide
<b>α-MSH :</b>	<i>α-melanocyte-stimulating hormone</i>
<b>AA :</b>	acide arachidonique
<b>ACC :</b>	acetyl-coa carboxylase
<b>ACBP :</b>	<i>acyl-coenzyme A-binding protein</i>
<b>ACh :</b>	acétylcholine
<b>ACTH :</b>	hormone adrénocorticotrope
<b>ADN :</b>	acide désoxyribonucléique
<b>ADNc :</b>	acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>AgRP :</b>	<i>agouti-related protein</i>
<b>AMPA :</b>	α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
<b>AMPc :</b>	adénosine 5'-phosphate cyclique
<b>ANC :</b>	<i>adenine nucleotide carrier</i>
<b>AngII :</b>	angiotensine de type 2
<b>AO :</b>	acide oléique
<b>AP-1 :</b>	<i>activator protein-1</i>
<b>AP-2 :</b>	<i>activator protein-2</i>
<b>APF :</b>	aire périfornicale
<b>ATP :</b>	adénosine triphosphate
<b>ARN :</b>	acide ribonucléique
<b>ARNm :</b>	acide ribonucléique messenger
<b>BHE :</b>	barrière hématoencéphalique
<b>BZ :</b>	benzodiazépines
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> :</b>	concentration intracellulaire de calcium
<b>CART :</b>	<i>cocaine- and amphetamine-regulated transcript</i>
<b>CBR :</b>	récepteur des BZ de type central
<b>CCK :</b>	cholécystokinine
<b>C/EBP :</b>	<i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>
<b>CGRP :</b>	<i>calcitonin gene-related peptide</i>
<b>CRH :</b>	<i>corticotropin-releasing hormone</i>
<b>Ct :</b>	<i>cycle threshold</i>
<b>CTF/NF1 :</b>	<i>CAAT-binding transcription factor/nuclear factor 1</i>
<b>DARPP-32:</b>	<i>Dopamine and cAMP regulated phosphoprotein of 32KDa</i>
<b>DBI :</b>	<i>diazepam-binding inhibitor</i>
<b>DON :</b>	6-diazo-5-oxo-l-norleucine
<b>ERK :</b>	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
<b>ETF :</b>	<i>EGFR-specific transcription factor</i>
<b>FAS :</b>	<i>fatty acid synthase</i>
<b>GABA :</b>	acide γ-aminobutyrique
<b>GFAP :</b>	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
<b>GK :</b>	glucokinase
<b>GLP-1 :</b>	<i>glucagon-like peptide 1</i>
<b>GLP-2 :</b>	<i>glucagon-like peptide-2</i>
<b>GLUT-1/2/4 :</b>	transporteur du glucose de type 1/2/4
<b>GMPc :</b>	<i>Guanidine monophosphate cyclique.</i>
<b>GRE :</b>	<i>glucocorticoid-response element</i>
<b>HEPES :</b>	acide N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N'-2-éthanesulfonique

<b>HL :</b>	hypothalamus latéral
<b>HNF :</b>	<i>hepatocyte nuclear factor</i>
<b>icv :</b>	intracérébroventriculaire
<b>ip :</b>	intrapéritonéal
<b>ip3 :</b>	inositol trisphosphate
<b>INS-R :</b>	récepteur de l'insuline
<b>LCR :</b>	liquide céphalo-rachidien
<b>MCR3/4 :</b>	récepteurs des mélanocortines de type 3/4
<b>MCD :</b>	<i>malonyl-coa decarboxylase</i>
<b>MCH :</b>	<i>melanin-concentrating hormone</i>
<b>mTOR :</b>	<i>mammalian target of rapamycin</i>
<b>NA :</b>	noyau arqué
<b>NDM :</b>	noyau dorsomédian
<b>NF-Y :</b>	<i>nuclear factor Y</i>
<b>NMDA :</b>	<i>N-methyl-D-aspartate</i>
<b>NPFF :</b>	neuropeptide FF
<b>NPY :</b>	neuropeptide Y
<b>NPV :</b>	noyau paraventriculaire
<b>NTS :</b>	noyau du tractus solitaire
<b>NVM :</b>	noyau ventromédian
<b>ob-R :</b>	récepteur de la leptine
<b>ODN :</b>	octadécaneuropeptide, DBI <sub>33-50</sub>
<b>OP :</b>	octapeptide, DBI <sub>43-50</sub>
<b>PACAP :</b>	<i>pituitary adénylate cyclase-activating polypeptide</i>
<b>PAP7 :</b>	<i>PBR and PKA associated protein 7</i>
<b>pb :</b>	paire de base
<b>PCs :</b>	prohormones convertases
<b>pHe :</b>	pH extracellulaire
<b>PI3K :</b>	Phosphoinositide 3-kinase
<b>PIPs :</b>	polyphosphoinositides
<b>PLC :</b>	phospholipase C
<b>POMC :</b>	proopiomélanocortine
<b>PPAR :</b>	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
<b>PPRE :</b>	<i>peroxisome proliferator-activated receptor-response element</i>
<b>PRAX-1 :</b>	<i>peripheral-type benzodiazepine receptor-associated protein 1</i>
<b>PrRP :</b>	<i>prolactin-releasing peptide</i>
<b>PTx :</b>	toxine pertussique
<b>PYY :</b>	peptide YY
<b>RCPG :</b>	récepteurs couplés aux protéines G
<b>R-GABA<sub>A</sub> :</b>	récepteur de l'acide $\gamma$ -aminobutyrique de type A
<b>RIA :</b>	dosage radioimmunologique
<b>SNA :</b>	système nerveux autonome
<b>SNC :</b>	système nerveux central
<b>SP1 :</b>	<i>specificity protein 1</i>
<b>SRE :</b>	<i>sterol regulatory element</i>
<b>StAR :</b>	<i>steroidogenesis acute regulatory protein</i>
<b>TRH :</b>	<i>thyrotropin-releasing hormone</i>
<b>TTN :</b>	triakontatétraneuropeptide, DBI <sub>17-50</sub>
<b>TSPO :</b>	<i>translocator protein</i>
<b>VDAC :</b>	<i>voltage-dependent anionic channel</i>
<b>VGf :</b>	<i>vascular growth factor</i>
<b>VIP :</b>	<i>vasoactive intestinal polypeptide</i>

# **Introduction**



## 1. Les cellules astrogliales

Les astrocytes constituent la population cellulaire la plus importante du système nerveux central (SNC). Le ratio entre le nombre d'astrocytes et celui des neurones est d'autant plus important que la structure cérébrale augmente en complexité (Nedergaard *et al.*, 2003). Outre leur rôle dans la structuration du SNC (Rakic, 2003; Cohen-Kashi Malina *et al.*, 2009) et la formation des synapses (Slezak et Pfrieger, 2003), les astrocytes participent à la neurotransmission indirectement (homéostasie, métabolisme, plasticité) ou directement en produisant des facteurs neuroactifs.

### 1.1. Caractéristiques morphologiques et marqueurs cellulaires

Selon leur localisation, les astrocytes présentent des morphologies différentes. Ainsi, les astrocytes protoplasmiques de la substance grise ont une forme étoilée, ceux de la substance blanche sont fibreux, tandis que d'autres possèdent de longs prolongements comme la glie radiaire du cervelet et de la rétine ainsi que les cellules épendymaires et les tanocytes bordant les ventricules (Rakic, 2003). Certains astrocytes présentent des prolongements aux extrémités renflées, les pieds astrocytaires, qui sont en étroite interaction avec la vascularisation (Simard *et al.*, 2003). L'existence de jonctions communicantes, qui assurent le passage de petites molécules d'un astrocyte à l'autre, permet la formation de vastes réseaux astrogliaux (Rose et Ransom, 1997; Wolff *et al.*, 1998).

Les astrocytes dérivent soit de la glie radiaire, qui assure le guidage des neurones durant le développement embryonnaire (Rakic, 2003), soit de cellules progénitrices, les cellules souches neurales, qui persistent à l'âge adulte dans la zone sous-ventriculaire bordant le ventricule latéral et la zone sous-granulaire de l'hippocampe (Levison et Goldman, 1997; Duan *et al.*, 2008).

La ***glial fibrillary acidic protein*** (GFAP) est une protéine du cytosquelette (Bignami *et al.*, 1972; Eng *et al.*, 2000) qui est généralement considérée comme un marqueur spécifique des astrocytes. Des anticorps dirigés contre la GFAP marquent aussi plusieurs autres types de cellules astrogliales, les cellules épendymaires au stade embryonnaire (Bodega *et al.*, 1994), les cellules de Bergmann du cervelet (Levi *et al.*, 1983), les cellules folliculo-stellaires, les pituicytes de l'hypophyse (Redecker et Fechner, 1989) ainsi que les cellules de Müller de la rétine (Bjorklund *et al.*, 1985).



Enfin, les cellules souches neurales du cerveau adulte expriment également la GFAP (Ming et Song, 2005; Duan *et al.*, 2008). De plus, il semblerait que cette protéine soit également exprimée par les tanocytes de certaines espèces tel que la Gerbille (Rafols et Goshgarian, 1985; Redecker, 1989). Inversement, quelques travaux indiquent que certaines populations d'astrocytes protoplasmiques (Bushong *et al.*, 2002) n'expriment pas la GFAP.

Les astrocytes différenciés sont également caractérisés par la présence de la **glutamine synthétase**, une enzyme qui convertit le glutamate en glutamine (Loo *et al.*, 1995), ainsi que par la présence des enzymes impliquées dans le métabolisme du glycogène telles que la glycogène synthétase et la glycogène phosphorylase (Brunet *et al.*, 2009). Enfin, il était admis jusqu'à présent que la **protéine S100B** était un marqueur des populations astrocytaires sur la base d'études réalisées notamment chez le rat et la souris (Ghandour *et al.*, 1981). Cependant, des travaux récents menés chez l'homme montrent que cette protéine est également retrouvée dans certains oligodendrocytes, les cellules endothéliales, les cellules de l'épithélium du plexus choroïde, les lymphocytes ainsi que dans quelques neurones de l'hippocampe (Steiner *et al.*, 2007). L'ensemble de ces données indique qu'à quelques exceptions près, la GFAP peut être considérée comme le marqueur spécifique des cellules astrogliales. Cependant, dans certaines régions ou/et espèces, leur identification nécessite de réaliser des co-marquages.

## **1.2. Rôles des astrocytes dans l'homéostasie et le métabolisme du SNC**

Les astrocytes assurent l'**homéostasie** du milieu extracellulaire, indispensable au bon fonctionnement des neurones. En effet, l'activation des neurones entraîne la libération d'ions, et donc une modification de la composition ionique de l'espace synaptique. Les astrocytes contribuent notamment à réduire l'excès de potassium et à rétablir le pH extracellulaire (pHe). Le potassium est « pompé » par les astrocytes, soit passivement grâce à un co-transporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$  (Newman, 1999), soit activement *via* une pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (Clausen, 1992; Silver et Erecinska, 1997). Cet influx de potassium s'accompagne d'une entrée d'eau et d'un gonflement temporaire des astrocytes connu sous le nom d'*astrocyte swelling* (Katayama *et al.*, 1990; Bullock *et al.*, 1991). L'acidification du milieu extracellulaire qui accompagne l'activité

neuronale est compensée grâce à la recapture des ions  $\text{Cl}^-$  et la libération d'ions  $\text{Na}^+$  et de  $\text{HCO}_3^-$  par les symports  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  et les antiports  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  présents au niveau de la membrane plasmique des astrocytes (Katsura *et al.*, 1994; Deitmer et Rose, 1996). Ces cellules sont également impliquées dans la **recapture** et le métabolisme des **neurotransmetteurs** libérés par les neurones, neurotoxiques à fortes concentrations. Plusieurs études indiquent que les astrocytes expriment des transporteurs spécifiques pour le glutamate, l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), la glycine ou les monoamines (Chatton *et al.*, 2003; Inazu *et al.*, 2003) ainsi que les enzymes participant à leur métabolisme (Vitalis *et al.*, 2002; Schousboe, 2003).

Les astrocytes jouent également un rôle essentiel dans le **soutien métabolique** des neurones, en assurant un continuum entre les capillaires cérébraux et le tissu neuronal. L'apport en sucres, tel que le glucose, est assuré par le transporteur de glucose GLUT-1 (Morgello *et al.*, 1995), qui est principalement localisé dans les cellules endothéliales et les pieds astrocytaires entourant les capillaires cérébraux (Yu *et al.*, 1995; Kacem *et al.*, 1998). Une fois capté par les astrocytes, le glucose est métabolisé en lactate, un substrat directement utilisable par les neurones (Dringen *et al.*, 1993; Deitmer et Rose, 1996), ou bien stocké sous forme de glycogène qui constitue une source d'énergie rapidement disponible, notamment suite à une libération de glutamate par les neurones (Pellerin *et al.*, 2007).

L'ensemble de ces données démontre l'importance des astrocytes dans le soutien métabolique et l'homéostasie au sein du SNC. Cependant, depuis les années 1990, un rôle plus « noble » a été attribué aux astrocytes, celui de participer à la transmission nerveuse.

### **1.3. Rôles des astrocytes dans la neurotransmission**

De nombreuses études réalisées notamment sur des cellules en culture indiquent que les astrocytes expriment des **récepteurs fonctionnels** pour la majorité des neurotransmetteurs et neuropeptides actuellement connus (Finkbeiner, 1993; Porter et McCarthy, 1997; Deschepper, 1998; Perea et Araque, 2007) (Tableau 1), suggérant que les cellules astrogliales sont capables de détecter des variations de l'activité neuronale.

*In vitro*, l'activation de récepteurs canaux comme le récepteur de l'acide  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique (AMPA)/kaïnate, du glutamate ou le récepteur du GABA de type A (R-GABA<sub>A</sub>), par exemple, augmente les conductances des ions Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ou Cl<sup>-</sup> dans les astrocytes (Sontheimer *et al.*, 1988; Fraser *et al.*, 1994). Les astrocytes expriment également des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et l'interaction avec leur ligand respectif conduit à une modification du *turnover* des polyphosphoinositides (PIPs), de l'activité adénylyl cyclase et de la concentration intracellulaire de calcium ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) (Tableau 1). A titre d'exemple, l'angiotensine II (Ang II), *via* les récepteurs AT1, stimule le *turnover* des PIPs et mobilise le calcium à partir d'un *pool* intracellulaire (Deschepper, 1998), alors que l'interaction de la somatostatine avec les récepteurs sst1 et sst4 diminue la production d'adénosine 5'-phosphate cyclique (AMPc) (Grimaldi *et al.*, 1997; Masmoudi *et al.*, 2005).

**Tableau 1 : Récepteurs exprimés par les astrocytes**

Ligand	Types de récepteurs	Voies de transductions	Références	
<b>Neurotransmetteurs</b>	<b>ACh</b>	mAChR <sub>1-5</sub> , nAChR( $\alpha$ )-( $\beta$ ) <sub>2</sub>	↓[AMPc], ↑[IP <sub>3</sub> ], ↑[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Gustavsson <i>et al.</i> , 1993; Kondou <i>et al.</i> , 1994; Elhousseiny <i>et al.</i> , 1999; Catlin <i>et al.</i> , 2000; Hosli <i>et al.</i> , 2001; Graham <i>et al.</i> , 2002
	<b>GABA</b>	A, B <sub>1a,1b,2</sub>	↑[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> ↓[AMPc], ↑[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Fraser <i>et al.</i> , 1995; Meier <i>et al.</i> , 2008 Patte <i>et al.</i> , 1995; Charles <i>et al.</i> , 2003; Meier <i>et al.</i> , 2008
	<b>Glutamate</b>	AMPA/Kaïnate (GluR <sub>2/3</sub> /GluR <sub>6/7</sub> ), NMDA, mGluR <sub>3,5</sub>	↑↓[AMPc], ↑[IP <sub>3</sub> ], ↑[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> , ↑[AO]	Schipke <i>et al.</i> , 2001; Moldrich <i>et al.</i> , 2002; Aronica <i>et al.</i> , 2003; Brand-Schieber et Werner, 2003; Seifert <i>et al.</i> , 2003; Servitja <i>et al.</i> , 2003
	<b>Histamine</b>	H <sub>1</sub> , H <sub>2</sub>	↑[AMPc], ↑[IP <sub>3</sub> ], ↑[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Fukui <i>et al.</i> , 1991; Kondou <i>et al.</i> , 1991; Kubo <i>et al.</i> , 1991; Inagaki et Wada, 1994
	<b>Noradrénaline</b>	$\alpha_1$ , $\alpha_2$ , $\beta_1$ , $\beta_2$	↑↓[AMPc], ↑[IP <sub>3</sub> ], ↑[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> , ↑[AO]	Enkvist <i>et al.</i> , 1996; Oliva <i>et al.</i> , 1997; Kotter et Klein, 1999)
	<b>Purines</b>	P2X <sub>1-5,7</sub> , P2Y <sub>1,2,4,6,12,14</sub> , A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> , A <sub>3</sub> ?	↑↓[AMPc], ↑[IP <sub>3</sub> ], ↑[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> , ↑[AO]	Gustavsson <i>et al.</i> , 1993; Peakman et Hill, 1994; Biber <i>et al.</i> , 1997; Chen <i>et al.</i> , 2001; Fumagalli <i>et al.</i> , 2003; Gallagher et Salter, 2003
	<b>Sérotonine</b>	5-HT <sub>1A,B,D,F</sub> 5-HT <sub>2A,B,C</sub> 5-HT <sub>5B</sub> , 5-HT <sub>6</sub> , 5-HT <sub>7</sub>	↑↓[AMPc], ↑[IP <sub>3</sub> ], ↑[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> , ↑[AA]	Garcia <i>et al.</i> , 1997; Hirst <i>et al.</i> , 1998; Cohen <i>et al.</i> , 1999; Sanden <i>et al.</i> , 2000; Maxishima <i>et al.</i> , 2001

<b>Peptides</b>	<b>Angiotensine</b>	AT1 <sub>a</sub> , AT1 <sub>b</sub> , AT2	↑[IP <sub>3</sub> ], ↑[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Sumners <i>et al.</i> , 1994; Gebke <i>et al.</i> , 1998; Fogarty <i>et al.</i> , 2002
	<b>β-amyloïde</b>	FPRs	↓[GMPc], ↑[IP <sub>3</sub> ], ↑↓[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> , ↑[AO]	Liu <i>et al.</i> , 1998; Stix et Reiser, 1998; Baltrons <i>et al.</i> , 2002; Tokay <i>et al.</i> , 2008
	<b>Bombésine</b>	BB2	↑[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Hosli et Hosli, 1994; Mason <i>et al.</i> , 2002
	<b>Bradykinine</b>	B2	↑[IP <sub>3</sub> ], ↑[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Lin et Chuang, 1992; Ikeda <i>et al.</i> , 2000
	<b>Cholecystokinine</b>	CCK <sub>B</sub>	↑[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Hosli et Hosli, 1994; Muller <i>et al.</i> , 1997
	<b>CGRP</b>	A-CGRP K-CGRP	↑[AMPc]	Haas <i>et al.</i> , 1991; Morara <i>et al.</i> , 1998; Priller <i>et al.</i> , 1998; Moreno <i>et al.</i> , 1999
	<b>Endothélines</b>	ET <sub>A</sub> , ET <sub>B</sub>	↓[AMPc], ↑[IP <sub>3</sub> ], ↑[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> , ↑[AA], ↑[AO]	Marin <i>et al.</i> , 1991b; Tence <i>et al.</i> , 1992; Stanimirovic <i>et al.</i> , 1995; Desagher <i>et al.</i> , 1997; Schinelli <i>et al.</i> , 2001
	<b>Endozépine</b>	CBR, TSPO, R-métabotropique	↓[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> ↑[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> , ↑[IP <sub>3</sub> ], ↑[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Bormann, 1991 Gandolfo <i>et al.</i> , 1997; Gandolfo <i>et al.</i> , 2001 Patte <i>et al.</i> , 1995; Gandolfo <i>et al.</i> , 1997; Leprince <i>et al.</i> , 1998
	<b>Insuline</b>	IR	↑PI3K, ↑ERK	Schechter et Yanovitch, 1999; Laron, 2009
	<b>Leptine</b>	ObRa, ObRb	↑[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Cheunsuang et Morris, 2005; Hsuehou <i>et al.</i> , 2009a
	<b>Mélanocortines</b>	MC4-R	↑[AMPc], ↑[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Salomon <i>et al.</i> , 1993; Selkirk <i>et al.</i> , 2007
	<b>Neuropeptide Y</b>	Y1	↑[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Gimpl <i>et al.</i> , 1993; St-Pierre <i>et al.</i> , 2000
	<b>Neurotensine</b>	NT2, NT3	↑[IP <sub>3</sub> ] ?, ↑[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Nouel <i>et al.</i> , 1999; Trudeau, 2000
	<b>Ocytocine</b>	OT	↑[IP <sub>3</sub> ], ↑[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Di Scala-Guenot <i>et al.</i> , 1994
	<b>Peptides natriurétiques</b>	ANPR <sub>A</sub> , ANPR <sub>B</sub> , ANPR <sub>C</sub>	↑[GMPc]	Sumners <i>et al.</i> , 1994; Yeung <i>et al.</i> , 1996
	<b>Peptides opioïdes</b>	mu, delta, kappa	↓[AMPc], ↑[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Eriksson <i>et al.</i> , 1990; Thorlin <i>et al.</i> , 1998; Stiene-Martin <i>et al.</i> , 2001
	<b>Somatostatine</b>	SST1, SST2, SST4	↓[AMPc], ↑[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Marin <i>et al.</i> , 1991a; Feindt <i>et al.</i> , 1995; Grimaldi <i>et al.</i> , 1997; Masmoudi <i>et al.</i> , 2005
	<b>Thrombine</b>	PAR1, PAR3, PAR4	↓[AMPc], ↑[IP <sub>3</sub> ], ↑[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Debeir <i>et al.</i> , 1996; Wang <i>et al.</i> , 2002a; Wang <i>et al.</i> , 2002b
	<b>Urotensine II</b>	UT	↑[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> , ↑[IP <sub>3</sub> ]	Castel <i>et al.</i> , 2006; Diallo <i>et al.</i> , 2008
<b>Vasopressine</b>	V1a	↑[IP <sub>3</sub> ], ↑[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Zhao et Brinton, 2002, 2003	
<b>VIP/PACAP</b>	PAC1, VPAC1/2	↑[AMPc], ↑[IP <sub>3</sub> ], ↑[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Martin <i>et al.</i> , 1992; Fatatis <i>et al.</i> , 1994; Tatsuno et Arimura, 1994; Tatsuno <i>et al.</i> , 1996; Ashur-Fabian <i>et al.</i> , 1997; Masmoudi <i>et al.</i> , 2003	

AA, acide arachidonique, ACh, acétylcholine, AMPc, adénosine monophosphate cyclique, AO, acide oléique, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, concentration intracellulaire de calcium, CGRP, *calcitonin gene-related peptide*, IP<sub>3</sub>, inositol trisphosphate, PI3K, phosphoinositide 3-kinase, ERK, *extracellular signal-regulated kinase*, VIP, *vasoactive intestinal polypeptide*, PACAP, *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*, GMPc, guanosine monophosphate cyclique.

Plusieurs travaux menés *in vivo* confirment que les cellules astrogliales perçoivent les signaux émis par les neurones. Il a notamment été démontré que l'activation des récepteurs adrénergiques de type α<sub>1</sub> augmente la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> dans les cellules de Bergmann (Kirischuk *et al.*, 1996). De même, l'activation des récepteurs D2 dopaminergiques portés par les pituicytes stimule la production d'AMPc (Mudrick-Donnon *et al.*, 1993).

Les astrocytes expriment aussi des récepteurs pour des hormones comme l'insuline, produite par le pancréas, et la leptine, sécrétée par le tissu adipeux (Hsuehou *et al.*, 2009a; Laron, 2009), indiquant que ces cellules sont également capables de percevoir les signaux émis par la périphérie. Ainsi, des études effectuées à la fois *in vivo* et *in vitro* ont montré que l'activation des récepteurs de la leptine induit une augmentation de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> dans les astrocytes hypothalamiques (Hsuehou *et al.*, 2009a).

En réponse aux signaux émis par les neurones ou en provenance de la périphérie, les astrocytes peuvent favoriser ou non la transmission synaptique de part

leur plasticité (Hawrylak *et al.*, 1998). Par exemple, dans le cas des neurones à oxytocine du noyau supraoptique, la rétraction des prolongements astrocytaires permet leur synchronisation (Langle *et al.*, 2002). Mais ce n'est qu'un peu plus tard que certains groupes se sont intéressés aux facteurs produits par les astrocytes et à leur rôle dans la neurotransmission.

Par analogie avec les neurotransmetteurs produits par les neurones, ces facteurs ont été appelés **gliotransmetteurs** (Volterra et Meldolesi, 2005). Le terme de gliotransmetteur s'applique à certaines molécules qui répondent à plusieurs critères récemment définis par Parpura (Parpura et Zorec, 2010). (i) Elles sont produites et/ou stockées par les cellules gliales, (ii) leur libération est régulée, (iii) elles engendrent une réponse rapide des neurones et (iv) une altération de leurs productions s'accompagne de processus physiopathologiques. Bien que l'ATP soit souvent classée dans la famille des gliotransmetteurs, seuls le glutamate et la D-sérine répondent à tous ces critères.

Les astrocytes produisent du **glutamate** principalement à partir de l'aspartate et d'un intermédiaire du cycle de Krebs, l' $\alpha$ -cétoglutarate (Westergaard *et al.*, 1996). Des études réalisées sur des cultures d'astrocytes montrent que la libération de glutamate, consécutive à l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ , est induite par différents facteurs dont l'endothéline 1 ou la bradikinine (Jeftinija *et al.*, 1996; Sasaki *et al.*, 1997). Par ailleurs, des travaux réalisés sur des co-cultures astrocytes-neurones (Parpura *et al.*, 1994; Hassinger *et al.*, 1995) ou des tranches de cerveaux de rats (Pasti *et al.*, 1997; Parri *et al.*, 2001) ont montré que le glutamate sécrété par les cellules gliales stimule en quelques secondes l'activité électrique des neurones post-synaptiques en activant des récepteurs glutamatergiques de types AMPA et *N-methyl-D-aspartate* (NMDA). Enfin, l'inactivation du gène codant la glutamine synthétase astrocytaire, l'enzyme limitante de la voie de synthèse du glutamate, est létale dans les trois jours qui suivent la parturition chez la souris (He *et al.*, 2010).

La L-sérine est convertie en **D-sérine** par la sérine racémase, une enzyme exclusivement produite par les astrocytes au niveau du SNC (Wolosker *et al.*, 1999). Une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  induite par le glutamate stimule la libération de D-sérine par des astrocytes en culture (Mothet *et al.*, 2005). Des études menées sur des tranches d'hippocampe révèlent que la stimulation de l'élément présynaptique induit une libération de D-sérine par l'astrocyte localisé au niveau de la synapse, qui

potentialise l'activité post-synaptique (Henneberger *et al.*, 2010). Ainsi, en interagissant avec le site de la glycine du récepteur NMDA, la D-sérine participe aux mécanismes cellulaires qui sous-tendent le processus de mémorisation au niveau de l'hippocampe (Panatier *et al.*, 2006). Enfin, les déficits cognitifs observés chez les rats âgés sont associés notamment à une réduction importante de la concentration de D-sérine dans cette région cérébrale (Turpin *et al.*, 2009).

Il est probable que la liste des gliotransmetteurs s'allonge dans le futur. En particulier, des travaux menés au laboratoire suggèrent que le *diazepam-binding inhibitor* (DBI) et ses dérivés pourraient postuler au titre de gliotransmetteur.

## **2. Les endozépinés**

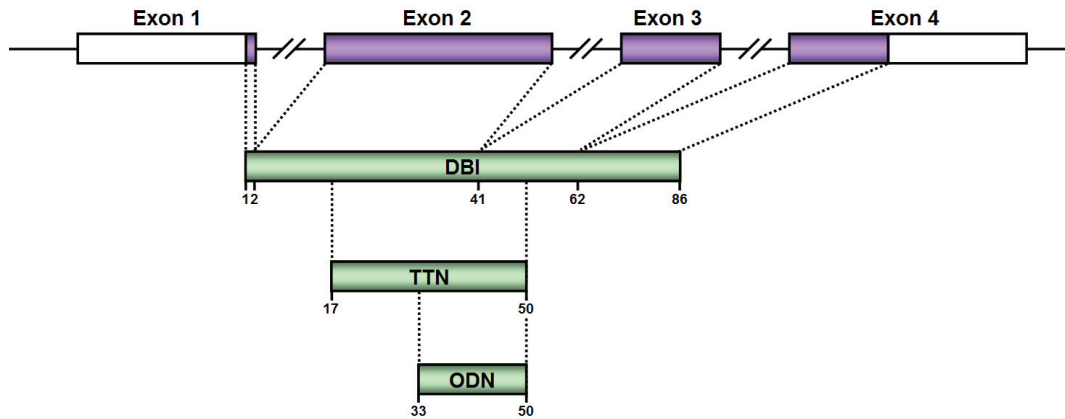
### **2.1. Découverte, phylogénie et structure du DBI**

Les benzodiazépines (BZ) sont des molécules de synthèse largement utilisées en thérapeutique depuis les années 1970 pour leurs propriétés anxiolytiques, anticonvulsivantes, myorelaxantes et hypnotiques (D'Hulst *et al.*, 2009, pour revue). Par la suite, des études de liaison réalisées avec le diazépam, le chef de file des BZ, ont révélé l'existence de sites de haute affinité pour ces composés dans le SNC (Mohler et Okada, 1977; Squires et Brastrup, 1977), puis dans de nombreux tissus périphériques (Braestrup et Squires, 1977). Ces travaux ont conduit plusieurs équipes à rechercher les ligands endogènes de ces récepteurs. Costa et ses collaborateurs ont ainsi isolé, à partir d'extraits de cerveau de rat, un polypeptide de 10 kDa capable de déplacer le diazépam tritié de ses sites de liaison, et qui fut appelé pour cette raison *diazepam-binding inhibitor* ou DBI (Guidotti *et al.*, 1983). Le DBI est également connu sous le nom d'*acyl-coenzyme A-binding protein* (ACBP) pour sa capacité à lier les esters d'acyl-coenzyme A et à stimuler la synthèse d'acide gras (Mogensen *et al.*, 1987; Knudsen *et al.*, 1989). Seul le sigle DBI sera utilisé dans le reste du document.

#### **2.1.1. Structure du gène DBI**

L'analyse par Southern-blot de l'ADN génomique chez l'homme (Gray *et al.*, 1986), le rat (Mocchetti *et al.*, 1986) et la souris (Owens *et al.*, 1989) révèle l'existence de plusieurs gènes dont un seul est fonctionnel. Chez l'homme, le gène codant le DBI est localisé dans la région q12-21 du bras long du chromosome 2 (DeBernardi *et al.*, 1988), tandis que les pseudogènes sont situés sur les chromosomes 5, 6, 11 et 14

(Mocchetti, 1990; Todd et Naylor, 1992; Gersuk *et al.*, 1995). Le gène *DBI* est constitué de 4 exons (Fig. 1) chez l'homme, la souris, le rat et le canard (Mandrup *et al.*, 1992; Kolmer *et al.*, 1993, 1994; Swinnen *et al.*, 1996), de trois exons chez la drosophile (Kolmer *et al.*, 1994) et d'un seul exon chez la levure (Rose *et al.*, 1992).



**Figure 1 :** Représentation schématique de l'organisation du gène *DBI* (violet) et de la maturation du polypeptide (vert) chez le rat. (adaptée de Swinnen *et al.*, 1998).

Les premières analyses de la région promotrice du gène codant le DBI effectuées chez l'homme (Swinnen *et al.*, 1996) et le rat (Mandrup *et al.*, 1992; Kolmer *et al.*, 1993) ont révélé l'absence de TATA-*box* conventionnelle, l'existence de plusieurs sites potentiels d'initiation de la transcription, des sites liant les facteurs *specificity protein 1* (SP1) et *EGFR-specific transcription factor* (ETF) ainsi que plusieurs régions GC riches. L'ensemble de ces observations a conduit ces auteurs à classer le gène *DBI* dans la famille des gènes domestiques.

Néanmoins, avec le perfectionnement des outils informatiques, l'analyse *in silico* du promoteur a permis d'identifier une TATA-*box-like* dans la région -86 (Swinnen *et al.*, 1998; Sandberg *et al.*, 2005; Neess *et al.*, 2006). De plus, plusieurs groupes ont montré que cette même région présente des séquences cis-régulatrices potentielles, *i.e.* un site *CAAT-binding transcription factor/nuclear factor 1* (CTF/NF1) situé juste en amont de la méthionine initiatrice, trois sites *activator protein-2* (AP2) (Kolmer *et al.*, 1993), un site *activator protein-1* (AP1) (Elholm *et al.*, 1996) ainsi que deux sites *glucocorticoid-response element* (GRE) (Mandrup *et al.*, 1992). L'étude du promoteur distal révèle la présence de séquences consensus pour des facteurs transcriptionnels tissus spécifiques tels que les *hepatocyte nuclear factors*, HNF-3 et HNF-4 (Elholm *et al.*, 1996) exprimés dans les hépatocytes (Pani *et al.*, 1992), les protéines de la famille

CCAAT/*enhancer-binding protein* (C/EBP) (Elholm *et al.*, 1996; Helledie *et al.*, 2002; Neess *et al.*, 2006) présentes majoritairement dans les adipocytes (Mandrup et Lane, 1997) ainsi que le *peroxisome proliferator-activated receptor response element* (PPRE) (Elholm *et al.*, 1996; Mandrup *et al.*, 1998), connu notamment pour contrôler l'adipogenèse (Mandrup et Lane, 1997). A l'aide de construits de type promoteur/gène rapporteur, il a été démontré que les sites SP1, le site *nuclear factor Y* (NF-Y) ainsi que le site *sterol regulatory element* (SRE), sont fonctionnels et constituent une cassette d'expression située en amont de la TATAbox-like (Sandberg *et al.*, 2005; Neess *et al.*, 2006). Cette dernière serait responsable de l'expression basale du gène. Par ailleurs, le site PPRE identifié au niveau de l'intron 1 interagit notamment avec des éléments cis-régulateurs de type C/EBP localisés au niveau du promoteur distal (Neess *et al.*, 2006). La découverte de nouveaux transcrits du gène *DBI* résultant de l'activation tissu spécifique de promoteurs alternatifs, localisés au niveau de l'exon 1 chez l'homme et la souris (Nitz *et al.*, 2005), montre combien l'expression *DBI* est soumise à une régulation complexe. Enfin, le *DBI* pourrait également intervenir dans la régulation transcriptionnelle de gènes, en interagissant avec le HNF-4 (Petrescu *et al.*, 2003) ou en liant les esters d'acyl-CoA (Knudsen *et al.*, 1989), empêchant ou favorisant ainsi la fixation de HNF-4 ou du *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) sur les sites PPRE. L'ensemble de ces données indique que le *DBI* ne peut plus être considéré comme un gène domestique.

### **2.1.2. Séquence, maturation et structure tridimensionnelle de la protéine**

Le gène *DBI* code une protéine hydrophile de 85 à 104 acides aminés, dépourvue de séquence signalale (Mocchetti *et al.*, 1986) (Fig. 2), dont la séquence complète a été déterminée par séquençage peptidique et/ou clonage chez de nombreuses espèces allant de l'homme à l'eubactérie. Chez l'homme, il existe une forme longue de 104 acides aminés qui résulte d'un épissage alternatif du transcrit primaire. Néanmoins, cette forme est largement minoritaire comparée à celle de 86 acides aminés (Gray *et al.*, 1986; Kolmer *et al.*, 1995).



	I	II	III	IV
	1	10	20	30
<i>Rattus norvegicus</i>	MSQADFDKAAEEV	KRLKKT--QPTDEEMLFYISHF	QATVGDVNV-TDRPGLLDLRS	KAKWDSWNKLGKTSKENAMKTYVEKVEELKKKYGI
		TTN	ODN	
<b>Mammifères</b>				
<i>Homo sapiens</i>	M...E...E...RH...K...S...G...Y...I...E...M...FT...A...E...D...A...IN...			
<i>Macaca mulatta</i>	M...E...E...R...K...A...D...GRY...I...E...M...FT...A...E...T...D...A...IX...X...			
<i>Pan troglodytes</i>	M...E...E...RH...K...S...G...Y...I...E...M...FT...A...E...D...A...IN...			
<i>Mus musculus</i>	M...E...E...R...K...S...G...Y...I...E...M...FT...A...E...S...D...D...			
<i>Spermophilus lateralis</i>	M...E...E...H...A...Y...I...E...M...F...A...Q...S...A...D...M...			
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	MX...E...E...N...K...A...A...Y...I...E...M...F...A...E...S...R...A...D...Q...			
<i>Equus caballus</i>	M...E...R...N...K...A...D...Y...I...E...M...F...A...A...D...A...IN...D...			
<i>Canis familiaris</i>	M...E...D...H...K...A...D...Y...Y...I...E...E...R...A...Q...D...A...N...D...			
<i>Bos taurus</i>	M...E...E...H...K...A...D...Y...I...E...M...F...A...E...D...A...ID...			
<i>Ovis aries</i>	MKS...E...Q...K...A...Y...I...E...M...F...A...E...D...A...D...			
<i>Sus scrofa</i>	M...E...E...N...K...A...D...Y...I...E...I...A...G...D...A...IN...			
<i>Chaetophractus villosus</i>	M...E...E...N...K...A...D...Y...I...E...M...F...A...Q...D...S...ID...			
<b>Oiseaux</b>				
<i>Taeniopygia guttata</i>	M...E...A...HXX...Q...S...Q...AV...E...M...F...A...SA...M...D...A...IA...G...			
<i>Anas platyrhynchos</i>	MAE...A...Q...Q...S...S...Q...DV...Y...M...F...A...A...M...D...A...A...G...			
<i>Meleagris gallopavo</i>	M...E...A...Q...Q...S...Q...DV...Y...M...F...A...A...M...D...A...A...G...			
<i>Gallus gallus</i>	M...E...A...Q...E...S...Q...DV...Y...M...F...A...A...M...D...A...A...G...			
<b>Reptiles</b>				
<i>Testudines gen. Sp.</i>	M...E...E...Q...S...Y...I...E...F...F...A...DA...MA...E...A...IA...G...			
<b>Amphibiens</b>				
<i>Amphystoma mexicanum</i>	M...A...C...T...S...D...L...L...ALY...C...I...A...M...F...E...Q...K...E...EA...IKL...A...E...C...C			
<i>Xenopus tropicalis</i>	M...EA...Q...S...T...ET...ALY...D...A...M...F...K...E...D...RAQ...DW...K...A...S			
<i>Xenopus laevis</i>	M...A...E...Q...S...T...ET...ALY...D...A...M...F...A...K...D...AQ...L...K...G...C			
<b>Ostéichthyen</b>				
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	M...E...E...Q...A...K...A...A...RV...AL...K...A...M...F...A...E...E...KNQ...E...R...E...IAL...G...V			
<i>Cyprinus carpio</i>	M...E...V...E...Q...A...K...A...E...LY...E...A...M...F...A...E...K...M...DD...A...IA...G...			
<i>Salmo salar</i>	M...E...R...Q...A...K...A...A...RV...AL...A...M...F...A...E...E...K...Q...D...R...E...IAL...G...V			
<i>Danio rerio</i>	M...E...E...Q...Q...A...K...A...E...LY...A...M...F...A...DAK...M...D...V...A...IA...G...			
<i>Haplochromis chilotes</i>	MAEL...KT...E...A...Q...A...K...Q...L...L...A...M...F...A...E...Q...K...N...E...ISL...Q...G...			
<i>Ictalurus furcatus</i>	MTEEA...Q...Q...A...K...A...A...L...A...M...F...A...DAK...MT...D...A...IS...G...			
<i>Ictalurus punctatus</i>	MTEEA...Q...Q...A...K...A...E...L...A...M...F...A...DAK...MT...D...A...IS...G...			
<i>Oryzias latipes</i>	MAEL...Q...A...Q...A...K...CV...AL...S...A...M...F...A...E...Q...K...D...E...KL...Q...Q...			
<i>Fundulus heteroclitus</i>	MAEN...E...V...Q...K...DTA...TDL...GLY...K...E...K...Q...M...FA...T...A...AK...L...QDE...KAA...L...K...V...			
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	MSES...Q...A...V...K...S...DNT...L...GL...A...L...V...M...F...R...A...K...V...E...TA...DL...K...E...V...			
<i>Takifugu rubripes</i>	M...EEA...Q...V...N...K...S...S...LGEL...GLY...V...M...F...A...AK...V...D...AA...AL...K...A...E...V			
<b>Chondrichtyen</b>				
<i>Leucoraja erinacea</i>	M...E...E...DDI...H...K...S...N...IL...LY...A...IT...FT...A...E...Q...D...K...IN...Q...ETI...ME			
<b>Agnathes</b>				
<i>Branchiostoma floridae</i>	M...E...E...N...S...S...K...E...L...KI...A...M...F...A...ESK...M...Q...D...RAK...IA...G...V			
<b>Urochordées</b>				
<i>Ciona intestinalis</i>	MS...E...NA...AA...N...E...R...S...KL...DL...ALY...TI...C...M...F...A...G...K...LAQSD...E...Q...IAL...K...L...G...			
<i>Ciona savignyi</i>	MS...E...NT...A...N...TK...R...S...QL...KL...GL...C...E...M...F...A...GF...V...D...EKQ...IDF...NT...---			
<b>Echinoderme</b>				
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	MSDA...NT...D...A...S...SND...L...K...L...V...C...M...Y...T...A...G...K...TAD...E...E...I...L...GQ...TSC...MK			
<b>Insectes</b>				
<i>Mimas tiliae</i>	ML...EQ...Q...SN...RN...S...L...S...NDL...EL...AL...SA...ADPAN...F...A...H...K...A...L...D...Q...A...IA...S...IASL...LQ			
<i>Drosophila melanogaster</i>	MSELQE...NQ...D...N...N...T...G...NDL...EL...LY...C...K...F...F...EA...NR...M...NTD...QAA...IT...KA...IAAV...LKS			
<i>Drosophila pseudoobscura</i>	MAELQE...NQ...D...N...N...T...A...NDL...EL...L...C...K...F...F...EA...NR...M...NTD...QAA...IT...KA...IAAV...LKS			
<b>Nématodes</b>				
<i>Caenorhabditis elegans</i>	MTLS...D...AT...T...S...SND...L...KL...AL...G...NT...K...M...SA...DEK...LA...DD...Q...A...AL...IA...A			
<i>Caenorhabditis briggsae</i>	MTLT...D...AQ...T...S...SND...L...KL...AL...G...NT...K...M...SAWDEQ...A...Q...A...IKL...TG...V			
<b>Plantes</b>				
<i>Lilium</i>	MLKEE...EEH...VKA...T...PE...S...TSN...NK...IL...GLY...S...P...D...G...MFS...PR...ER...A...KAVE...K...E...GD...IT...KQ...LEESA-			
<i>Ricinus communis</i>	MGLKE...EEH...KA...T...PE...NT...N...NK...IL...GLY...P...S...M...FNMR...DR...A...KAVEGK...T...E...SD...IT...KQ...LGEAASA			
<i>Brassica napus</i>	MGLKE...EEH...K...K...TA...S...SN...DL...IL...GLY...P...T...TS...M...FSM...ER...A...KAVE...K...T...DE...SD...IT...KQ...LLEAEAS			
<i>Gossypium</i>	MLKEE...EEH...K...T...PA...A...SNDD...IL...GLY...P...S...M...FNMR...E...Y...A...KAVE...K...E...GD...IT...KQ...FEAA...S			
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MGLKEE...EEH...K...NT...TE...L...SN...DL...IL...GLY...P...V...D...S...M...FSM...ER...A...KAVE...K...S...E...ND...IT...KQ...LEVAASKAST			
<i>Oryza sativa</i>	MGL...E...EQY...KA...T...PE...S...TSN...NK...IL...GLY...P...C...TA...I...FA...Q...DR...A...KAVE...K...S...E...SD...IT...KQ...LEBAAAAS			
<i>Theobroma cacao</i>	MGGLKEE...EEY...KA...T...PE...TT...N...NK...IL...GL...P...S...M...FNMR...E...Y...A...KAVE...K...E...SD...IT...KQ...LEBAAAAS			
<i>Panax ginseng</i>	MGL...EE...EEH...KA...T...PE...ST...N...NK...IL...GLY...P...S...I...FNMR...DR...A...KAVE...K...E...GD...IT...KQ...LEBAAA-			
<i>Sorghum bicolor</i>	MGL...EE...EEY...KA...T...PE...S...TSN...NK...IL...GLY...N...I...F...Y...Q...DR...A...KAVE...K...P...E...ND...IT...KQ...QEBAAAATS			
<i>Zea mays</i>	MGL...EE...EEH...KA...T...PA...TT...N...SK...VL...GLY...V...S...G...I...F...S...ER...A...KAVE...K...DE...AD...IT...KQ...LEBAAAATS			
<b>Mycètes</b>				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MVSQ...L...EEK...KA...NE...P...K...STD...L...EL...ALY...ND...KEK...IFNM...DRY...EA...EN...K...Q...D...E...E...IAL...DQ...IA...SS			
<i>Saccharomyces pastorianum</i>	MVSQ...L...EEK...KA...NE...P...K...STD...L...EL...GLY...ND...KEK...IFNM...DRY...EA...EN...K...Q...D...E...E...IAL...DQ...IA...SS			
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	MSST...EQ...AD...E...E...T...NSD...L...KL...AL...N...TEK...F...NA...EE...K...D...ASE...ISF...D...T...MK			
<b>Protozoaires</b>				
<i>Plasmodium falciparum</i>	MRDS...NDCVQF...NK...PKTVNLSVDVK...DL...K...Y...S...NC...IEQ...SMFKIEDRK...YNA...KSIENLER...E...Q...R...IDI...TS...FPNWKDSE			
<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>	MSDL...CVS...NS...PKTESISM...TK...DL...K...Y...SMF...PC...I...APSFFKFEE...K...YEA...KS...E...L...DD...KA...I...TS...YPEWKNKS			
<i>Burkholderia mallei</i>	MSDIT...Q...EQ...QID...Q...TE...R...GNLTL...RL...AL...D...H...G...K...FT...IV...Y...Y...A...DA...E...L...BQDD...K...Q...L...S...NGTAS			

La comparaison de la structure primaire de la séquence de DBI de rat avec différentes isoformes caractérisées chez les tétrapodes, révèle que le pourcentage d'homologie est compris entre 77 et 95 % (Fig. 2), indiquant que le gène *DBI* a subi une forte pression sélective au cours de l'évolution.

La présence d'un grand nombre de résidus basiques dans la séquence du DBI indique que ce polypeptide pourrait être le précurseur de plusieurs peptides biologiquement actifs. Le fait que les acides aminés basiques conservés correspondent majoritairement à des lysines isolées exclu cependant l'intervention des prohormones convertases (PCs) dans le processus de maturation. Néanmoins, l'identification de plusieurs dérivés du DBI tels que l'octadécaneuropeptide (DBI<sub>33-50</sub>, ODN; Andersen *et al.*, 1991), le triakontatétraneuropeptide (DBI<sub>17-50</sub>, TTN; Slobodyansky *et al.*, 1989) et les DBI<sub>32-86</sub> et DBI<sub>35-86</sub>, (Agerberth *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1997) dans des extraits de cerveau et/ou d'intestin, suggère que le DBI est clivé au niveau de lysines isolées (lysines 16, 32 et 50) et d'acides aminés non basiques (tyrosine 31 et alanine 34). Les enzymes impliquées dans la maturation du DBI sont actuellement inconnues.

Les données structurales concernant le DBI, obtenues par modélisation moléculaire, révèlent la présence de quatre hélices  $\alpha$ , situées entre les résidus 1 et 15 (hélice I), 22 et 35 (hélice II), 52 et 60 (hélice III) et 68 et 85 (hélice IV) (Andersen *et al.*, 1991) (Fig. 2).

## 2.2. Localisation tissulaire et cellulaire des endozépines

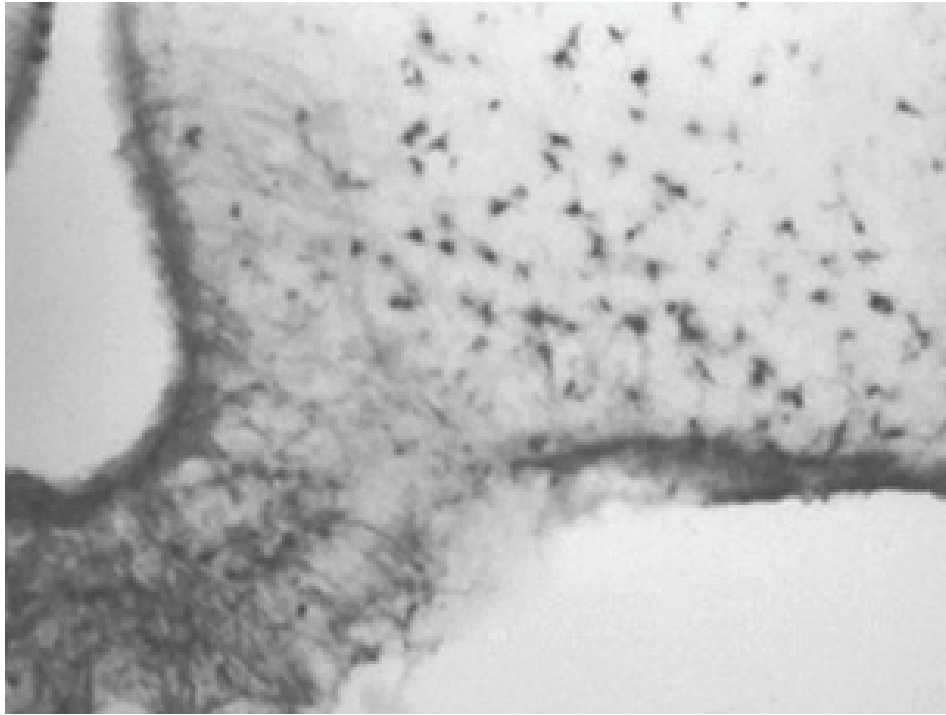
Des études immunohistochimiques ont démontré que les endozépines sont largement distribuées dans le SNC des mammifères et que le DBI est exprimé dès le 11<sup>ème</sup> jour de vie fœtale chez le rat (Burgi *et al.*, 1999). Chez l'homme (Ball *et al.*, 1989; Ferrarese *et al.*, 1989a), le singe (Slobodyansky *et al.*, 1992) et le rat adulte (Alho *et al.*, 1985; Ball *et al.*, 1986; Miyata *et al.*, 1987; Tonon *et al.*, 1990; Malagon

---

**Figure 2 : Alignement des séquences en acides aminés du DBI de différentes espèces.** Les acides aminés conservés par rapport à la séquence de rat sont indiqués par un point sur fond gris foncé chez les mammifères et gris clair chez tous les êtres vivants. La méthionine initiatrice est notée en bleu, les résidus basiques sont notés en rouge et ceux jouant un rôle dans la stabilité de la protéine sont identifiés par \* au niveau de la séquence du DBI de rat. Les régions du DBI correspondant au TTN (DBI<sub>17-50</sub>) et à l'ODN (DBI<sub>33-50</sub>) sont visualisées par un trait continu. La structure tertiaire du DBI déterminée chez l'homme et le bœuf est schématisée par quatre hélices  $\alpha$  (I-IV).

*et al.*, 1993), les concentrations d'endozépines les plus importantes ont été détectées dans la substance noire, l'amygdale, l'hippocampe, l'hypothalamus et le cervelet (Tonon *et al.*, 1990; Alho *et al.*, 1991; Yanase *et al.*, 2002). L'analyse par HPLC combinée au dosage radioimmunologique (RIA) a révélé l'existence de plusieurs formes moléculaires apparentées aux endozépines qui co-éluent notamment avec le DBI, le TTN et l'ODN (Ball *et al.*, 1986; Rouet-Smith *et al.*, 1992; Malagon *et al.*, 1993).

Quelques travaux ont montré la présence d'endozépines dans certaines populations neuronales de l'hippocampe, du cervelet et du cortex de rat (Alho *et al.*, 1985; Ferrarese *et al.*, 1987). Néanmoins, la majorité des données de la littérature indique que ces peptides sont essentiellement produits par les cellules gliales dans le SNC. Dans l'hypothalamus, un marquage immunohistochimique intense est observé dans les **cellules épendymaires** bordant le troisième ventricule, les **tancocytes** de l'éminence médiane et les **astrocytes** des noyaux supraoptiques et paraventriculaires (Alho *et al.*, 1988, 1991; Tonon *et al.*, 1990; Tong *et al.*, 1991) (Fig. 3). Une immunoréactivité de type endozépines a également été détectée dans une sous-population d'astrocytes sensibles aux œstrogènes du noyau arqué (NA), les *Gomori-positive astrocytes* (Young, 1994). Au niveau du cervelet, seule la glie radiaire, correspondant aux cellules de Bergmann, est marquée par des anticorps dirigés contre l'ODN (Tonon *et al.*, 1990; Vidnyanszky *et al.*, 1994) ou le DBI (Yanase *et al.*, 2002). Dans l'hypophyse, les endozépines sont présentes dans **les pituicytes** du lobe nerveux et dans quelques rares cellules situées dans le lobe intermédiaire (Tong *et al.*, 1990). Des études en microscopie électronique ont révélé que le marquage est diffus dans l'ensemble du cytoplasme, suggérant que les endozépines ne sont pas stockées dans des vésicules de sécrétion (Tonon *et al.*, 1990; Vidnyanszky *et al.*, 1994). Ces observations sont en accord avec l'absence de peptide signal dans la séquence du DBI (Gray, 1987; Lihrmann *et al.*, 1994). La localisation par hybridation *in situ* des ARNm codant le DBI dans plusieurs régions cérébrales confirme que les endozépines sont principalement synthétisées par les cellules gliales chez les mammifères (Alho *et al.*, 1988; Tong *et al.*, 1991; Yanase *et al.*, 2002).



**Figure 3 : Illustration de la distribution des endozépines au niveau de l'hypothalamus.** Immunolocalisation de l'ODN sur des coupes frontales d'hypothalamus de rat. D'après Tonon *et al.*, 1990.

Les endozépines sont également présentes dans de nombreux organes ou tissus périphériques où elles sont localisées dans plusieurs catégories de cellules, des cellules endocrines, dont les cellules stéroïdogènes de la surrénale (Besman *et al.*, 1989; Bovolin *et al.*, 1990; Alho *et al.*, 1991) et du testicule (Rheaume *et al.*, 1990; Schultz *et al.*, 1992), des cellules exocrines (Steyaert *et al.*, 1991; Tong *et al.*, 1991), des cellules épithéliales (Schoemaker *et al.*, 1983; Bovolin *et al.*, 1990; Alho *et al.*, 1991; Yanase *et al.*, 2001) et les hépatocytes (Bovolin *et al.*, 1990; Elholm *et al.*, 2000). Enfin, quelques travaux ont démontré la présence d'endozépines dans les cellules satellites du plexus myentérique intestinal, les cellules sustentaculaires de la médullo-surrénale (Yanase *et al.*, 2002) et les cellules de Schwann des nerfs olfactif, optique, vague et sciatique (Lacor *et al.*, 1996; Yanase *et al.*, 2002), indiquant que dans le système nerveux périphérique, les endozépines sont également exprimées par les cellules gliales.

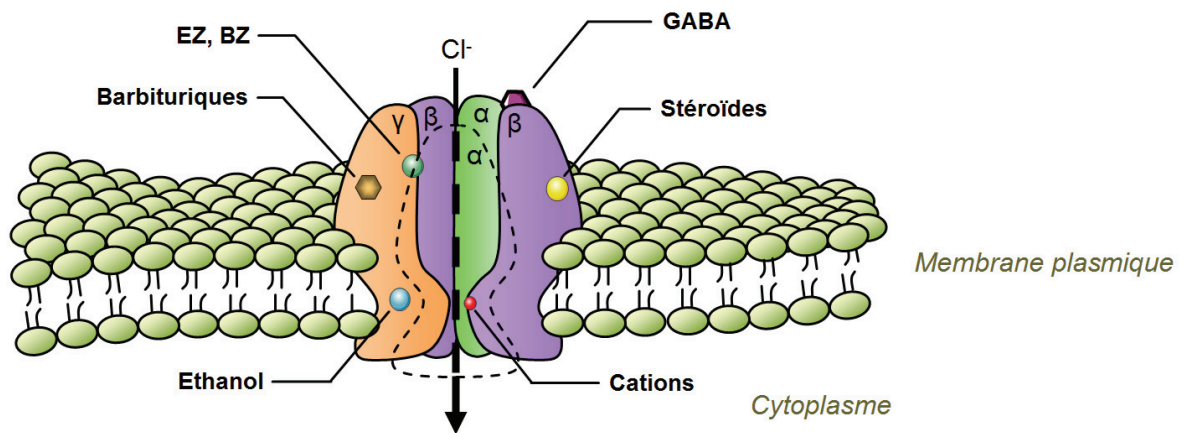
## 2.3. Pharmacologie, structure et distribution des récepteurs des endozépines

En raison de sa capacité à déplacer les BZ de leurs sites de liaison, le DBI peut donc interagir avec leurs récepteurs de type central (CBR) ou périphérique, récemment renommé *translocator protein* (TSPO). Par ailleurs, des travaux ont montré que les endozépines sont également les ligands endogènes de RCPG.

### 2.3.1. Récepteur des benzodiazépines de type central

Le CBR fait partie intégrante d'un complexe macromoléculaire, constitué de 5 sous-unités, incluant un site de liaison pour le GABA, R-GABA<sub>A</sub> et un canal chlore (Olsen et Sieghart, 2008). Actuellement, pas moins de 8 sous-unités et 20 isoformes du R-GABA<sub>A</sub>/CBR ( $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-4}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\rho_{1-3}$ ) ont été caractérisées chez les mammifères (Bonnert *et al.*, 1999; Sieghart, 2000). Par des approches biochimiques et immunohistochimiques, il a été montré que les complexes macromoléculaires présents au niveau du SNC sont majoritairement de type  $2\alpha_{1-3}2\beta_{2-3}1\gamma_2$  (Pirker *et al.*, 2000; Sur *et al.*, 2001) (Fig. 4) et lient spécifiquement certaines BZ dites de type central, telles que le clonazépam et le flumazénil (Sieghart et Moehler, 1982; Kuriyama *et al.*, 1993). Des études pharmacologiques réalisées sur des R-GABA<sub>A</sub>/CBR recombinants formés de sous-unités natives ou mutées, indiquent que les sites de liaison du GABA sont localisés à l'interface des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  (Amin et Weiss, 1993; White et Gurley, 1995; Kash *et al.*, 2004), et ceux des BZ à la jonction des sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$  (Amin *et al.*, 1997; Sigel, 2002). Selon l'isoforme  $\alpha$  impliquée dans le complexe macromoléculaire, le CBR présente un site de haute affinité ( $\alpha_1$ ; récepteur de type I) ou de basse affinité pour les BZ ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  ou  $\alpha_5$ ; récepteur de type II) (Pritchett et Seeburg, 1990; Ruano *et al.*, 1994; Tietz *et al.*, 1999). Les sous-unités  $\alpha_4$  et  $\alpha_6$  quant à elles, confèrent une insensibilité à certaines BZ telles que le diazépam, le flunitrazépam et le clonazépam (Wisden *et al.*, 1991; Hadingham *et al.*, 1996; Khan *et al.*, 1996). Une étude réalisée sur des cellules granulaires de cervelet a montré que l'ODN déplace la liaison du [<sup>3</sup>H]flumazénil et que son affinité pour ce récepteur est 20 fois plus importante que celle du TTN (Guidotti *et al.*, 1989). A l'inverse des BZ qui potentialisent l'action du GABA sur le courant chlore (Bormann et Clapham, 1985), les endozépines atténuent la réponse des cellules au GABA (Bormann, 1991),

indiquant que ces molécules, à la manière des  $\beta$ -carboline (Mehta et Ticku, 1989; Rogers *et al.*, 1994), se comportent comme des agonistes inverses du CBR.



**Figure 4 : Représentation schématique du complexe macromoléculaire R-GABA<sub>A</sub>/CBR/canal chlore.** Les sites de liaison du GABA, des endozépines (EZ), des benzodiazépines (BZ) et des autres agents modulateurs sont indiqués.

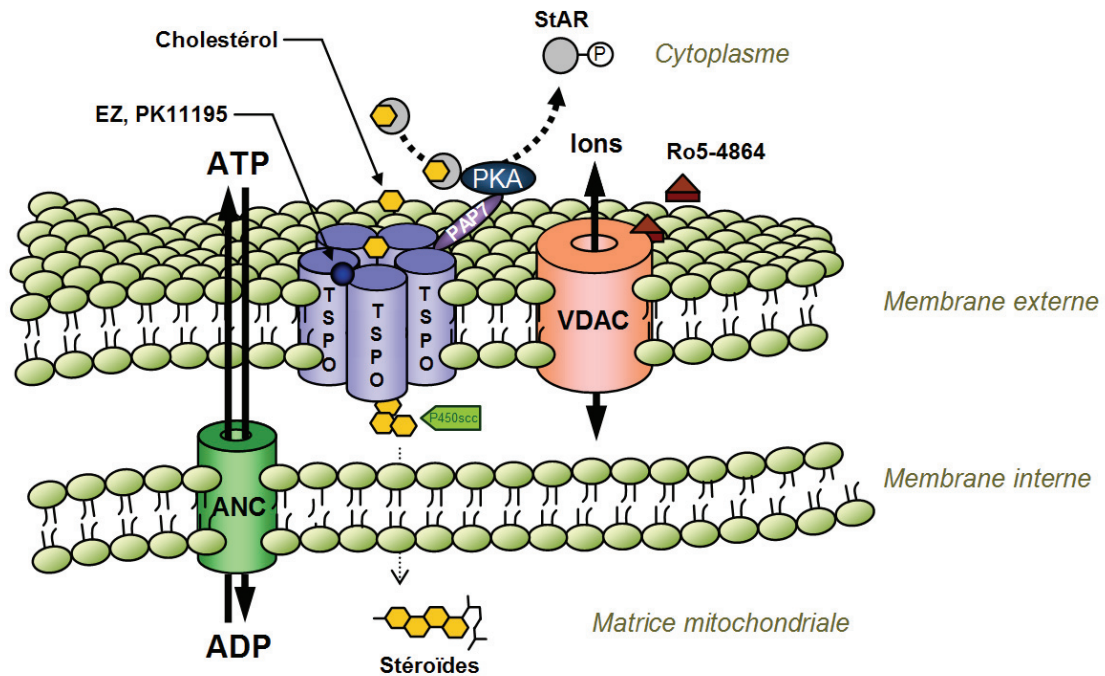
En plus des BZ et des endozépines, divers agents tels que les barbituriques, l'éthanol, des neurostéroïdes et certains cations polyvalents ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$ ) modulent également l'activité des R-GABA<sub>A</sub>/CBR (Hevers et Luddens, 1998). Des études de liaison sur coupes de tissus ont montré que les CBR sont largement distribués dans l'ensemble du SNC des mammifères (Benavides *et al.*, 1992; Rudolph *et al.*, 1999; Sur *et al.*, 2001). Une forte densité de sites de liaison pour les BZ a notamment été mise en évidence dans le striatum, le système limbique et le cortex cérébral (Trifiletti et Snyder, 1985; Sadzot *et al.*, 1989; Ruano *et al.*, 1994), le thalamus et l'hypothalamus (Young et Kuhar, 1980) ainsi que dans le cervelet (Olsen et Tobin, 1990; Benavides *et al.*, 1992). Au niveau cellulaire, les CBR sont principalement exprimés par les neurones (Trifiletti et Snyder, 1985; Nicholson *et al.*, 1992) mais leur présence a également été mise en évidence dans les cellules gliales, en particulier dans les astrocytes (Bureau *et al.*, 1995). Les CBR sont également retrouvés dans certains tissus périphériques comme l'hypophyse ou la surrénale par exemple (Berman *et al.*, 1994; Parramon *et al.*, 1994) mais leur densité est cependant moins importante que celle mesurée dans le SNC (Akinci et Schofield, 1999).

### 2.3.2. Récepteur des benzodiazépines de type périphérique

La présence, en dehors du SNC, de sites de liaison pour le diazépam mais présentant une pharmacologie distincte de celle des CBR (Braestrup et Squires, 1977; Basile *et al.*, 1986) a conduit plusieurs équipes à envisager l'existence d'un deuxième récepteur des BZ, le récepteur dit de type périphérique. Purifié à partir de fractions mitochondriales de surrénales, de pancréas et d'ovaires de rat, ce récepteur est une protéine d'environ 18 kDa qui a également été clonée chez plusieurs espèces de mammifères (Sprengel *et al.*, 1989; Parola *et al.*, 1991; Riond *et al.*, 1991; Kah *et al.*, 1992; Garnier *et al.*, 1994b). Cette protéine présente 5 domaines transmembranaires (Bernassau *et al.*, 1993; Joseph-Liauzun *et al.*, 1998) qui forment un canal pour le cholestérol (Lacapère et Papadopoulos, 2003) (Fig. 5). Elle lie spécifiquement les isoquinolines comme le PK14105 et le PK11195 (Antkiewicz-Michaluk *et al.*, 1988; Riond *et al.*, 1989). Des études de liaison réalisées sur des préparations mitochondriales ont montré que le TTN déplace la liaison du [<sup>3</sup>H]PK11195 et du [<sup>3</sup>H]Ro5-4864 tandis que l'ODN est sans effet (Papadopoulos *et al.*, 1991b; Papadopoulos *et al.*, 1992). L'analyse par Western-blot des complexes protéine 18 KDa-[<sup>35</sup>S]DBI a révélé l'existence d'une seule bande de 27 kDa, visualisée à la fois par autoradiographie et à l'aide d'anticorps dirigés contre la TPSO (Garnier *et al.*, 1994a), indiquant que le DBI peut se lier à ce récepteur. La comparaison de la structure en 3 dimensions du TTN et de 67 autres ligands de la TPSO, ainsi que leur capacité respective à déplacer la liaison du [<sup>3</sup>H]PK11195 sur des homogénats de cortex de rat, a permis de proposer l'implication de la triade Met<sup>30</sup>, Leu<sup>31</sup> et Phe<sup>33</sup> du TTN dans la liaison à la TPSO (Cinone *et al.*, 2000). Il est intéressant de noter que ce site hydrophobe est absent de la structure de l'ODN.

La TPSO forme des pentamères (Fig. 5) qui sont associés à plusieurs autres protéines, un *voltage-dependent anionic channel* (VDAC), un *adenine nucleotide carrier* (ANC) (McEnery *et al.*, 1992), la *peripheral-type benzodiazepine receptor-associated protein 1* (PRAX-1) (Galiegue *et al.*, 1999) et la *PBR and PKA associated protein 7* (PAP7) (Li *et al.*, 2001; Chen et Guilarte, 2008). Le VDAC et l'ANC pourraient participer à la liaison des BZ, mais cela reste controversé (Lacapère et Papadopoulos, 2003). La PRAX-1 permettrait la formation de clusters de TPSO (Galiegue *et al.*, 1999) et la PAP7, en liant à la fois cette protéine et la protéine kinase A (PKA), induirait la phosphorylation par la PKA de la *steroidogenesis acute*

*regulatory protein* (StAR), une protéine chaperonne, favorisant le transport du cholestérol vers les TSPO (Lacapère et Papadopoulos, 2003; Liu *et al.*, 2003; Rone *et al.*, 2009).



**Figure 5 : Représentation schématique des récepteurs des benzodiazépines de type périphérique (TSPO).** ANC, adenine nucleotide carrier; PAP7, PBR and PKA (*R1α*)-associated protein; StAR, steroidogenesis acute regulatory protein; VDAC, voltage-dependent anionic channel (adaptée de Chen *et al.*, 2008).

La TSPO est exprimée dans de nombreux organes ou tissus périphériques, notamment dans l'hypophyse, les glandes salivaires, la surrénale et les gonades (Anholt *et al.*, 1985; De Souza *et al.*, 1985; Yamagishi et Kawaguchi, 1998) ainsi que dans diverses structures cérébrales comme le bulbe olfactif, l'hypothalamus, le cervelet et les plexus choroïdes (Benavides *et al.*, 1983; Schoemaker *et al.*, 1983; Anholt *et al.*, 1984). Néanmoins, son taux d'expression dans le SNC est plus faible que dans les organes périphériques (Braestrup et Squires, 1977; Gallager *et al.*, 1981; Kurumaji et Toru, 1996). Dans le SNC et les tissus périphériques, la TSPO et les endozépines sont globalement exprimées dans les mêmes types cellulaires, notamment dans les cellules stéroïdogènes de la surrénale et des gonades (Krueger et Papadopoulos, 1990; Papadopoulos *et al.*, 1990), et dans plusieurs types de cellules gliales (cellules folliculaires, cellules de Schwann et cellules astrogliales) (Itzhak *et al.*, 1993; Moynagh *et al.*, 1994; Toranzo *et al.*, 1994). La TSPO est principalement localisée au



niveau de la membrane mitochondriale externe (Anholt *et al.*, 1986; Snyder *et al.*, 1987; Itzhak *et al.*, 1993; Alho *et al.*, 1994), mais sa présence a également été mise en évidence au niveau des membranes plasmique (Olsen *et al.*, 1988; Oke *et al.*, 1992; Woods et Williams, 1996) et nucléaire dans certains types cellulaires (Rago *et al.*, 1990; Hardwick *et al.*, 1999; Kuhlmann et Guilarte, 2000).

### 2.3.3. Récepteur métabotrope

Le profil pharmacologique des récepteurs mis en jeu dans l'effet de l'ODN sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose à partir du pancréas de rat perfusé ou d'îlots de Langerhans isolés (Borboni *et al.*, 1991; Ostenson *et al.*, 1994) n'a pas été clairement déterminé. Cependant, certaines observations suggèrent l'intervention d'un récepteur fonctionnellement différent des récepteurs classiques des BZ (De Stefanis *et al.*, 1995). Par ailleurs, il a été montré que les endozépinines augmentent la  $[Ca^{2+}]$  dans divers types cellulaires comme les astrocytes de rat (Lamacz *et al.*, 1996), les neutrophiles humains (Cosentino *et al.*, 2000) et les cellules surrénaliennes de grenouille (Lesouhaitier *et al.*, 2000). Les effets de l'ODN ou du TTN ne sont bloqués ni par les antagonistes spécifiques des CBR ni par ceux de la TSPO (Gandolfo *et al.*, 1997; Lesouhaitier *et al.*, 1998; Cosentino *et al.*, 2000). De plus, dans les astrocytes de rat en culture, l'ODN stimule le métabolisme des polyphosphoinositides (PIPs), *via* une protéine G sensible à la toxine pertussique (PTx) (Patte *et al.*, 1995), indiquant que l'ODN serait également le ligand naturel d'un récepteur couplé à une phospholipase C (PLC) *via* une protéine  $G_{i/o}$ . Sur les cellules médullosurrénaliennes de grenouille et les neutrophiles humains, le TTN agit *via* des récepteurs couplés positivement à l'adénylyl cyclase (Lesouhaitier *et al.*, 2000) ou à la PLC (Marino *et al.*, 2003) par l'intermédiaire d'une protéine  $G_s$  ou  $G_{i/o}$ , respectivement.

L'étude des relations structure/activité de l'ODN vis-à-vis du récepteur métabotrope astrocytaire a montré que l'octapeptide C-terminal de l'ODN (OP) est le plus court fragment biologiquement actif dans ce modèle (Leprince *et al.*, 1998) et a permis de développer un antagoniste de ce récepteur, le cyclo<sub>1-8</sub> [D-Leu<sup>5</sup>]OP (Leprince *et al.*, 2001). Le fait que l'OP soit sans effet sur la liaison du [<sup>3</sup>H]flumazénil dans les cellules granulaires de cervelet, ni sur celle du [<sup>3</sup>H]PK11195 dans les astrocytes de rat (Guidotti *et al.*, 1989), confirme l'existence d'un troisième site de liaison pour les

endozépines pharmacologiquement et fonctionnellement distinct des CBR et de la TSPO dans les cellules gliales.

## **2.4. Activités biologiques des endozépines**

### **2.4.1. Effets comportementaux**

Injectées par voie intracérébroventriculaire (icv) chez le rat, les endozépines exercent des activités anxiogènes (De Mateos-Verchere *et al.*, 1998), pro-agressives (Kavaliers et Hirst, 1986) et pro-conflictuelles (Costa *et al.*, 1983; Guidotti *et al.*, 1983; Ferrero *et al.*, 1986; Slobodyansky *et al.*, 1989). Les effets de l'ODN sont spécifiquement bloqués par le flumazénil, confirmant que ce peptide se comporte comme un agoniste inverse des CBR, alors que ceux du TTN ne sont abolis que par le PK11195, un antagoniste des TSPO (Slobodyansky *et al.*, 1989). Il est intéressant de noter que chez des individus anxieux ou dépressifs, les concentrations de DBI dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) sont plus élevées que chez les sujets témoins (Barbaccia *et al.*, 1986; Ferrero *et al.*, 1988; Roy *et al.*, 1989; Roy, 1991).

De plus, l'administration centrale d'ODN entraîne, *via* l'activation des CBR, une réduction du temps de sommeil induite par le pentobarbital (Dong *et al.*, 1999) et de la prise de boisson chez la souris (Manabe *et al.*, 2001). Il a également été montré que l'injection icv d'ODN diminue l'ingestion de nourriture (De Mateos-Verchere *et al.*, 2001; Do Rego *et al.*, 2007). L'effet anorexigène de l'ODN n'est pas bloqué par des antagonistes des CBR ou des TSPO, mais est aboli par le cyclo<sub>1-8</sub>[DLeu<sup>5</sup>]OP, un puissant antagoniste du récepteur métabotrope (Do Rego *et al.*, 2007).

Une étude récente montre que l'ODN augmente les taux des ARNm codant un peptide anorexigène, l' $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) et réduit l'expression d'un neuropeptide orexigène, le neuropeptide Y (NPY), dans l'hypothalamus du rat affamé (Compère *et al.*, 2003), indiquant que l'effet des endozépines sur la prise alimentaire résulterait à la fois d'une inhibition des voies orexigènes et d'une activation des voies anorexigènes hypothalamiques.

### **2.4.2. Effets sur la stéroïdogénèse**

De nombreux travaux réalisés chez les mammifères, soit à partir de préparations mitochondriales, soit de cellules intactes indiquent que le DBI et le TTN stimulent la

biosynthèse des hormones stéroïdiennes dans les organes périphériques et plus particulièrement dans des cellules de Leydig normales (Besman *et al.*, 1989; Garnier *et al.*, 1993) et tumorales des lignées MA-10 et R2C (Garnier *et al.*, 1993, 1994a), ainsi qu'au niveau des cellules corticosurréaliennes normales (Yanagibashi *et al.*, 1988) et tumorales de la lignée Y-1 (Papadopoulos *et al.*, 1991b). La plupart des travaux montrent que l'action stimulatrice des endozépinines sur la stéroïdogénèse est bloquée par le flunitrazépam (Papadopoulos *et al.*, 1991a, 1991b; Duparc *et al.*, 2003). Il a été proposé que les endozépinines, produites localement dans les cellules stéroïdogènes, en se liant aux TSPO mitochondriaux, favorisent le transport du cholestérol à l'intérieur des mitochondries (Yanagibashi *et al.*, 1989; Papadopoulos *et al.*, 1991b) ou stimulent directement l'activité du cytochrome P-450<sub>sc</sub>, responsable de la conversion du cholestérol en prégnénolone (Brown et Hall, 1991).

Parallèlement à son effet propre sur la stéroïdogénèse chez les mammifères, le DBI est indispensable à l'effet stimulateur de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) sur des cellules surréaliennes (Cavallaro *et al.*, 1992) ainsi qu'à celui de l'hCG sur les cellules de la lignée MA-10 (Boujrad *et al.*, 1993). A l'inverse, les endozépinines pourraient inhiber indirectement la synthèse des hormones stéroïdiennes en réduisant au niveau hypothalamique l'expression des gènes codant la gonadolibérine (Li et Pelletier, 1995; Compère *et al.*, 2004) et la corticolibérine (Givalois *et al.*, 1998).

Enfin, un effet stimulateur du TTN sur la production de corticostérone et d'aldostérone a également été mis en évidence chez la grenouille (Lesouhaitier *et al.*, 1998, 2000). De plus, des travaux menés sur les glandes prothoraciques de papillon ont montré que le DBI est également capable de stimuler la production d'ecdysone (Snyder et Van Antwerpen, 1998), indiquant que la fonction des endozépinines sur la synthèse des stéroïdes est apparue très tôt au cours de l'évolution.

#### **2.4.3. Effets des endozépinines sur le métabolisme lipidique**

Le DBI, qui présente une grande affinité pour les esters d'acyl-CoA (Knudsen, 1991; Rosendal *et al.*, 1993; Faergeman *et al.*, 1996), protège ces derniers de l'action des acyl-CoA hydroxylases (Rasmussen *et al.*, 1993) et favorise leur transport vers les mitochondries et les microsomes où ils sont utilisés pour la synthèse de glycérolipides (Knudsen *et al.*, 1993; Rasmussen *et al.*, 1994). La surexpression du gène *DBI* stimule la lipogénèse dans les cellules McA-RH 7777, une lignée de cellules tumorales

d'origine hépatique (Yang *et al.*, 2001). Inversement, l'inactivation chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* du gène *DBI* induit une augmentation de la concentration des esters d'acyl-CoA, et, par voie de conséquence, réduit les taux d'acides gras (Schjerling *et al.*, 1996), confirmant l'importance du DBI dans le contrôle du métabolisme lipidique.

#### **2.4.4. Autres effets des endozépines**

##### **a) Effets des endozépines sur les glandes endocrines**

Outre leurs effets sur les glandes stéroïdogènes, les endozépines modulent également la libération d'hormones au niveau du tube digestif. En effet, l'administration de DBI par voie intra-duodénale provoque une augmentation du taux de cholécystokinine (CCK) plasmatique, stimulant ainsi la sécrétion de l'amylase pancréatique (Herzig *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2000). Une étude menée sur la lignée de cellules tumorales d'origine intestinale STC1 montre que l'action de l'ODN sur la libération de CCK nécessite un influx de calcium *via* des canaux de type L (Yoshida *et al.*, 1999), suggérant que l'effet des endozépines sur la libération de CCK s'effectue indépendamment des récepteurs des BZ.

##### **b) Effets des endozépines sur la prolifération cellulaire**

Les quantités d'endozépines mesurées dans les glioblastomes et les astrocytomes de hauts grades sont supérieures à celles détectées dans des tissus sains (Ferrarese *et al.*, 1989b; Alho *et al.*, 1995; Miettinen *et al.*, 1995). De même, le niveau d'expression du gène codant le DBI est particulièrement élevé dans les carcinomes hépatiques humains (Venturini *et al.*, 1998a, 1998b, 1999) et le taux circulant de DBI chez les patients porteurs de ces tumeurs est multiplié par un facteur 2,5 (Venturini *et al.*, 1998a). Par ailleurs, le profil d'expression des endozépines observé durant l'ontogenèse (Malagon *et al.*, 1993; Burgi *et al.*, 1999) coïncide avec celui de la prolifération des cellules gliales dans le SNC. Enfin, une augmentation de l'immunoréactivité de type ODN a été mise en évidence dans les cellules de Schwann au cours du processus de régénération nerveuse (Lacor *et al.*, 1996, 1999). L'ensemble de ces observations suggère que les endozépines exerceraient des effets trophiques. De fait, le DBI et ses dérivés stimulent la prolifération des cellules de mélanomes humains (Apfel *et al.*, 1992) et des cellules de Leydig de la lignée MA-10 (Garnier *et al.*, 1993). De même, l'ODN et le TTN augmentent l'incorporation de [<sup>3</sup>H]thymidine dans les

astrocytes de rat en culture (Gandolfo *et al.*, 1999, 2000). Inversement, l'inhibition de la biosynthèse du DBI par transfection d'oligonucléotides antisens dans la lignée pré-adipocytaire 3T3-L1 (Mandrup *et al.*, 1998) ou d'ARN interférents dans différentes lignées cellulaires humaines (Faergeman et Knudsen, 2002) bloque l'incorporation de [<sup>3</sup>H]thymidine et provoque la mort des cellules par apoptose. L'effet des endozépines sur la prolifération cellulaire semble en général mettre en jeu l'activation des TSPO (Garnier *et al.*, 1993; Gandolfo *et al.*, 2000). A l'appui de cette hypothèse, plusieurs études ont montré une corrélation positive entre la densité de TSPO et la quantité d'endozépines dans diverses lignées tumorales (Alho *et al.*, 1995; Miettinen *et al.*, 1995; Hardwick *et al.*, 1999).

### **c) Effets des endozépines sur le système immunitaire**

Des expériences menées *in vitro*, sur des monocytes humains, ont montré que les endozépines potentialisent l'action stimulatrice des lipopolysaccharides bactériens sur la production et la synthèse de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (Taupin *et al.*, 1991, 1993b; Stepien *et al.*, 1993). Les effets immunomodulateurs des endozépines, qui ne sont mimés que par le Ro5-4864, mettent en jeu les TSPO (Taupin *et al.*, 1991, 1993a). Par la suite, des travaux réalisés sur des neutrophiles humains ont montré que le TTN stimule la synthèse et la libération de l'IL-8, et augmente la sensibilité chimiotactique et l'activité phagocytaire de ces cellules en activant un récepteur métabotropique couplé à la PLC (Cosentino *et al.*, 2000; Marino *et al.*, 2003).

## **2.5. Contrôle de la libération des endozépines**

Plusieurs approches dont le RIA des endozépines ont permis de mettre en évidence leur présence dans le plasma (Ball *et al.*, 1986) et le LCR chez l'homme (Ferrarese *et al.*, 1990) ainsi qu'au niveau de la lumière duodénale chez le rat (Herzig *et al.*, 1998), indiquant que les endozépines pouvaient être libérées *in vivo*.

L'identification des facteurs neuronaux contrôlant la sécrétion des endozépines par les cellules gliales a été réalisée sur des cultures d'astrocytes de rat. Ces travaux, menés au laboratoire, ont montré que la libération d'endozépines est stimulée par le PACAP *via* l'activation des récepteurs PAC1 positivement couplés à l'adenylyl cyclase et la phospholipase C (Masmoudi *et al.*, 2003, 2006), et par le peptide  $\beta$ -

amyloïde en interagissant avec les récepteurs des peptides N-formylés (Tokay *et al.*, 2005, 2008). Inversement, cette libération est inhibée par l'activation du récepteurs GABA<sub>B</sub> (Patte *et al.*, 1999) et des récepteurs sst1, sst2 et sst4 de la somatostatine (Masmoudi *et al.*, 2005), tous négativement couplés à l'adénylyl cyclase. Le PACAP, le peptide  $\beta$ -amyloïde et la somatostine modulent également de façon coordonnée l'expression du DBI dans les astrocytes (Masmoudi *et al.*, 2005; Tokay *et al.*, 2005). Plus récemment, il a été démontré que l'exportation des endozépines, peptides non vésiculés (Tonon *et al.*, 1990; Vidnyanszky *et al.*, 1994), vers le milieu extracellulaire s'effectue *via* des transporteurs de type *ATP binding cassette* (ABC) (Tokay *et al.*, 2008). L'ensemble de ces données indique que la production d'endozépine par les cellules astrogliales est finement régulée par des facteurs produits par les neurones, incluant des neuropeptides et des neurotransmetteurs classiques.

### **3. Régulation centrale de l'homéostasie énergétique**

Le rôle majeur de l'hypothalamus dans la régulation du comportement alimentaire a été mis en évidence dès les années 50, par des travaux montrant que la lésion du noyau ventromédian (NVM) s'accompagne d'hyperphagie et/ou d'obésité tandis que la destruction de l'hypothalamus latéral (HL) induit une diminution de la prise de nourriture et une perte de poids chez le rat (Hetherington, 1940; Anand et Brodeck, 1951). Plus tard, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence le rôle essentiel du NA dans la régulation de l'homéostasie énergétique.

#### **3.1. Structures hypothalamiques et comportement alimentaire**

De par sa position anatomique, à l'interface entre le LCR et le sang circulant dans l'endothélium vasculaire fenestré de l'éminence médiane, le NA est un site privilégié pour percevoir l'évolution du statut énergétique de l'organisme (Kalra *et al.*, 1999). Le NA est constitué de deux populations neuronales distinctes, dites de premier ordre, qui exercent des effets opposés sur le comportement alimentaire. L'une exprime la proopiomélanocortine (POMC), précurseur de l' $\alpha$ -MSH (Poggioli *et al.*, 1986) et le *cocaine- and amphetamine-regulated transcript* (CART) (Elias *et al.*, 1998; Kristensen *et al.*, 1998), deux neuropeptides anorexigènes et l'autre produit le NPY (Stanley *et al.*, 1986) et l'*agouti-related protein* (AgRP) (Broberger *et al.*, 1998; Hahn *et al.*, 1998), deux neuropeptides orexigènes. Ces populations neuronales projettent

vers des neurones dits de second ordre, localisés dans le noyau paraventriculaire (NPV), l'aire périfornicale (APF), l'HL, le NVM et le noyau dorsomédian (NDM) de l'hypothalamus, impliqués dans l'adaptation du comportement alimentaire et/ou la régulation de l'homéostasie énergétique de l'organisme. Les principaux peptides impliqués dans la régulation du comportement alimentaire sont répertoriés dans le tableau 2.

### **3.1.1. Neurones de 1<sup>er</sup> ordre du noyau arqué**

#### **d) Neurones à $\alpha$ -MSH/CART**

Administrée par voie icv, l' $\alpha$ -MSH exerce un effet anorexigène qui s'accompagne d'une diminution de la masse corporelle (Fan *et al.*, 1997; Grill *et al.*, 1998; McMinn *et al.*, 2000). L'effet de l' $\alpha$ -MSH sur la prise alimentaire est aboli par une injection d'AgRP ou de son fragment C-terminal, l'AgRP<sub>(83-132)</sub> indiquant la mise en jeu des récepteurs au mélanocortine de type 3 et 4 (MCR3/4) (Rossi *et al.*, 1998). Le jeûne, qu'il soit aigu ou chronique, entraîne une diminution de l'expression de la POMC (Giraudou *et al.*, 1998). La réalimentation des animaux permet de restaurer les taux d'ARNm de la POMC à des niveaux comparables à ceux mesurés chez les animaux nourris normalement (Swart *et al.*, 2002). Plusieurs cas d'obésité sévère rapportés chez l'homme sont liés à la présence de mutations sur les gènes codant la POMC, le MCR3 ou le MCR4 (Krude *et al.*, 1998; Vaisse *et al.*, 2000; Schalin-Jantti *et al.*, 2003). De même, chez la souris, l'inactivation d'un seul allèle du gène de la POMC est suffisante pour entraîner un surpoids (Challis *et al.*, 2004). L'ensemble de ces données montre la place cruciale du système mélanocortinique dans le contrôle de la balance énergétique.

Le CART, qui est colocalisé avec la POMC dans les neurones du NA (Elias *et al.*, 1998), voit également son expression diminuée chez des rats soumis à un jeûne aigu (24 et 48 h) et dans plusieurs modèles de souris obèses (Kristensen *et al.*, 1998).

**Tableau 2 : Principaux facteurs hypothalamiques impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique.**

	<b>Peptides</b>	<b>Récepteur(s) Impliqué(s)</b>	<b>Site(s) d'expression dans l'hypothalamus</b>	<b>Références</b>
<b>Facteurs orexigènes</b>	Agouti-related protein	MC3-R, MC4-R	NA	Fong <i>et al.</i> , 1997; Small <i>et al.</i> , 2001
	Beacon	N.D.	NA, HL/APF, NPV	Collier <i>et al.</i> , 2000
	Dynorphine	Kappa	NPV	Lambert <i>et al.</i> , 1993
	GABA	GABA <sub>A</sub> , GABA <sub>B</sub>	NA, NVM	Morley, 1981; Patel et Ebenezer, 2004
	Galanine	Gal-R1, -R2, -R3	NA, NDM, HL/APF	Branchek <i>et al.</i> , 2000
	Galanin-like peptide	Gal-R2	NA, NPV	Matsumoto <i>et al.</i> , 2002; Seth <i>et al.</i> , 2003
	Ghréline	GHS-R	NA	Wren <i>et al.</i> , 2001
	MCH	MCH1-R, MCH2-R	HL/APF	Qu <i>et al.</i> , 1996
	Neuropeptide Y	Y1-R, Y2-R, Y5-R	NA, NDM, NVM	Billington <i>et al.</i> , 1991; Erickson <i>et al.</i> , 1996
	Nociceptine	ORL-1	NA	Polidori <i>et al.</i> , 2000
	Orexine A	Ox1-R, Ox2-R	HL/APF	Haynes <i>et al.</i> , 1999; Shiraishi <i>et al.</i> , 2000
	VGF	N.D.	NA	Hahm <i>et al.</i> , 2002
	26RFa/43RFa	GPR103	NVM, HL	Chartrel <i>et al.</i> , 2003; do Rego <i>et al.</i> , 2006
<b>Facteurs anorexigènes</b>	α-MSH	MC3-R, MC4-R	NA	Fan <i>et al.</i> , 1997; Yaswen <i>et al.</i> , 1999
	Apéline	APJ	NA, NPV	Reaux <i>et al.</i> , 2002
	BDNF	TrkB	NVM	Xu <i>et al.</i> , 2003
	Bombésine/GRP	GRP-R	NPV	Wada <i>et al.</i> , 1998; Ladenheim <i>et al.</i> , 2002
	CART	N.D.	NA, NDM, HL/APF	Bannon <i>et al.</i> , 2001
	CGRP	CGRP-R	NA, HL/APF	Dhillon <i>et al.</i> , 2003
	CRH	CRH1-R, CRH2-R	NPV	Bernstein <i>et al.</i> , 1998
	ODN	RCPG de l'ODN	NA	Garcia de Mateos-Verchere <i>et al.</i> , 2001; Do Rego <i>et al.</i> , 2007
	Dopamine	D1, D2	NA, NDM	Ladurelle <i>et al.</i> , 1991
	GLP-1	GLP1-R	NA, NDM, HL, NPV, NVM	Tang-Christensen <i>et al.</i> , 1996; Peters <i>et al.</i> , 2001
	GLP-2	GLP2-R	NDM	Tang-Christensen <i>et al.</i> , 2000
	Nesfatine-1	N.D.	NA, NPV	Oh <i>et al.</i> , 2006; Kohno <i>et al.</i> , 2008
	Neuroméline S	NMU2R	NPV	Ida <i>et al.</i> , 2005
	Neuroméline U	NMU2R	NVM	Howard <i>et al.</i> , 2000; Kowalski <i>et al.</i> , 2005
	Neuropeptide B et W	GPR7	NPV	Ishii <i>et al.</i> , 2003
	Neurotensine	NTR-1	NA, NDM, NPV, NVM	Sahu <i>et al.</i> , 2001; Remaury <i>et al.</i> , 2002
	NPFF	NPFF-1, NPFF-2	NVM, NDM	Sunter <i>et al.</i> , 2001)
	Ocytocine	OXT-R	NPV	Arletti <i>et al.</i> , 1989; Olson <i>et al.</i> , 1991
	PACAP	N.D.	NA, NVM	Chance <i>et al.</i> , 1995; Mizuno <i>et al.</i> , 1998
	PrRP	GPR10	NDM	Vergoni <i>et al.</i> , 2002; Gu <i>et al.</i> , 2004
	Sérotonine	5HT1, 5HT2	NPV	Dourish, 1995; Currie <i>et al.</i> , 2002
	Somatostatine	N.D.	NA, NVM	Scalera et Tarozzi, 1998
	TRH	TRH-R1	NPV	Kow et Pfaff, 1991
	Urocortine	CRF2-R	NVM, HL	Spina <i>et al.</i> , 1996; Ohata <i>et al.</i> , 2000; Reyes <i>et al.</i> , 2001

26-RFamide; 43-RFa, 43-RFamide; CGRP, *calcitonin gene-related peptide*; GLP-1, *glucagon-like peptide-1*; GLP-2, *glucagon-like peptide-2*; NPFF, *neuropeptide FF*; PrPP, *prolactin-releasing peptide*, VGF, *vascular growth factor*, N.D., non déterminé



L'administration centrale d'anticorps dirigés contre le CART stimule la prise alimentaire chez le rat (Kristensen *et al.*, 1998; Lambert *et al.*, 1998) indiquant que ce peptide endogène exerce un effet anorexigène. Les mêmes auteurs montrent que l'administration de CART ou de son fragment terminal, inhibe l'action orexigène du NPY (Kristensen *et al.*, 1998; Lambert *et al.*, 1998). De façon paradoxale, l'injection de CART<sub>(82-103)</sub> seul, directement au niveau du NA, augmente la prise alimentaire (Abbott *et al.*, 2001). Ces résultats, apparemment contradictoires, suggèrent qu'il existe plusieurs populations neuronales exprimant le CART et qu'elles exercent des rôles différents dans le contrôle de l'homéostasie énergétique.

#### e) Neurones à NPY/AgRP

Le NPY, nommé ainsi en raison de la présence de résidus tyrosine aux extrémités N- et C- terminales de sa séquence, est un peptide de 36 acides aminés qui a été initialement isolé à partir d'un extrait de cerveaux de porc par Tatemoto et collaborateurs en 1982. Une injection aiguë de NPY, à des doses de 2 à 10 µg par voie icv ou directement au niveau du NA, stimule la prise de nourriture chez le rat rassasié (Clark *et al.*, 1984; Stanley et Leibowitz, 1984, 1985). L'effet orexigène du NPY est relayé par les récepteurs Y<sub>1</sub> et Y<sub>5</sub>, des récepteurs de type RCPG couplés négativement à l'adénylyl cyclase (Aakerlund *et al.*, 1990; Gerald *et al.*, 1996; Hu *et al.*, 1996; Kanatani *et al.*, 2001). Lors d'un jeûne, aigu ou chronique, la concentration en NPY au niveau du NA est doublée puis retourne vers des valeurs basales après réalimentation des animaux (Sahu *et al.*, 1988; Sanacora *et al.*, 1990; Swart *et al.*, 2002). Réciproquement, l'administration chronique de NPY chez le rat induit une obésité (Zarjevski *et al.*, 1993). L'ensemble de ces observations démontre l'importance du NPY dans la régulation à court et à long terme de la prise alimentaire. Toutefois, les souris transgéniques n'exprimant pas le gène du NPY possèdent un poids et une masse grasseuse normaux (Thorsell et Heilig, 2002). L'absence d'un phénotype « anorexique » chez ces animaux suggère l'existence de systèmes orexigènes compensateurs ou alternatifs. De fait, une étude menée sur ce modèle indique que le jeûne augmente l'expression du gène codant l'AgRP dans les neurones du NA et que ces animaux présentent une hypersensibilité à une injection icv du peptide (Marsh *et al.*, 1999).

La découverte de l'AgRP découle directement de l'étude d'un modèle de souris obèse, hyperphage et au pelage jaune dont le phénotype est dû à la surexpression dans tout l'organisme de la protéine agouti (Lu *et al.*, 1994). Contrairement à cette dernière, l'AgRP est normalement exprimée au niveau du NA dans 90% des neurones NPYergiques (Broberger *et al.*, 1998). Il a été récemment observé par immunohistochimie que l'AgRP est également présente dans des astrocytes du NA (Dunbar *et al.*, 2005). L'administration par voie icv d'une dose unique de 100 pmoles d'AgRP induit une hyperphagie qui perdure durant les 7 jours qui suivent l'injection (Hagan *et al.*, 2000). Enfin, un jeûne de 24 h entraîne une augmentation de l'expression du gène de l'AgRP dans les neurones du NA, confirmant l'implication de ce neuropeptide dans la régulation de la prise alimentaire (Swart *et al.*, 2002). A l'instar de la protéine agouti, l'AgRP agit comme un antagoniste naturel des récepteurs des MCR3/4 (Ollmann *et al.*, 1997).

### 3.1.2. Populations neuronales de second ordre

Les populations neuronales de second ordre sont localisées dans le NPV, l'APF, l'HL, le NVM et le NDM.

Au sein du NPV, les fibres à POMC/CART et NPY/AGRP forment des contacts synaptiques notamment avec les neurones produisant des neuropeptides anorexigènes i.e. la *corticotropin-releasing hormone* (CRH) (Suda *et al.*, 1993), la *thyrotropin-releasing hormone* (TRH) (Legradi et Lechan, 1998) et l'ocytocine (Schwartz *et al.*, 2000). Des travaux effectués chez des rats normalement nourris montrent que l'administration d'antagonistes des récepteurs MC4R dans le NPV augmente la prise de nourriture (Giraudou *et al.*, 1998), démontrant que le tonus satiétogène exercé par le système mélanocortinique est en partie relayé par cette structure.

Les fibres à POMC/CART et NPY/AgRP émettent également des contacts synaptiques avec d'autres populations neuronales localisées dans l'HL et le APF notamment les neurones à *melanin-concentrating hormone* (MCH) (Qu *et al.*, 1996; Hervieu, 2003; Badami *et al.*, 2010) et les neurones à orexine A (De Lecea *et al.*, 1998; Haynes *et al.*, 1999; Martynska *et al.*, 2005; Badami *et al.*, 2010). Injectés par voie icv, le MCH et l'orexine augmentent la prise de nourriture (Qu *et al.*, 1996; Szekely *et al.*, 2002). Des travaux menés sur des animaux déficients pour le gène de

l'orexine montrent que les effets hyperphagiques de ce peptide sont principalement associés à son action sur le cycle du sommeil (Willie *et al.*, 2001). L'existence d'un phénotype hypophagique chez les souris déficientes pour le gène codant le récepteur du MCH (Shimada *et al.*, 1998) démontre l'implication directe de celui-ci dans les mécanismes d'adaptation du comportement alimentaire. De plus, l'expression de la MCH est stimulée par l'injection centrale d'AgRP chez des souris normalement nourries (Hanada *et al.*, 2000), indiquant que cette population neuronale est également assujettie au tonus satiétogène exercé par le système mélanocortinique.

Par ailleurs, les populations neuronales localisées au niveau du **NDM** expriment également la MCH (Badami *et al.*, 2010). Ces neurones reçoivent des afférences synaptiques en provenance des neurones à POMC/CART et à NPY/AgRP du NA (Kalra *et al.*, 1999) et des neurones du NVM. Les neurones à MCH se projettent non seulement vers le NPV, mais également vers le NVM (Wynne *et al.*, 2005), connexions qui pourraient constituer une boucle de rétroaction.

Au niveau du **NVM**, les fibres à POMC/CART et à NPY/AgRP forment des contacts synaptiques avec des populations de neurones produisant le BDNF (Sternson *et al.*, 2005), un neuropeptide aux propriétés anorexigènes (Rios *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2003). Des travaux effectués chez l'homme et le rongeur montrent que la délétion du gène codant le récepteur du BDNF s'accompagne d'une hyperphagie et d'une obésité morbide (Lyons *et al.*, 1999; Yeo *et al.*, 2004), suggérant que les neurones à BDNF sont nécessaires au tonus satiétogène exercé par le système mélanocortinique. Les neurones à BDNF émettent des projections notamment vers les noyaux du NPV, LH, NDM et vers le NTS (Sclafani *et al.*, 1975; Canteras *et al.*, 1994; McClellan *et al.*, 2006), suggérant que le NVM aurait un rôle de modulateur.

Les connexions entre les noyaux hypothalamiques et le noyau du tractus solitaire (NTS) impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique seront traitées dans le chapitre III-2.1.

### **3.2. Structures cérébrales et métabolisme périphérique**

Le tronc cérébral, et plus particulièrement le NTS, participe à la régulation de l'homéostasie énergétique en périphérie (Scheurink et Nolan, 1996). Ce noyau est innervé par des fibres afférentes en provenance d'un grand nombre de noyaux

hypothalamiques (Ricardo et Koh, 1978; Van Der Kooy *et al.*, 1984; Ter Horst *et al.*, 1989), qui, par le biais de cette structure, peuvent également participer au maintien de la balance énergétique.

### 3.2.1. Interactions entre le tronc cérébral et le système nerveux autonome

Le stockage et la mise à disposition du glucose et des acides gras en périphérie sont des mécanismes régulés par le système nerveux autonome (SNA). Le SNA est une structure contrôlée par le tronc cérébral et plus particulièrement par le NTS, dont les projections innervent les neurones préganglionnaires des fibres sympathiques (ou orthosympathiques) et parasympathiques (Campbell et Reece, 2007) qui ont un effet opposé sur les organes cibles. Les fibres ortho- et parasympathiques, dont les neuromédiateurs sont respectivement la noradrénaline et l'acétylcholine, innervent la plupart des organes périphériques dont notamment le pancréas, le foie, les adipocytes et les muscles squelettiques (Campbell et Reece, 2007). Ainsi, le système parasympathique favorise le stockage du glucose et des acides gras libres tandis que l'orthosympathique favorise leurs libérations (Scheurink et Nolan, 1996) (Fig. 6).

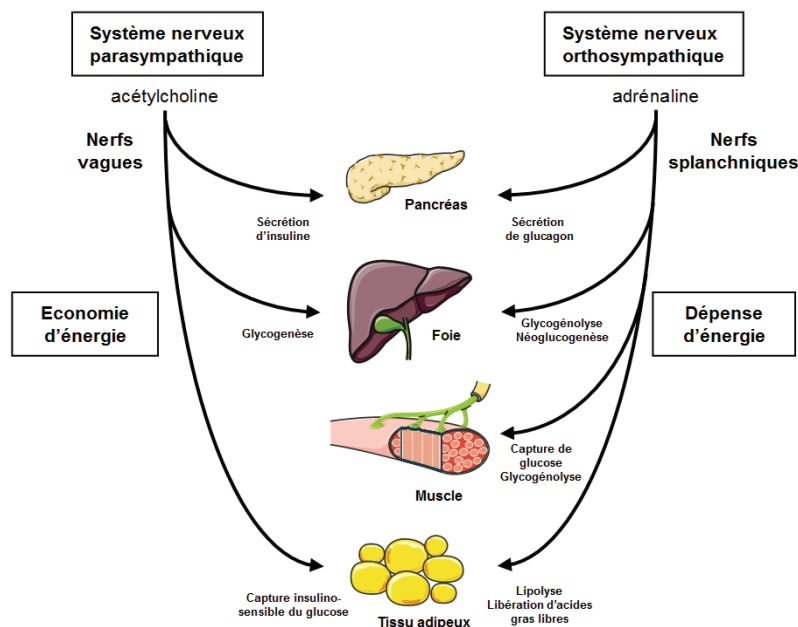


Figure 6 : Effets du système nerveux autonome sur l'homéostasie énergétique.

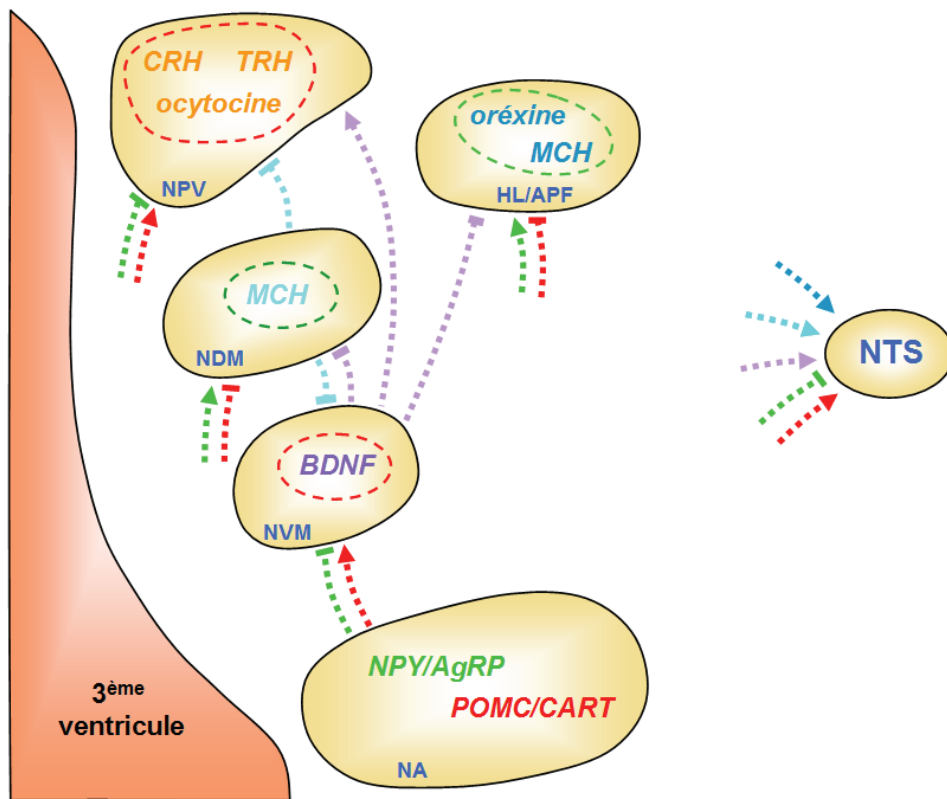
### 3.2.2. Interactions entre l'hypothalamus et le système nerveux autonome

Il existe un grand nombre de connexions réciproques entre plusieurs noyaux hypothalamiques et le NTS (Ricardo et Koh, 1978; Van Der Kooy *et al.*, 1984; Ter Horst *et al.*, 1989). A titre d'exemple, l'activation des récepteurs MCR4 qui sont exprimés par les neurones du NA se projetant vers le NTS, diminue l'appétit *via* l'activation du nerf vague (Grill *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2000).

Par ailleurs, le NTS présente des neurones à NPY/AgRP et à POMC/CART se projetant vers le NPV (Wynne *et al.*, 2005; Morton *et al.*, 2006), suggérant que cette région hypothalamique reçoit les informations provenant du SNA et peut, en conséquence, adapter son activité. De plus, des expériences réalisées sur des rats ont montré que les fibres à ocytocine du NPV innervant le NTS (Sawchenko, 1987; Landgraf *et al.*, 1990; Blevins *et al.*, 2003) sont également capables de moduler l'appétit (Maejima *et al.*, 2009), indiquant l'existence d'une communication bilatérale entre ces deux structures (Fig. 7).

De même, des expériences réalisées sur la souris ont mis en évidence l'existence d'interactions réciproques directes entre les neurones issus du NVM et de l'HL et ceux du NTS (Wynne *et al.*, 2005) (Fig. 7). Ainsi, à titre d'exemple, l'activation des neurones localisés dans l'HL stimule l'activité du SNA, tandis que la modulation de l'activité du SNA par des organes cibles tels que le foie et les intestins, modulerait en retour, *via* le NTS, l'activité électrique des populations neuronales de l'HL (Kirchgessner, 2002). Par ailleurs, des études plus récentes ont montré que les fibres à MCH innervant le NTS sont impliquées dans la régulation du stockage de graisse en périphérie (Zheng *et al.*, 2005).

Certains neurones hypothalamiques localisés aux niveaux du NA, de l'HL, du NDM et du NPV se projettent également vers les neurones préganglionnaires sympathiques et parasympathiques (Palkovits, 1999; Elmquist, 2001; Van den Top *et al.*, 2003), indiquant que ces régions pourraient participer de manière directe au contrôle de l'homéostasie énergétique exercée par le SNA. A titre d'exemple, l'utilisation de traceurs rétrogrades a permis de mettre en évidence l'existence d'interactions directes entre les neurones à POMC/CART du NA et des neurones préganglionnaires innervant les adipocytes (Elias *et al.*, 1998).



**Figure 7 : Connexions nerveuses intra- et extra-hypothalamiques, impliquées dans l'homéostasie énergétique.** Les peptides orexigènes sont entourés par un trait discontinu vert et les peptides anorexigènes par un trait discontinu rouge. Les interactions entre les différentes populations de neurones sont illustrées par une flèche (stimulation) ou une ligne interrompue (inhibition).

## 4. Sensibilité hypothalamique aux informations métaboliques

### 4.1. Sensibilité aux hormones

Les récepteurs spécifiques aux principales hormones impliquées dans le maintien de l'homéostasie énergétique (leptine, insuline, ghréline, GLP-1, CCK...) sont exprimés au niveau de l'hypothalamus. Ceux-ci permettent la détection du taux d'hormone circulant, et assurent ainsi un ajustement de la prise alimentaire et des dépenses énergétiques. Etant donné l'intérêt que nous avons porté au cours de nos travaux à l'insuline et la leptine, seules les actions centrales de ces deux hormones seront traitées dans les paragraphes suivants.

#### 4.1.1. L'insuline

L'insuline est produite par les cellules  $\beta$  pancréatiques et libérée en condition d'hyperglycémie (Ferner, 1951). Cette hormone, dont les effets s'opposent à ceux du glucagon synthétisé par les cellules  $\alpha$ -pancréatiques, permet le maintien de la glycémie autour d'une valeur moyenne de 5 mM chez le rat (Jiang et Zhang, 2003). Le récepteur de l'insuline (INS-R) est un récepteur ubiquiste qui est présent à la fois au niveau de la périphérie et du SNC (Unger *et al.*, 1991). L'injection centrale d'insuline chez le singe induit une diminution de la prise alimentaire qui s'accompagne d'une augmentation des dépenses énergétiques (Woods *et al.*, 1979).

Inversement, l'administration dans le NA d'ARN antisens dirigés contre INS-R induit une hyperphagie qui s'accompagne d'une augmentation du stockage par les adipocytes (Obici *et al.*, 2002a). Enfin, l'injection intrapéritonéale d'insuline stimule l'expression de la POMC au niveau du NA (Pritchard *et al.*, 2002), et des travaux réalisés chez le rat montrent que l'effet anorexigène d'une injection centrale d'insuline est bloqué par un antagoniste des récepteurs MCR3/4 (Benoit *et al.*, 2002), indiquant que l'effet satiétogène de l'insuline est relayé par le système mélanocortinique.

Des données de la littérature indiquent que les astrocytes sont directement sensibles à cette hormone. Ainsi, des études de liaison réalisées sur des astrocytes en culture révèlent qu'ils expriment également des récepteurs pour cette hormone (Zhu *et al.*, 1990). De plus, l'application d'insuline dans le milieu de culture stimule l'entrée du glucose dans le cytosol et la synthèse de glycogène (Kum *et al.*, 1992). L'existence de récepteurs fonctionnels sur les astrocytes suggère qu'ils pourraient être impliqués dans la réponse des neurones du NA à l'insuline.

#### 4.1.2. La leptine

La leptine est une cytokine de 16 kDa codée par le gène *ob*, (Zhang *et al.*, 1994) principalement produite par les adipocytes (Ahima et Osei, 2004). Les taux circulants de cette hormone sont proportionnels à la quantité de tissu adipeux et reflètent de ce fait le statut énergétique de l'organisme. Les modèles murins de déficience du gène codant la leptine (souris *ob/ob*) ou son récepteur (souris *db/db*) présentent un phénotype obèse caractérisé par une augmentation de la prise alimentaire et une diminution de la dépense énergétique (Friedman et Halaas, 1998). L'administration chronique de leptine à des souris *ob/ob* entraîne une réduction la prise alimentaire, une

augmentation de la dépense énergétique et une réduction rapide de la masse corporelle (Weigle *et al.*, 1995).

Le récepteur de la leptine, codé par le gène *db*, est un récepteur à un seul domaine transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs des cytokines (Moran et Phillip, 2003). Son transcrit primaire peut subir des mécanismes d'épissage alternatif aboutissant à la synthèse de plusieurs isoformes, les isoformes courtes (Ob-Ra/c/d) et longue (Ob-Rb), ainsi que l'isoforme sécrétée (Ob-Re) (Moran et Phillip, 2003). En périphérie, la leptine agit principalement *via* les formes courtes du récepteur, qui ont une localisation ubiquiste, tandis qu'au niveau du SNC elle lie la forme longue Ob-Rb, dont l'expression est particulièrement élevée dans l'hypothalamus ventromédian (Bates et Myers, 2003; Funahashi *et al.*, 2003). L'inactivation du gène *db*, spécifiquement au niveau du SNC, induit un phénotype obèse (Seeley *et al.*, 1996). Parallèlement, elle provoque une diminution des ARNm codant le NPY et l'AgRP (Munzberg *et al.*, 2005) et une augmentation de ceux codant la POMC (Cowley *et al.*, 2001) au niveau du NA. La présence d'Ob-Rb dans le NPV et l'HL (Hakansson *et al.*, 1998) indique que la leptine pourrait également agir directement sur les neurones de second ordre. De plus, la présence du récepteur de la leptine sur les astrocytes hypothalamiques (Cheunsuang et Morris, 2005; Hsueh *et al.*, 2009b) et ceux du NTS (Dallaporta *et al.*, 2009) suggère qu'ils sont également impliqués dans la détection centrale de cette hormone. A l'appui de cette hypothèse, l'expression du récepteur de la leptine est fortement augmentée au niveau des astrocytes hypothalamiques dans des modèles murins d'obésité innée ou acquise (Hsueh *et al.*, 2009b).

## **4.2. Sensibilité aux métabolites**

L'hypothalamus est également capable de détecter et d'intégrer les variations de concentration des métabolites présents dans le sang. Ceux-ci proviennent principalement de l'alimentation et peuvent être classés en trois catégories: les acides aminés, les acides gras et les glucides (Blouet et Schwartz, 2010). Ces métabolites sont essentiels au maintien de l'activité cellulaire (synthèse protéique, respiration cellulaire...) et leurs taux circulants reflètent à tout moment le statut énergétique de l'organisme.



#### 4.2.1. Les acides aminés

Dès les années 50, Mellinkoff suggéra qu'il existe une relation directe entre les taux circulants d'acides aminés et la sensation de faim (Mellinkoff *et al.*, 1956). Trente ans plus tard, Peter et Harper ont montré qu'un régime hyper-protéiné s'accompagne, dès le premier jour, d'une diminution de la prise de nourriture et d'une augmentation de la concentration d'acides aminés dans le sang et le LCR (Peters et Harper, 1987; Harper et Peters, 1989). Par une approche de microdialyse, il a été démontré que les concentrations en acides aminés essentiels, tels que la leucine par exemple, sont augmentées dans certains noyaux hypothalamiques suite à un repas hyper-protéiné (Currie *et al.*, 1995). De plus, l'injection par voie icv de leucine induit une diminution de la prise alimentaire chez des rats affamés (Cota *et al.*, 2006). Ces mêmes auteurs ont montré que cet effet met en jeu la *mammalian target of rapamycin* (mTOR), une enzyme de la famille des thréonine/sérine kinases, qui est notamment localisée dans les neurones à NPY/AgRP et POMC/CART du NA (Inhoff *et al.*, 2010; Cota *et al.*, 2006). Enfin, les travaux de Schwartz et collaborateurs indiquent que les effets satiétogènes d'une injection centrale de leucine sont relayés par l'activation des neurones à POMC/CART du NA qui s'accompagne d'une stimulation des neurones à ocytocine du NPV et des fibres sympathiques du NTS (Blouet *et al.*, 2009).

#### 4.2.2. Les acides gras

De la même manière que pour les acides aminés, l'implication des acides gras circulants dans le contrôle de la prise de nourriture a été envisagée dès les années 50 (Kennedy, 1953). Il est maintenant bien établi que l'intégration centrale des variations de la lipidémie plasmatique participe à la régulation du comportement alimentaire, de la production hépatique de glucose et de la sécrétion d'insuline. Ainsi, Obici et collaborateurs ont démontré qu'une injection centrale d'acide oléique diminue la prise de nourriture et la production hépatique de glucose chez le rat (Obici *et al.*, 2002). L'injection centrale d'acide oléique s'accompagne également d'une stimulation des neurones à POMC/CART et d'une inhibition des neurones à NPY/AgRP (Obici *et al.*, 2002), suggérant que cet effet est relayé par les neurones de premier ordre.

Les données de la littérature indiquent qu'un ou plusieurs intermédiaires de la synthèse/dégradation des acides gras à longues chaînes carbonées pourraient participer à l'intégration centrale des variations de la lipidémie. Ainsi, certains travaux réalisés

chez le rat suggèrent que le malonyl-CoA pourrait intervenir directement dans cette signalisation. En effet, l'accumulation centrale de malonyl-CoA induite par l'inhibition de la *fatty acid synthase* (Loftus *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 2006) ou par l'inactivation centrale du gène codant cette protéine (Chakravarthy *et al.*, 2007), diminue la prise de nourriture et le poids chez le rongeur (Loftus *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 2006). A l'inverse, la surexpression de la *malonyl-coa decarboxylase* au niveau du NA induit une diminution des concentrations de malonyl-CoA, qui s'accompagne d'une augmentation de la prise alimentaire et du poids (Hu *et al.*, 2005; He *et al.*, 2006). Par ailleurs, des travaux réalisés chez le rongeur montrent que l'injection icv de malonyl-CoA stimule l'activité des neurones à POMC/CART et inhibe celle des neurones à NPY/AgRP du NA, effet qui s'accompagne d'une diminution de la prise de nourriture (Loftus *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2002; Gao et Lane, 2003; Dowell *et al.*, 2005; Lane *et al.*, 2005; He *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2007).

Certaines expériences suggèrent quant à elles, que ces effets pourraient être indirects. Ainsi, il a été montré que le malonyl-CoA inhibe le transport des acyl-CoA au sein de la mitochondrie (McGarry et Brown, 1997) et augmente, de fait, leurs concentrations dans le cytoplasme. L'accumulation cytoplasmique d'acyl-CoA semble constituer l'élément essentiel à l'intégration centrale des variations de la lipidémie puisque l'inhibition pharmacologique de leurs transports au sein de la mitochondrie s'accompagne également d'une diminution de la prise alimentaire (Obici *et al.*, 2003).

### **4.2.3. Le glucose**

Des travaux réalisés dès les années 1970 ont montré que l'altération de la sensibilité centrale au glucose modifie l'homéostasie énergétique en périphérie et augmente la prise de nourriture (Muller *et al.*, 1973), indiquant qu'une ou plusieurs structures du SNC sont capables d'intégrer les variations de la glycémie et de mettre en œuvre un ensemble de réponses physiologiques adaptées.

#### **a) Réponses physiologiques aux variations de la glycémie cérébrale**

L'infusion centrale de glucose s'accompagne d'une stimulation de l'activité du SNA sympathique (Levin et Sullivan, 1987a, 1987b), notamment celle des fibres efférentes se projetant vers les cellules adipeuses, et d'une augmentation de la thermogénèse en périphérie (Acheson *et al.*, 1984; Mounien *et al.*, 2010). Ces effets

sont également observés chez des animaux dépourvus d'insuline indiquant que l'augmentation de la **dépense énergétique** induite par le SNC s'effectue indépendamment de la libération de cette hormone (Levin et Sullivan, 1987a). Une augmentation de la glycémie centrale s'accompagne également d'une diminution de la néoglucogenèse et de la glycogénolyse, et par voie de conséquence, d'une réduction de la production endogène de glucose par le foie (Lam *et al.*, 2005), indiquant que le SNC participe aussi à la régulation de l'**homéostasie glucidique**.

Une glucopénie centrale, mimée par l'injection d'analogues non métabolisables du glucose comme le 2-désoxyglucose (2-DG) ou le 5-thiogluucose (5-TG), induit quant à elle une libération périphérique de glucagon et de catécholamines (Pénicaud *et al.*, 1990; Marty *et al.*, 2005). L'augmentation des concentrations circulantes de ces deux hormones conduit à une **contre-réponse métabolique** destinée à rétablir une glycémie physiologique, *via* la production de glucose par le foie (Borg *et al.*, 1995). Des expériences réalisées chez les rongeurs montrent que la **prise de nourriture** qui suit une phase d'hypoglycémie (Louis-Sylvestre et Le Magnen, 1980) est bloquée par l'injection périphérique de glucose (Campfield *et al.*, 1985). Inversement, une prise de nourriture peut être induite chez des animaux rassasiés par l'injection centrale de 2-DG (Berthoud et Mogenson, 1977). Les structures contrôlant la prise de nourriture sont donc capables de percevoir les variations de la glycémie et d'ajuster le comportement alimentaire et le métabolisme périphérique en fonction des besoins énergétiques.

#### **b) Les acteurs moléculaires de la détection centrale de glucose**

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse cellulaire à une augmentation de glucose plasmatique ont initialement été caractérisés dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques (Thorens, 2001 pour revue). Ils requièrent *(i)* la présence de GLUT-2, un transporteur de glucose de faible affinité, *(ii)* la phosphorylation du glucose par la glucokinase (GK), l'enzyme limitante de la glycolyse, qui s'accompagne d'une augmentation de la production d'ATP et *(iii)* la fermeture de canaux potassiques ATP-dépendant, ce qui conduit à une dépolarisation membranaire et un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  nécessaire à la libération d'insuline. De nombreuses études montrent que la détection et l'intégration centrale des variations de la glycémie mettent en jeu les mêmes éléments moléculaires que ceux décrits dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques (Leloup *et al.*, 1994, 1998; Schuit *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2004; Marty *et al.*, 2005; Arluison *et*

*al.*, 2004). Certains d'entre eux ont de fait permis d'identifier les structures centrales impliquées dans l'intégration des variations de la glycémie.

### **c) Structures cérébrales gluco-sensibles**

Il est actuellement reconnu que le tronc cérébral et l'hypothalamus, deux structures localisées à proximité d'organes circumventriculaires sont des zones d'échanges privilégiées entre le sang et le SNC et peuvent de fait percevoir les variations de la glycémie périphérique.

#### *i) Le tronc cérébral*

L'obstruction de l'aqueduc de Sylvius, qui empêche la circulation du LCR à travers les ventricules cérébraux, est sans effet sur l'hyperglycémie induite par l'injection de 5-TG dans le 4<sup>ème</sup> ventricule (Ritter *et al.*, 1981; Pénicaud *et al.*, 1990), indiquant que le tronc cérébral participe directement à la contre-réponse métabolique observée suite à une glucopénie centrale. Par ailleurs, Pénicaud et collaborateurs ont mis en évidence la présence de GLUT-2 au niveau de l'area-prostrema, suggérant que cette région, qui est située entre le NTS et le 4<sup>ème</sup> ventricule, est capable de percevoir les variations de la glycémie (Leloup *et al.*, 1994).

#### *ii) L'hypothalamus*

Des travaux réalisés chez le rat ont montré que l'hypothalamus constitue également une structure essentielle à l'intégration centrale des variations de la glycémie. Ainsi, l'effet anorexigène d'une injection icv de glucose (Kurata *et al.*, 1986; Cha *et al.*, 2008) s'accompagne d'une augmentation du taux de transcrits codant la POMC et d'une diminution de ceux codant le NPY (Bady *et al.*, 2006) au niveau du NA. L'élévation centrale de la glycémie, consécutive à l'injection intra-carotidienne de glucose, s'accompagne également d'une augmentation de l'immunoréactivité c-Fos dans les neurones de cette structure (Guillod-Maximin *et al.*, 2004). Ces données suggèrent que l'hypothalamus est capable de percevoir l'augmentation des concentrations de la glycémie. Inversement, l'injection de 2-DG stimule l'expression du proto-oncogène c-Fos notamment au niveau du PVN et du NA (Briski, 1998), suggérant que l'hypothalamus est également capable de percevoir une diminution de la glycémie.

## **d) Acteurs cellulaires impliqués**

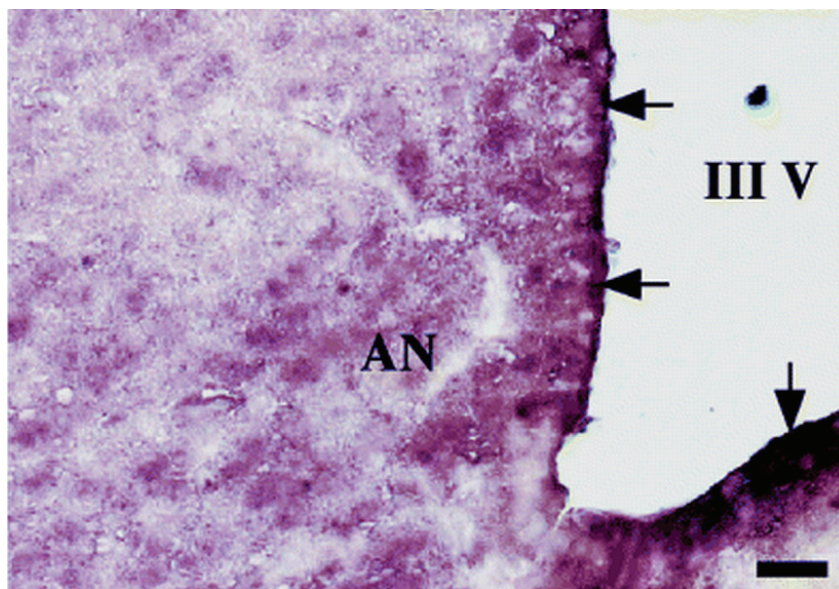
### *i) Rôles des neurones*

Des travaux effectués dès les années 60 ont mis en évidence l'existence de neurones sensibles au glucose au niveau de l'hypothalamus (Anand *et al.*, 1964). Présents à la fois au niveau du NA, du NVM et de l'HL, ces neurones répondent à une augmentation des concentrations extracellulaires de glucose par une dépolarisation ou une hyperpolarisation, et ont de fait été qualifiés respectivement de neurones gluco-excités (GE) ou gluco-inhibés (GI) (Levin, 2002). Le couplage de l'approche électrophysiologique à l'identification par immunohistochimie des populations neuronales sensibles au glucose a par la suite montré que les neurones GE du NA et de l'HL expriment des neuropeptides anorexigènes, tandis que les GI synthétisent des facteurs orexigènes (Moriguchi *et al.*, 1999; Sergeev *et al.*, 2000; Fioramonti *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). Des études d'imagerie calcique réalisées sur des tranches d'hypothalamus montrent que l'injection d'ARN antisens dirigés contre les transcrits codant la GK abolit totalement l'activité des neurones gluco-sensibles au niveau du NVM (Kang *et al.*, 2006), suggérant l'implication directe de cette enzyme dans l'intégration des variations de la glycémie par les populations neuronales. La présence de neurones GI et GE au niveau du NTS (Mizuno et Oomura, 1984; Yettefti *et al.*, 1995; Dallaporta *et al.*, 1999) suggère qu'ils pourraient aussi participer à l'intégration des variations de la glycémie au niveau de cette structure.

### *ii) Rôle des cellules astrogliales.*

L'utilisation de méthionine sulfoximine, un inhibiteur spécifique du métabolisme astrocytaire, abolit l'activation de c-Fos dans le NA, induite par une injection intracarotidienne de glucose (Guillod-Maximin *et al.*, 2004). De même, cette drogue bloque la contre-réponse métabolique à une glucopénie, mimée par l'injection centrale de 2-DG (Young *et al.*, 2000). Ces données suggèrent donc l'implication des cellules astrogliales dans la détection hypothalamique du glucose. A l'appui de cette hypothèse, des études immunocytochimiques révèlent que le transporteur GLUT-2 est préférentiellement exprimé par les cellules astrogliales, et notamment par les tanocytes bordant le 3<sup>ème</sup> ventricule (Leloup *et al.*, 1994; Garcia *et al.*, 2003; Arluison *et al.*, 2004) (Fig. 8). De plus, la présence de GK dans ce type cellulaire a été mise en évidence par immunohistochimie (Millàn *et al.*, 2010). L'implication des tanocytes

dans la perception des concentrations extracellulaires de glucose est confirmée par les travaux de Sanders et collaborateurs montrant que leur destruction sélective abolit l'effet orexigène et hyperglycémiant d'une glucopénie centrale (Sanders *et al.*, 2004). Enfin, une étude réalisée sur un modèle de souris GLUT-2<sup>-/-</sup>, révèle que la réexpression de GLUT-2 spécifiquement dans les astrocytes, permet de rétablir la contre-réponse métabolique induite par une glucopénie centrale (Marty *et al.*, 2005). L'ensemble de ces données confirme l'implication directe de ces cellules dans la détection centrale des variations de la glycémie. Toutefois, la nature du signal astroglial relayant cette information jusqu'aux neurones de premier ordre est actuellement inconnue.



**Figure 8 : Illustration de la distribution des cellules exprimant GLUT-2 au niveau de l'hypothalamus.** Localisation par hybridation *in situ* des ARNm codant le transporteur de glucose GLUT-2. AN, noyau arqué ; III V, 3<sup>ème</sup> ventricule. D'après Garcia *et al.*, 2003.

## 5. Objectifs de la thèse

Il est maintenant bien établi que les astrocytes jouent un rôle majeur dans la communication cellulaire au sein du SNC, *via* la production de gliotransmetteurs (Parpura et Zorec, 2010). Plusieurs études, dont certaines menées au laboratoire, ont montré que les endozépines sont des peptides spécifiquement produits par les cellules gliales (Tonon *et al.*, 1990), dont la libération est régulée *via* l'activation de récepteurs

pour des neurotransmetteurs (GABA) ou des neuropeptides (PACAP, somatostatine) (Tonon *et al.*, 1990; Patte *et al.*, 1999; Masmoudi *et al.*, 2003, 2005, 2006; Tokay *et al.*, 2005, 2008).

Parmi les nombreuses activités biologiques exercées par ces gliopeptides, l'effet anorexigène de l'ODN est l'une des plus remarquables (De Mateos-Verchere *et al.*, 2001; Do Rego *et al.*, 2007). Parallèlement, l'injection icv d'ODN régule positivement ou négativement l'activité des neurones du NA exprimant la POMC ou le NPY, respectivement (Compère *et al.*, 2003), indiquant que son action sur la prise de nourriture pourrait être relayée par les neurones hypothalamiques de premier ordre. Les cellules astrogliales de l'hypothalamus expriment également des récepteurs ou des transporteurs fonctionnels pour certains signaux ou des hormones d'origine périphérique (Zhu *et al.*, 1990; Leloup *et al.*, 1994; Arluison *et al.*, 2004; Cheunsuang et Morris, 2005; Hsuchou *et al.*, 2009a) et sont sensibles aux variations plasmatiques de la leptine, de l'insuline ou encore de la glycémie (Kum *et al.*, 1992; Sanders *et al.*, 2004; Marty *et al.*, 2005; Hsuchou *et al.*, 2009b). Ces données suggèrent donc que les cellules gliales serviraient de relais entre certains facteurs périphériques et les neurones du NA impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique.

L'objectif de ce travail est donc (i) de rechercher l'effet d'une variation du statut énergétique, consécutive à un jeûne, sur l'expression hypothalamique du DBI et son éventuel réversion par deux hormones anorexigènes, la leptine et l'insuline, (ii) d'étudier les liens existant entre les variations de la glycémie, la production hypothalamique d'endozépines et la prise alimentaire, et (iii) de caractériser l'effet du glucose sur l'activité transcriptionnelle du gène codant le DBI et les éventuelles voies métaboliques relayant cet effet.







# **Matériel et méthodes**



## 1. Analyse promoteur/rapporteur

Afin de tester l'implication de la région promotrice proximale du gène DBI dans les effets du glucose, nous avons entrepris des expériences de type promoteur/rapporteur. Une région de 851 paires de bases précédant le site d'initiation de la traduction a été amplifiée par PCR à partir d'ADN génomique de cerveau de rat, à l'aide de l'ADN polymérase « haute fidélité » *Platinum Pfx* (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Le produit de PCR a ensuite été cloné dans le vecteur pGLuc-Basic (New England Biolabs, Saint-Quentin en Yvelines, France), en amont d'un gène rapporteur codant la Gaussia luciférase, libérée de manière constitutive par les cellules de mammifères. Après transfection et traitement des cellules, la quantité de luciférase sécrétée dans le milieu de culture a été mesurée à l'aide du kit commercial Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega, Charbonnières, France), en suivant les recommandations du fournisseur.

## 2. Culture cellulaire et transfection

Une partie des expériences *in vitro* a été réalisée sur des cultures d'astrocytes obtenues à partir de cortex de rats âgés de 24 h, en adaptant les méthodes décrites par Booher et Brown pour les cultures primaire et secondaire d'astrocytes, respectivement (Booher et Sensenbrenner, 1972; Brown et Mohn, 1999). Après décapitation des animaux, les cortex sont prélevés et placés dans un milieu de culture DMEM/Ham's 12 (2/1, v/v) contenant de l'insuline (1%), de la glutamine (2mM), du D(+)-glucose (0.4%), de l'acide N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N'-2-éthanesulfonique (HEPES, 5 mM) et une solution d'antibiotiques-antimycotique (1%). Après élimination des méninges, les cellules sont dissociées mécaniquement par passages lents et successifs au travers d'une aiguille (1,2 mm de diamètre intérieur). La suspension cellulaire est filtrée sur un tamis de nylon (mailles de 100 µm), puis diluée dans du milieu de culture additionné de sérum de bovin fœtal (SBF; 10%). Les cellules sont mises en culture dans des flasques (150 cm<sup>2</sup>) à raison de 20 x 10<sup>6</sup> cellules /flasque. Les cultures sont placées dans un incubateur en atmosphère humide et maintenues à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture est renouvelé tous les 3 jours.

A 80% de confluence, les flasques sont soumises à une agitation orbitale (175 rpm, 2 h) puis un changement de milieu est effectué avant une nouvelle agitation d'une durée plus longue (175 rpm, 16 h). Les cellules adhérentes sont détachées par une

solution de trypsine (0,05%), puis centrifugées (100g, 7 min). La suspension cellulaire est alors incubée durant environ 2 min dans une flasque de 150 cm<sup>2</sup> afin d'éliminer la microglie restante par adhésion. Les cellules flottantes sont alors récupérées et la suspension est diluée à raison de  $4.10^5$  cellules/mL avec du milieu de culture supplémenté en SBF (10%) et ensemencées dans des boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre. Après 4 à 5 jours de mise en culture, les cellules présentent les caractéristiques morphologiques des astrocytes de type I et plus de 98% des cellules sont marquées par des anticorps dirigés contre la GFAP. Les expériences ont été réalisées sur des cultures d'astrocytes à environ 90% de confluence.

La lignée cellulaire C6 a été cultivée en monocouche dans un incubateur en atmosphère humide et maintenue à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont maintenues dans un milieu DMEM contenant du D-glucose (5mM), de la L-glutamine (2mM), de l'HEPES (5 mM), du SBF (10%) et une solution d'antibiotiques-antimycotique (1%). Les cellules ont été transfectées par la technique de nucleofection (Amaxa, Lonza), en suivant les recommandations du fournisseur.

### **3. Reverse transcription et PCR-Quantitative**

Afin d'étudier l'effet du glucose sur l'expression du gène codant les endozépinines, la quantité des ARNm codant le DBI a été mesurée par la technique de RT-PCR-quantitative.

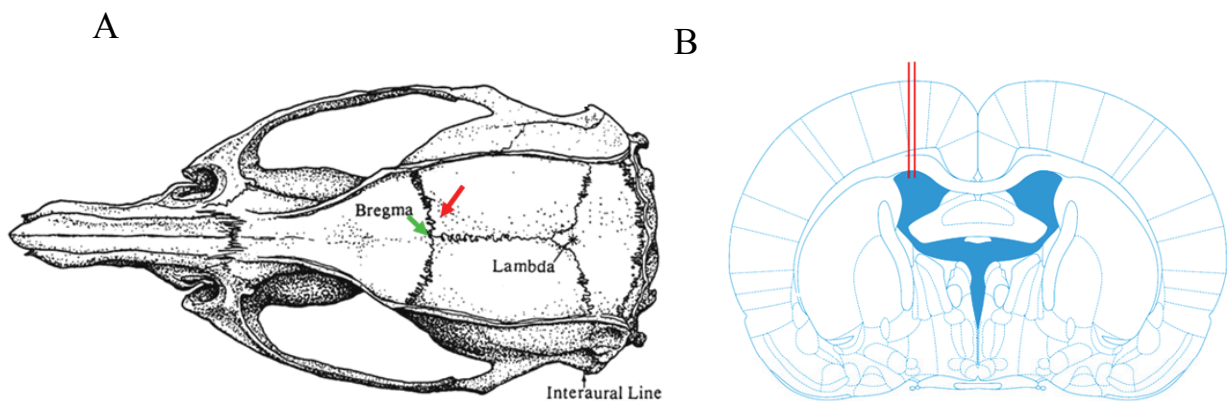
Les ARN totaux ont été extraits selon la technique décrite par Chomczynski et Sacchi (1987) à l'aide d'une solution de Trizol<sup>®</sup>. Les ARN totaux (1µg), préalablement traités à la DNase afin d'éliminer l'ADN génomique, sont transcrits en ADNc par la Superscript II (50U/µL) en utilisant des hexamères de séquences aléatoires (50 µM) comme amorces.

La PCR-quantitative, réalisée avec un appareil ABI prism 7500 Sequence Detection, est effectuée sur l'ADNc en présence d'une solution commerciale contenant du SYBR Green, de la Taq polymérase et des nucléotides, à laquelle sont ajoutées les amorces sens et antisens spécifiques du DBI de rat (5'-TGCTCCCGCGCTTTCA-3' et 5'-CTGAGTCTTGAGGCGCTTCAC-3'; 300 nM). La β-actine (primer sens 5'-CGTGAAAAGATGACCCAGATCA-3', primer antisens 5'-GCCTGGATGGCTACGTACATG-3') a été utilisée comme gène de référence. Le programme de la PCR comprend 40 cycles de dénaturation (95°C; 15 s)

hybridation/élongation (60°C; 1 min). La quantité d'amplicons formés dans chaque échantillon est déterminée en utilisant la formule  $2^{\text{exp}(-\Delta\Delta\text{Ct})}$ , dans laquelle le cycle seuil ou cycle threshold (Ct) du DBI et celui de la  $\beta$ -actine désigne le cycle à partir duquel la fluorescence atteint la valeur seuil, le  $\Delta\text{Ct}$  correspond à  $\text{Ct}_{\text{DBI}} - \text{Ct}_{\beta\text{-actine}}$  pour chaque échantillon et le  $\Delta\Delta\text{Ct}$  représente la différence entre le  $\Delta\text{Ct}$  d'un échantillon et la moyenne des  $\Delta\text{Ct}$  des échantillons utilisés comme contrôle.

#### 4. Canulation intraventriculaire

Les rats mâles sont anesthésiés par une injection intramusculaire d'un mélange hydrochloride de kétamine/xylazine (80/10 mg/kg, respectivement) et la canule (longueur 1cm, diamètre interne 0,35 mm) est introduite (3 mm en profondeur) dans le ventricule cérébral gauche (coordonnées : 1 mm en arrière et 2 mm en latéral par rapport au bregma) à l'aide d'un cadre stéréotaxique (Fig. 9). Les différentes substances testées sont injectées dans un volume final de 7 $\mu\text{L}$ .



**Figure 9 :** (A) Représentation schématique d'un crâne de rat sur lequel sont indiqués le Bregma (flèche verte) et le point de canulation (flèche rouge). (B) Représentation schématique d'une coupe transversale de cerveau de rat sur laquelle est indiquée la position de la canule dans le ventricule latéral cérébral.

## 5. Incubations statiques d'explants hypothalamiques

L'effet du glucose sur la libération hypothalamique d'endozépines a été évalué grâce à des incubations statiques d'explants d'hypothalamus ventraux.

Après décapitation des animaux, les hypothalamii ventraux sont rapidement prélevés puis coupés en deux. Les héli-hypothalamii sont maintenus dans du LCR artificiel (LCRa) (NaCl, 125 mM ; KCl ,3 mM ; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM ; MgSO<sub>4</sub>, 1,2 mM ; CaCl<sub>2</sub>, 2 mM ; NaHCO<sub>3</sub>, 26 mM ; glucose, 0,2 g/L ; acide ascorbique, 1,8 g/l ; aprotinine, 100 µg/ml) à 4°C, le temps nécessaire à la dissection. Les explants sont ensuite transférés dans du LCRa à 37°C (0,2 g/L de glucose) et soumis à une phase d'équilibration (45 min). Le milieu est alors remplacé par du LCRa frais contenant 0,2 ou 1 g/L de glucose. Après 45 min d'incubation, le milieu est prélevé puis conservé à -20°C avant dosage radioimmunologique des endozépines (RIA).

## 6. Dosage radioimmunologique des endozépines

Les LCRa sont préalablement concentrés par déshydratation au Speed Vac (Savant AES 2000). Le RIA est réalisé dans du tampon phosphate/Triton X-100 (0.1M/0.1%; pH 8) à l'aide d'anticorps dirigés contre l'ODN de rat (dilution finale 1/20000<sup>ème</sup>) développés au laboratoire (Tonon *et al.*, 1990) en utilisant comme traceur un analogue de l'ODN, le [Tyr<sup>0</sup>]-ODN, marqué à l'iode 125 (6500 cpm/tube) selon la méthode décrite par Vaudry et collaborateurs (1978). Les anticorps reconnaissent avec la même affinité l'ODN et le TTN de rat, et le seuil de sensibilité du dosage est de 5 pg/tube.

La quantité de peptide de chaque échantillon est évaluée au moyen d'une gamme standard linéarisée selon la méthode Logit-log :

$$\text{Logit} [(B-C)/(B_0-C)] = f(\log \text{ODN})$$

dans laquelle B<sub>0</sub> correspond à la radioactivité liée au complexe antigène-anticorps en l'absence d'ODN « froid », et C à la radioactivité non spécifique.

## 7. Hybridation *in situ* semi quantitative

L'effet du jeûne et d'une injection centrale de glucose sur l'expression hypothalamique du DBI et de la POMC a été évalué en mesurant la quantité d'ARNm par hybridation *in situ* semi-quantitative.

Après fixation des animaux par perfusion intracardiaque d'une solution de PFA/PBS (4/100), les cerveaux sont rapidement prélevés, post fixés durant 24 h dans la même solution puis stockés dans du PBS contenant de l'azide de sodium. Après déshydratation par bains successifs dans des solutions aux concentrations croissantes d'éthanol, les cerveaux sont incubés dans une solution de xylène puis inclus dans de la paraffine (Thermo Fisher Scientific, Shandon Citadel 2000). Les coupes frontales (5  $\mu$ M d'épaisseur) sont montées sur des lames de verre puis conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Les coupes sont hybridées (30 min; 37°C) en présence de protéine kinase K (0,5 g/mL) dans un tampon Tris/EDTA (TE; 1M/0,5 M; pH 8). Après rinçage (3 min) dans du tampon TE, les coupes sont incubées en présence de triéthanolamine (TEA; 0,1M) puis dans une solution à 0,25% d'anhydride acétique diluée dans une solution de citrate de sodium 2X (SCS 1X : NaCl/citrate de sodium, 0,15 M/0,015M; pH 7). Les coupes sont ensuite incubées pendant 2 h à température ambiante en chambre humide dans le tampon de préhybridation correspondant à un mélange (v/v) de tampon phosphate EDTA 5X (SSPE 1X : NaCl/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/EDTA, 0,1 M/10 mM/1 mM; pH 7,4) et de tampon Denhardt 5X contenant 50% de formamide, 200 mg/mL d'ADN de sperme de saumon dénaturé (ssADN), 200 mg/mL d'ARNt de levure, 2 mg/mL de Poly A et 4% de sulfate de Dextran.

L'étape d'hybridation proprement dite consiste à incuber les coupes avec du tampon de préhybridation contenant du dithiothreitol (1 M) et la sonde radioactive (20.10<sup>6</sup> cpm/mL) durant 18 h à 60°C. Les lames sont ensuite incubées dans du SCS 2X (30 min, température ambiante) puis dans du SCS 2X contenant 20  $\mu$ g/mL de RNase. Quel que soit le type de sonde utilisée, les lames sont lavées dans des bains successifs de SCS de concentrations décroissantes (2X, 1X et 0,5X) et déshydratées dans une solution d'éthanol à 70%.

Après l'étape d'hybridation, les lames sont plongées dans l'émulsion NTB2 (42°C, 60 min) diluée au demi avec de l'eau, puis stockées en atmosphère déshydratée,



à l'abri de la lumière, à 4°C. Après une exposition de 12 jours, les lames sont révélées dans du Dektol (2 min) et fixées dans une solution d'AL4 (4 min). Les coupes sont ensuite rincées à l'eau et contre colorées à l'hématoxyline de Harris et déshydratées par des concentrations croissantes d'éthanol.

La quantification du marquage est réalisée à l'aide d'un microscope à fond noir couplé à un logiciel d'analyse d'image (version 1.60 non-FPU, W. Rasband, NIH, USA), par la mesure de la densité optique au grossissement x10. La valeur moyenne de la densité optique (+/- SEM) est calculée à partir de mesures effectuées sur 8 coupes de cerveaux de rat dans chacune des zones d'intérêt.

## **8. Immunohistochimie**

Les expériences d'immunohistochimie ont été réalisées sur des coupes frontales de cerveaux de rat. Après avoir été déparaffinées dans un bain de cyclohexane, les coupes sont réhydratées, puis pré-incubées (20 min, température ambiante) dans du PBS contenant du sérum normal de chèvre (1/100), de l'albumine de sérum bovin (1/100) et du Triton X100 (0,3%). Les coupes sont ensuite incubées (18 h, 4°C) en présence de l'antisérum adéquat dilué dans du PBS/Triton X-100/BSA. Après 3 rinçages successifs dans du PBS, les coupes sont incubées 90 min en présence des seconds anticorps (Alexa Fluor 488-GAM et/ou Alexa Fluor 594-GAR, 1:100) dilués dans du PBS/Triton X-100/BSA. Après 3 rinçages successifs dans du PBS, les coupes sont montées avec du PBS-glycerol (1:1) puis observées à l'aide d'un microscope confocal (Leica TCS SP2 AOBS).

Description des antisérums utilisés au cours de notre étude :

- Antisérum de lapin dirigé contre l'ODN de rat (1/100)
- Antisérum de lapin dirigé contre la sous-unité  $\beta$  du récepteur INS-R (1/500)
- Antisérum purifié de souris dirigé contre la protéine *Dopamine and cAMP regulated phosphoprotein of 32KDa* (DARPP-32; 1/250)
- Antisérum purifié de souris dirigé contre les résidus O-glycosylés (RL-2; 1/250)
- Antisérum purifié de souris dirigé contre le récepteur Ob-Rb (1/500)

## **9. Mesure de la prise alimentaire**

Afin de minimiser le stress des animaux, les différentes injections icv ou ip ont été réalisées sur des rats préalablement sédatés à l'isoflurane (5%). La nourriture (20g) a été présentée 45 minutes après les injections, et la quantité ingérée a été mesurée aux temps indiqués après présentation de la nourriture.

## **10. Test de tolérance au glucose**

Les animaux sédatés à l'isoflurane ont reçu une injection centrale d'ODN (2 $\mu$ g dans 7 $\mu$ L ; NaCl 0,9%) ou d'une solution saline (NaCl 0,9%), 30 min avant l'injection ip de D-glucose (1 g/kg de poids corporel). La glycémie a été mesurée sur des prélèvements effectués au niveau de la queue juste avant, puis 20, 40, 60, 90, 120 et 180 min après l'injection ip de glucose, à l'aide d'un glucomètre (ACCU CHEK, Roche, France).



# Résultats



**Le jeûne réduit l'expression hypothalamique du *diazepam-binding inhibitor*, le précurseur du peptide ODN, un gliopeptide anorexigène, chez la souris**

Journal of Molecular Endocrinology 44:295-299 (2010)

Les endozépinines forment une famille de peptides endogènes qui inclut le diazepam-binding inhibitor (DBI) et ses fragments biologiquement actifs dont l'octadécaneuropeptide (ODN). Au niveau du système nerveux central, les endozépinines sont exclusivement produites par les cellules gliales et notamment par les cellules bordant le 3<sup>ème</sup> ventricule. Injecté par voie intracérébroventriculaire, l'ODN exerce un puissant effet anorexigène chez les rongeurs. Néanmoins, l'influence du jeûne sur l'expression hypothalamique de DBI n'avait jamais été étudiée.

Suite à un jeûne, les concentrations circulantes d'insuline et de leptine sont réduites. La réalimentation, ainsi que l'administration d'insuline ou de leptine entraînent une activation des neurones à POMC et une inhibition des neurones à NPY du noyau arqué. Quelques études indiquent que leurs récepteurs sont présents sur certaines populations de cellules gliales hypothalamiques, suggérant qu'elles peuvent être sensibles à ces deux hormones périphériques qui renseignent l'hypothalamus sur le statut énergétique de l'organisme.

L'ensemble de ces données nous a conduits à nous poser les questions suivantes :

- 1) Un jeûne aigu peut-il modifier l'expression du DBI au niveau de l'hypothalamus ?
- 2) Les cellules exprimant le DBI, présentent-elles des récepteurs pour l'insuline et la leptine ?
- 3) L'insuline et la leptine sont-elles impliquées dans la régulation centrale de l'expression du DBI ?

















## **Gliotransmission et sensibilité cérébrale au glucose: rôle des endozépinines**

soumis pour publication

Nous avons précédemment montré que le jeûne réduit l'expression hypothalamique du DBI, précurseur du l'ODN, suggérant qu'un ou plusieurs facteurs métaboliques reflétant le statut énergétique de l'organisme, modulent la production des endozépinines hypothalamiques.

La perception centrale des taux circulants de glucose joue un rôle essentiel dans le contrôle de la prise de nourriture et la régulation périphérique de la glycémie. Un dysfonctionnement de ce processus est associé à des troubles métaboliques tels que l'obésité ou le diabète. Plusieurs études réalisées chez les rongeurs suggèrent que les cellules astrogliales hypothalamiques, et plus particulièrement les tanocytes, informent les neurones hypothalamiques impliqués dans l'homéostasie énergétique, des variations de la glycémie périphérique. Toutefois, les signaux permettant le couplage entre les cellules gliales et les neurones n'étaient pas identifiés.

L'ensemble de ces données nous a conduits à nous poser les questions suivantes :

- 1) Le glucose peut-il stimuler l'expression du DBI et la libération des endozépinines par les cellules astrogliales hypothalamiques ?
- 2) Les endozépinines constituent-elles un relais entre les variations du taux circulant de glucose et les neurones à POMC du noyau arqué ?
- 3) Les endozépinines d'origine centrale participent-elles à la régulation de l'homéostasie glucidique ?



## **Gliotransmission and brain glucose sensing: critical role of endozepines**

**Abbreviated title:** Endozepines and brain glucose sensing

Damien Lanfray<sup>a,b,c</sup>, Sébastien Arthaud<sup>b,c</sup>, Johanne Ouellet<sup>d</sup>, Vincent Compère<sup>a,b,c,e</sup>, Jean-Luc Do Rego<sup>a,b,c</sup>, Jérôme Leprince<sup>a,b,c</sup>, Benjamin Lefranc<sup>b</sup>, Hélène Castel<sup>a,b,c</sup>, Georges Pelletier<sup>d</sup>, Hubert Vaudry<sup>a,b,c</sup>, Marie-Christine Tonon<sup>a,b,c,1</sup> and Fabrice Morin<sup>a,b,c,1</sup>

<sup>a</sup>Inserm U982, DC2N Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Cell Differentiation and Communication, Astrocyte and Vascular Niche, 76821 Mont-Saint-Aignan, France;

<sup>b</sup>European Institute for Peptide Research (IFRMP 23), Regional Platform for Cell Imaging (PRIMACEN), Rouen, France; <sup>c</sup>University of Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France;

<sup>d</sup>Research Center in Molecular Endocrinology, Oncology and Genetics, Laval University Hospital, Quebec, Canada; <sup>e</sup>Department of Anaesthesiology and Critical Care, Rouen University Hospital, France

<sup>1</sup>**Corresponding authors:** Drs Marie-Christine Tonon and Fabrice Morin, Inserm U982, University of Rouen, Place Emile Blondel, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France, Email: [marie-christine.tonon@univ-rouen.fr](mailto:marie-christine.tonon@univ-rouen.fr) or [fabrice.morin@univ-rouen.fr](mailto:fabrice.morin@univ-rouen.fr) Tel: (33)235-146-630; Fax: (33)235-146-946

Number of figures: 4; Number of pages: 17

Number of words: Abstract, 250; Introduction, 493; Discussion, 731

Total number of words: 4500

**Keywords:** Glial Cells - Hypothalamus - Glucose Sensing - Endozepines - Feeding Behavior

**Acknowledgments:** The authors wish to thank the technical assistance of Julie Catteau for histological procedures and Dr Marcello Solinas for critical review of the manuscript. D. L. is funded by a grant of Inserm-Conseil Régional de Haute-Normandie, France. This work was partly supported by an Inserm-FRSQ exchange program (to H.V. and G.P.).



## **Abstract**

Hypothalamic glucose sensing is involved in the control of feeding behavior and peripheral glucose homeostasis, and its dysfunction is believed to be an important component in the development of obesity and diabetes. Glial cells have been shown to be part of a “glucose sensing unit”, but their mode of communication with neurons remains elusive. Diazepam-binding inhibitor (DBI) and its processing products, notably the octadecaneuropeptide (ODN), collectively named endozepines, are secreted by astroglia, and ODN has been shown to be a potent anorexigenic factor. In this study, we investigated the involvement of endozepines in brain glucose sensing. First, we showed that intracerebroventricular administration of glucose in rats increases DBI expression in hypothalamic glial-like tanycytes. Then, we demonstrated that glucose stimulates endozepine secretion from hypothalamic explants. Next, feeding behavior experiments were conducted to test the involvement of endozepines in brain glucose sensing. We found that the feeding-suppressing effect of central administration of glucose was blunted by co-injection of an ODN antagonist. Conversely, the hyperphagic response elicited by central glucoprivation was suppressed by an ODN agonist. The anorexigenic effects of centrally-injected glucose or ODN agonist were suppressed by blockade of the melanocortin-3/4 receptors, suggesting that glucose sensing involves endozepinergic control on POMC neurons. Finally, we found that brain endozepines modulate blood glucose levels, suggesting their involvement in a feedback loop controlling whole-body glucose homeostasis. Collectively, these data indicate that endozepines, through activation of POMC neurons, are a critical relay in brain glucose sensing and potentially new targets in the treatment of metabolic disorders.

## **Introduction**

To regulate energy homeostasis, the brain integrates peripheral signals delivered by the blood, including metabolites and hormones, and generates appropriate responses by modulating food intake and peripheral organ activity (Blouet and Schwartz, 2010). The arcuate nucleus of the hypothalamus is a major site for integration of energy status. It possesses two interconnected populations of neurons, one producing the orexigenic neuropeptide Y (NPY), and the other one producing the anorexigenic

peptide  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH), a processing product of proopiomelanocortin (POMC) (Blouet and Schwartz, 2010).

Direct glucose sensing by the CNS has been extensively demonstrated (Schuit *et al.*, 2001). Notably, central administration of glucose reduces NPY expression, increases POMC expression and markedly reduces feeding (Bady *et al.*, 2006). Conversely, central glucoprivation using 2-deoxyglucose (2-DG) elicits food intake and activates neurohumoral counterregulatory responses similar to those observed during systemic hypoglycemia (Marty *et al.*, 2005; Bady *et al.*, 2006). Importantly, alteration in brain glucose sensing is associated with both obesity and diabetes (Parton *et al.*, 2007; Vidarsdottir *et al.*, 2007; Colombani *et al.*, 2009). The cellular mechanisms underlying central glucose sensing are far from being understood. By analogy to pancreatic  $\beta$ -cells, it may involve type 2 glucose transporter (GLUT2) and glucokinase (Schuit *et al.*, 2001).

Several studies suggest that astroglial cells play an important role in glucose sensing. *First*, GLUT2 and glucokinase are expressed in hypothalamic tanycytes (Garcia *et al.*, 2003; Millàn *et al.*, 2010). *Second*, selective destruction of tanycytes impairs feeding and hyperglycemia responses induced by 2-DG (Sanders *et al.*, 2004). *Third*, genetic inactivation of GLUT2 impairs glucagon secretion induced by hypoglycemia, and re-expression of GLUT2 in glia restores this response (Marty *et al.*, 2005). These studies strengthen the emerging concept that glial cells can detect changes in nutrient availability and interact with hypothalamic neurons to regulate energy homeostasis.

Diazepam-binding inhibitor (DBI) and its peptide fragments, including the octadecaneuropeptide ODN, that are known to bind benzodiazepine receptors are collectively termed endozepines (Tonon *et al.*, 2006). Hypothalamic astrocytes and tanycytes express high levels of endozepines (Tonon *et al.*, 1990; Compère *et al.*, 2010). Endozepines are secreted from astroglial cells and, in line with well characterized gliotransmitters, this process is regulated by physiological stimuli (Patte *et al.*, 1999; Masmoudi *et al.*, 2003; Loomis *et al.*, 2010). A role of endozepines in the control of energy homeostasis has been demonstrated by central administration of ODN, or its C-terminal octapeptide (OP) fragment, which markedly inhibits food intake in rodents (De Mateos-Verchere *et al.*, 2001; Do Rego *et al.*, 2007), and exerts opposite actions on POMC and NPY neurons (Compère *et al.*, 2003).

Pharmacological experiments revealed that the anorexigenic effects of ODN and OP are mediated through activation of a metabotropic receptor distinct from benzodiazepine receptors (Gandolfo *et al.*, 1997; Do Rego *et al.*, 2007). Finally, acute food deprivation markedly reduces hypothalamic DBI mRNA levels, indicating that endozepine expression correlates with energy status (Compère *et al.*, 2010). Altogether, these data led us to hypothesize that endozepines may participate in brain glucose sensing.

## **Materials and Methods**

**Animals, Surgical Procedures.** Adult male Wistar rats weighing 250-300 g were housed under constant temperature (22°C) in a 12:12-h light/dark cycle (lights on at 08h00 am), with free access to standard rat chow and drinking tap water. Rats were stereotaxically implanted with a permanent stainless steel cannula into the left lateral ventricle of the brain, as described (Lectez *et al.*, 2009). Experiments were conducted according to the French and European guidelines for the care and use of laboratory animals (Council Directive 86/609/EEC; licence no. 21CAE035).

**Materials.** D-glucose and 2-DG were purchased from Sigma. The metabotropic endozepine receptor agonists ODN (H-Gln-Ala-Thr-Val-Gly-Asp-Val-Asn-Thr-Asp-Arg-Pro-Gly-Leu-Leu-Asp-Leu-Lys-OH) and OP (H-Arg-Pro-Gly-Leu-Leu-Asp-Leu-Lys-OH), and the metabotropic endozepine receptor antagonist cyclo<sub>1-8</sub>[DLeu<sup>5</sup>]OP were synthesized as described (Leprince *et al.*, 2001). The melanocortin-3/4 receptor antagonist SHU-9119 was obtained from Polypeptide Laboratories.

**Effects of i.c.v. Glucose Injection on Hypothalamic DBI and POMC mRNA Levels.** Animals were divided into three groups. In the first and second groups, animals were food-deprived for 13 h, from 07h00 pm to 08h00 am, and received an i.c.v. injection of D-glucose (3.5 mg in 7 µL of 0.9% NaCl) or vehicle (7 µL of 0.9% NaCl). A third group of rats was allowed free access to food throughout the experiment and vehicle was administrated i.c.v. at 08h00 am. Three hours after injection, rats were anesthetized and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde. Brains were removed and processed for *in situ* hybridization with rat DBI (GenBank NM\_031853, nucleotides 1 to 526) and mouse POMC (GenBank

NM\_008895, nucleotides 98 to 384) probes, as previously described (Compère *et al.*, 2010).

**Immunohistochemistry.** Rat brain frontal sections (5 µm) mounted on coated glass slides (Menzel-Gläser) were incubated (room temperature, 20 min) in PBS containing 1% normal goat serum, 1% BSA and 0.3% Triton X-100, and then incubated (4°C, 18 h) with rabbit ODN antiserum (1:100 dilution; Malagon *et al.*, 1993) and mouse monoclonal antibody directed against DARPP-32 (1:250 dilution; BD Biosciences) in PBS/Triton X-100/BSA. Sections were rinsed three times in PBS and incubated (room temperature, 90 min) with the secondary antibodies (Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse and Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit, 1:100 each; Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific) in PBS/Triton X-100/BSA. After three washes in PBS, tissue slices were finally mounted in PBS-glycerol (1:1) and examined using a confocal laser scanning microscope (Leica TCS SP2 AOBS; Leica Microsystems).

**Culture of Hypothalamic Explants.** Half rat hypothalami were equilibrated in artificial cerebrospinal fluid medium (26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 125 mM NaCl, 1.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.2 g/L glucose, 1.8 mg/mL ascorbic acid, and 100 µg/L aprotinin) at 37°C for 1 h under constant bubbling of 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>. The explants were then preincubated with fresh medium containing 0.2 g/L glucose (45 min), and incubated in medium containing 0.2 or 1 g/L glucose (45 min). Measurement of ODN-like immunoreactivity released in media was performed using a radioimmunoassay for ODN (Tonon *et al.*, 1990).

**Food Intake Experiments.** Tested substances were i.c.v. injected in a volume of 7 µL 0.9% NaCl. Intraperitoneal (i.p.) injection of glucose (1 g/kg body weight) was performed using a 40% D-glucose solution prepared in 0.9% NaCl. Forty five min after injections, rats had access to a weighed food pellet (20 g). Cumulative food intake was measured by briefly (< 20 sec) removing and weighting the pellet at the indicated time points.

**Measurement of Glycemia.** Glucose concentration was measured from blood samples obtained from the tail of the animals, using ACCU-CHEK Performa glucose meter (Roche).

**Glucose Tolerance Test.** Rats were food-deprived for 19 h (from 06h00 pm to 01h00 pm) and i.c.v. injected with either saline (7  $\mu$ L of 0.9% NaCl) or ODN (2  $\mu$ g in 7  $\mu$ L of 0.9% NaCl). Thirty min later, glucose (1 g/kg body weight) was i.p. administered. Glycemia was measured immediately before and 20, 40, 60, 90, 120 and 180 min after the i.p. glucose load.

**Statistical Analysis.** Statistical analysis was performed using Prism 4 (Graphpad). All data are expressed as mean  $\pm$  SEM. For each test, a *P* value of 0.05 or less was considered as statistically significant.

## Results

**Glucose Increases the Expression of Endozepines in Rat Hypothalamus.** In order to examine whether glucose regulates the expression of DBI in the rat hypothalamus, glucose or vehicle were injected i.c.v. in fasted animals, and DBI mRNA levels were measured by *in situ* hybridization. The control group consisted in rats with free access to food throughout the experiment. In fed rats, brain sections hybridized with the DBI probe exhibited strong labeling in the periventricular region (Fig. 1A). A 16-h fasting markedly reduced periventricular labeling (Fig. 1A). Central administration of glucose at the end of the fasting period partially restored DBI mRNA levels in cells lining the floor and infralateral walls of the third ventricle (Fig. 1A). The identity of the endozepine-expressing cells was assessed by immunohistochemistry. ODN immunoreactivity was detected in the periventricular area and in thin cytoplasmic processes extending into the parenchyma, a labeling pattern characteristic of hypothalamic tanycytes as revealed by co-localization of ODN with DARPP-32 (Fig. 1B). In agreement with previous results obtained in mice (Bady *et al.*, 2006), fasting reduced POMC mRNA levels in the arcuate nucleus and i.c.v. injection of glucose partially restored POMC mRNA levels (Fig. 1C). We next tested the effect of glucose on endozepine release from rat hypothalamic explants. An increase of glucose

concentration in the culture medium stimulated endozepine release from the explants (Fig. 1D).

**Central Administration of an ODN Antagonist Suppresses the Anorexigenic Effect of Glucose.** We have previously shown that the potent anorexigenic effect of ODN in rodents is abolished by the analogue cyclo<sub>1-8</sub>[DLeu<sup>5</sup>]OP (Do Rego *et al.*, 2007), a selective antagonist of the metabotropic receptor (Leprince *et al.*, 2001). To evaluate the role of endozepines in central glucose sensing, we tested whether the anorexigenic effect of central administration of glucose could be affected by this antagonist. Food intake was markedly reduced in fasted rats receiving i.c.v. injection of glucose compared with rats receiving saline solution (Fig. 2A). By contrast, glucose failed to reduce feeding when co-administered with the ODN antagonist (Fig. 2A). Parallel experiments were performed with i.p. injection of glucose. Reduction of food intake induced by i.p. administration of glucose was totally blunted by i.c.v. injection of cyclo<sub>1-8</sub>[DLeu<sup>5</sup>]OP (Fig. 2B).

**Central Administration of an ODN Agonist Suppresses the Hyperphagic Response Induced by Glucoprivation.** Central injection of the glucose analogue 2-DG, an inhibitor of glycolysis, mimics hypoglycemia and acutely stimulates feeding (Bady *et al.*, 2006). As expected, i.c.v. injection of 2-DG stimulated feeding 30 min and 1 h after food presentation in normally fed rats (Fig. 2C). The stimulation of food intake by 2-DG was totally suppressed by co-injection of the ODN agonist OP (Fig. 2C).

**The Anorexigenic Effects of OP and Glucose are Mediated Through the Central Melanocortin System.** POMC neurons are major regulators of feeding behavior and their involvement in brain glucose sensing has already been suggested (Parton *et al.*, 2007). To test the hypothesis that the anorexigenic effect of endozepines is relayed by activation of POMC neurons, we used SHU-9119, a selective antagonist of the melanocortin-3/4 receptors. I.c.v. administration of the ODN agonist OP significantly reduced food intake (Fig. 3A). Injection of SHU-9119, which did not alter food intake by itself, totally blocked the anorexigenic effect of OP (Fig. 3A).

Although central injection of glucose has been shown to increase hypothalamic POMC mRNA levels (Bady *et al.*, 2006), functional evidence for a role of POMC neurons in the anorexigenic effect of glucose was still missing. We showed that reduction of food intake induced by i.c.v. injection of glucose was blunted by co-injection of SHU-9119 (Fig. 3B). Together, these data suggest that brain glucose sensing involves endozepinergic control of POMC neurons.

**Central Endozepinergic Signaling Regulates Blood Glucose Levels.** Nutrient sensing by the hypothalamus plays a key role in the regulation of blood glucose levels (Blouet and Schwartz, 2010). We therefore tested the possible involvement of central endozepinergic signalling in this process. We first assessed the effects of ODN agonist and antagonist on basal glycemia in normally fed rats. Central injection of the agonist did not have any significant effect (Fig. 4A). However, the antagonist cyclo<sub>1</sub>-<sub>8</sub>[DLeu<sup>5</sup>]OP increased blood glucose levels, with a maximal effect observed 20 min post-injection (Fig. 4A), suggesting the existence of an endozepinergic tone reducing glycemia.

Since the endogenous level of endozepines is expected to be already high in normally fed rats, the effect of the agonist was studied during a glucose tolerance test, after an overnight fast. Rats received acute i.c.v. injection of ODN or vehicle, and were challenged 30 min later with an i.p. glucose load. Elevation of glycemia induced by i.p. glucose injection was markedly reduced in ODN-treated animals (Fig. 4B).

## Discussion

In this report, we demonstrated that endozepines are key gliotransmitters that allow the hypothalamus to detect changes in extracellular glucose concentrations and to drive adapted behavioral response. Notably, acute pharmacological modulation of the endozepinergic tone totally disrupted feeding responses to glucose status. The present study also identified endozepines as new players in brain regulation of whole body glucose homeostasis.

*Endozepines and Brain Glucose Sensing.* Several studies support the hypothesis that hypothalamic glial cells are key elements in glucose sensing, but their exact role in this process remained elusive. Here, we demonstrate that glucose stimulates endozepine expression in hypothalamic tanycytes, as well as endozepine release from

hypothalamic explants. Moreover, we show that the feeding responses elicited by either glucose or 2-DG were suppressed by i.c.v. injection of ODN antagonist or agonist, respectively. Together, these data support the view that regulation of feeding by glucose involves endozepine production by glia.

*In situ* hybridization experiments indicated that central injection of glucose in fasted rats significantly increases DBI mRNA levels in the periventricular zone of the hypothalamus. In agreement with previous data (Tonon *et al.*, 1990), immunohistochemical labeling revealed that endozepines are highly expressed in tanycytes, a population of specialized ependymal cells lining the third ventricle. Anatomical studies had long suggested that tanycytes, which contact the cerebrospinal fluid and send long processes to specific hypothalamic nuclei, are poised to sense and transmit metabolic signals to neurons (Rodriguez *et al.*, 2005). As a matter of fact, recent findings indicate a key role of tanycytes in hypothalamic glucose sensing. Tanycytes express GLUT2 and glucokinase that determine the glucose sensing capacity of pancreatic  $\beta$ -cells (Garcia *et al.*, 2003; Millàn *et al.*, 2010), and their selective destruction by alloxan impairs the feeding response induced by 2-DG (Sanders *et al.*, 2004). Collectively, these studies and data presented herein underscore the importance of a close functional coupling between tanycytes and neurons for glucose regulation of feeding.

We demonstrated that the anorexigenic effect of the ODN agonist OP is totally blocked by co-administration of a selective antagonist of the melanocortin-3/4 receptors, indicating that regulation of food intake by endozepines is mediated through activation of POMC neurons. In support of this notion, we also found endozepine immunoreactivity in tanycyte processes that project into the arcuate nucleus, suggesting that endozepines could be released in the vicinity of POMC neurons. In addition, astroglial cells from hypothalamic explants spontaneously released endozepines (present data) and i.c.v. injection of ODN increases POMC mRNA levels (Compère *et al.*, 2003). Alternatively, endozepine regulation of POMC neurons could occur indirectly through NPY neurons, which have been shown to synapse onto POMC neurons and inhibit them by releasing GABA and NPY (Cowley *et al.*, 2001; Roseberry *et al.*, 2004; Tong *et al.*, 2008). Inhibition of NPY neurons by endozepines could therefore lead to the disinhibition of POMC neurons and subsequent release of  $\alpha$ -MSH.



*Implications for Whole Body Glucose Homeostasis.* Emerging literature indicates that the hypothalamus, in addition to its well-established role in the control of feeding, also regulates peripheral glucose metabolism through changes in autonomic outputs (Blouet and Schwartz, 2010). Hypothalamic glucose sensing was demonstrated to play a key role in this process (Leloup *et al.*, 1998; Sanders *et al.*, 2004). The present data show that central injection of the antagonist cyclo<sub>1-8</sub>[DLeu<sup>5</sup>]OP in normally fed rats significantly increased, by its own, blood glucose levels, suggesting that endogenous endozepines tonically reduce glycemia. Consistent with this, it has been already demonstrated that endozepines exert a tonic inhibitory effect on food consumption (Do Rego *et al.*, 2007). In contrast, the absence of effect of OP suggests that the endozepineric tone is high at the beginning of the day in normally fed rats and cannot be further increased by i.c.v. injection of the agonist. Accordingly, we observed a marked effect of ODN on glucose tolerance in animals fasted during the night, a condition that reduces the level of endogenous endozepines. These data provide an important baseline for further studies aimed at identifying the central and peripheral mechanisms engaged by endozepines in the control of glucose metabolism. Neurons of the arcuate nucleus are likely to be involved, since they are well established regulators of glucose homeostasis (Zhang *et al.*, 2004; Coppari *et al.*, 2005; Parton *et al.*, 2007).

Altogether, the present data strongly support the notion that hypothalamic glial cells play an important role in glucose sensing and regulate energy balance through the controlled production of endozepines.

## References

- Bady I, Marty N, Dallaporta M, Emery M, Gyger J, Tarussio D, Foretz M, Thorens B (2006) Evidence from glut2-null mice that glucose is a critical physiological regulator of feeding. *Diabetes* 55:988-995.
- Blouet C, Schwartz GJ (2010) Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behav Brain Res* 209:1-12.
- Colombani AL, Carneiro L, Benani A, Galinier A, Jaillard T, Duparc T, Offer G, Lorsignol A, Magnan C, Casteilla L, Penicaud L, Leloup C (2009) Enhanced hypothalamic glucose sensing in obesity: alteration of redox signaling. *Diabetes* 58:2189-2197.
- Compère V, Li S, Leprince J, Tonon MC, Vaudry H, Pelletier G (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* 15:197-203.
- Compère V, Lanfray D, Castel H, Morin F, Leprince J, Dureuil B, Vaudry H, Pelletier G, Tonon MC (2010) Acute food deprivation reduces expression of diazepam-binding inhibitor, the precursor of the anorexigenic octadecaneuropeptide ODN, in mouse glial cells. *J Mol Endocrinol* 44:295-299.
- Coppari R, Ichinose M, Lee CE, Pullen AE, Kenny CD, McGovern RA, Tang V, Liu SM, Ludwig T, Chua SC, Jr., Lowell BB, Elmquist JK (2005) The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell Metab* 1:63-72.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411:480-484.
- De Mateos-Verchere JG, Leprince J, Tonon MC, Vaudry H, Costentin J (2001) The octadecaneuropeptide [diazepam-binding inhibitor (33-50)] exerts potent anorexigenic effects in rodents. *Eur J Pharmacol* 414:225-231.
- Do Rego JC, Orta MH, Leprince J, Tonon MC, Vaudry H, Costentin J (2007) Pharmacological characterization of the receptor mediating the anorexigenic action of the octadecaneuropeptide: evidence for an endozepinergetic tone regulating food intake. *Neuropsychopharmacology* 32:1641-1648.

- Gandolfo P, Patte C, Leprince J, Thoumas JL, Vaudry H, Tonon MC (1997) The stimulatory effect of the octadecaneuropeptide (ODN) on cytosolic  $Ca^{2+}$  in rat astrocytes is not mediated through classical benzodiazepine receptors. *Eur J Pharmacol* 322:275-281.
- Garcia MA, Millan C, Balmaceda-Aguilera C, Castro T, Pastor P, Montecinos H, Reinicke K, Zuniga F, Vera JC, Onate SA, Nualart F (2003) Hypothalamic ependymal-glial cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *J Neurochem* 86:709-724.
- Lectez B, Jeandel L, El-Yamani FZ, Arthaud S, Alexandre D, Mardargent A, Jegou S, Mounien L, Bizet P, Magoul R, Anouar Y, Chartrel N (2009) The orexigenic activity of the hypothalamic neuropeptide 26RFa is mediated by the neuropeptide Y and proopiomelanocortin neurons of the arcuate nucleus. *Endocrinology* 150:2342-2350.
- Leloup C, Orosco M, Serradas P, Nicolaidis S, Penicaud L (1998) Specific inhibition of GLUT2 in arcuate nucleus by antisense oligonucleotides suppresses nervous control of insulin secretion. *Mol Brain Res* 57:275-280.
- Leprince J, Oulyadi H, Vaudry D, Masmoudi O, Gandolfo P, Patte C, Costentin J, Fauchere JL, Davoust D, Vaudry H, Tonon MC (2001) Synthesis, conformational analysis and biological activity of cyclic analogs of the octadecaneuropeptide ODN. Design of a potent endozepine antagonist. *Eur J Biochem* 268:6045-6057.
- Loomis WF, Behrens MM, Williams ME, 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, Tonon MC (1993) Ontogeny of diazepam-binding inhibitor-related peptides (endozepines) in the rat brain. *Neuroscience* 57:777-786.
- Marty N, Dallaporta M, Foretz M, Emery M, Tarussio D, Bady I, Binnert C, Beermann F, Thorens B (2005) Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors. *J Clin Invest* 115:3545-3553.
- Masmoudi O, Gandolfo P, Leprince J, Vaudry D, Fournier A, Patte-Mensah C, Vaudry H, Tonon MC (2003) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide

- (PACAP) stimulates endozepine release from cultured rat astrocytes via a PKA-dependent mechanism. *Faseb J* 17:17-27.
- Millàn C, Martinez F, Cortes-Campos C, Lizama I, Yanez MJ, Llanos P, Reinicke K, Rodriguez F, Peruzzo B, Nualart F, Garcia MA (2010) Glial glucokinase expression in adult and post-natal development of the hypothalamic region. *ASN Neuro* 2:135-145.
- Parton LE, Ye CP, Coppari R, Enriori PJ, Choi B, Zhang CY, Xu C, Vianna CR, Balthasar N, Lee CE, Elmquist JK, Cowley MA, Lowell BB (2007) Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 449:228-232.
- Patte C, Gandolfo P, Leprince J, Thoumas JL, Fontaine M, Vaudry H, Tonon MC (1999) GABA inhibits endozepine release from cultured rat astrocytes. *Glia* 25:404-411.
- Rodriguez EM, Blazquez JL, Pastor FE, Pelaez B, Pena P, Peruzzo B, Amat P (2005) Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. *Int Rev Cytol* 247:89-164.
- Roseberry AG, Liu H, Jackson AC, Cai X, Friedman JM (2004) Neuropeptide Y-mediated inhibition of proopiomelanocortin neurons in the arcuate nucleus shows enhanced desensitization in ob/ob mice. *Neuron* 41:711-722.
- Sanders NM, Dunn-Meynell AA, Levin BE (2004) Third ventricular alloxan reversibly impairs glucose counterregulatory responses. *Diabetes* 53:1230-1236.
- Schuit FC, Huypens P, Heimberg H, Pipeleers DG (2001) Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. *Diabetes* 50:1-11.
- Tong Q, Ye CP, Jones JE, Elmquist JK, Lowell BB (2008) Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. *Nat Neurosci* 11:998-1000.
- Tonon MC, Désy L, Nicolas P, Vaudry H, Pelletier G (1990) Immunocytochemical localization of the endogenous benzodiazepine ligand octadecaneuropeptide (ODN) in the rat brain. *Neuropeptides* 15:17-24.
- Tonon MC, Leprince J, Gandolfo P, Compère V, Pelletier G, Malagon M, Vaudry H (2006) Endozepines. In: *Handbook of Biologically Active Peptides*, Elsevier Edition (Kastin AJ, ed), pp 813-820 Maryland Heights: Elsevier.

- Vidarsdottir S, Smeets PA, Eichelsheim DL, van Osch MJ, Viergever MA, Romijn JA, van der Grond J, Pijl H (2007) Glucose ingestion fails to inhibit hypothalamic neuronal activity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 56:2547-2550.
- Zhang Y, Zhou J, Corll C, Porter JR, Martin RJ, Roane DS (2004) Evidence for hypothalamic K<sup>+</sup>(ATP) channels in the modulation of glucose homeostasis. *Eur J Pharmacol* 492:71-79.

## Figure Legends

**Fig. 1.** Glucose stimulates the expression of endozepines in the rat hypothalamus. (A) Hypothalamic DBI mRNA levels from normally fed (*Fed*), overnight-fasted saline-injected (*Fast+Sal*) or overnight-fasted glucose-injected (*Fast+Glc*) animals. Quantitation was performed in *Area A* (floor of the third ventricle) and *Area B* (infralateral wall of the third ventricle). Values are normalized to that obtained with fed animals (n = 6). (B) Hypothalamic section labeled with ODN (*ODN, Merge*) and DARPP-32 (*DARPP-32, Merge*) antibodies. (d) Higher magnification view of (a). Arrows show tanycyte processes that extend into the parenchyma. *ARC*, arcuate nucleus; *ME*, median eminence; *3V*, third ventricle. Scale bars = 50  $\mu$ m. (C) POMC mRNA levels in the ARC from normally fed (*Fed*), overnight-fasted saline-injected (*Fast+Sal*) or overnight-fasted glucose-injected (*Fast+Glc*) animals. Values were normalized to that obtained with fed animals (n = 5). (D) ODN-like immunoreactivity (*ODN-LI*) measured in the media of hypothalamic explants incubated in 0.2 or 1 g/L glucose (*Glc*). Values were normalized to that obtained during a preincubation period at 0.2 g/L glucose (n = 6-8). Data represent the mean  $\pm$  SEM. Mann and Whitney test: \*\*,  $P < 0.01$ , \*,  $P < 0.05$ .

**Fig. 2.** Feeding responses to glucose or 2-DG depend on the endozepiner tone. (A) Rats fasted for 18 h received an i.c.v. injection of cyclo<sub>1-8</sub>[DLeu<sup>5</sup>]OP (20  $\mu$ g; black field) or vehicle (*Sal*; open field) with (+) or without (-) i.c.v. injection of glucose (*Glc*; 3.5 mg). Forty five min later, access to food was restored and cumulative food intake was measured (n = 4). (B) Rats fasted for 18 h received an i.c.v. injection of cyclo<sub>1-8</sub>[DLeu<sup>5</sup>]OP (20  $\mu$ g; black field) or vehicle (*Sal*; open field) with (+) or without (-) an i.p. administration of glucose (*Glc*; 1 g/kg body weight). Forty five min later, access to food was restored and cumulative food intake was measured (n = 5-6). (C) Normally fed rats received an i.c.v. injection of OP (2  $\mu$ g; black field) or vehicle (*Sal*; open field) with (+) or without (-) i.c.v. injection of 2-DG (3.5 mg). Forty five min later, access to food was restored and cumulative food intake was measured (n = 3-4). Data represent mean  $\pm$  SEM. Mann and Whitney test: \*,  $P < 0.05$ , NS, not statistically different.

**Fig. 3.** OP- and glucose-induced feeding suppression are mediated by the melanocortin pathway. (A) Rats fasted for 18 h received an i.c.v. injection of SHU-9119 (0.3 nmol; black field) or vehicle (*Sal*; open field) with (+) or without (-) i.c.v. injection of OP (2 µg). Forty five min later, access to food was restored and cumulative food intake was measured (n = 4). (B) Rats fasted for 18 h received an i.c.v. injection of SHU-9119 (0.3 nmol; black field) or vehicle (*Sal*; open field) with (+) or without (-) i.c.v. injection of glucose (*Glc*; 3.5 mg). Forty five min later, access to food was restored and cumulative food intake was measured (n = 3). Data represent mean ± SEM. Mann and Whitney test: \*,  $P < 0.05$ , NS, not statistically different.

**Fig. 4.** Peripheral blood glucose levels are regulated by central endozepines. (A) Variation of glycemia in normally fed rats following i.c.v. injection of OP (2 µg), cyclo<sub>1-8</sub>[DLeu<sup>5</sup>]OP (20 µg) or vehicle (*Sal*) (n = 3-5). (B) Glucose tolerance test on fasted rats following i.c.v. injection of ODN (2 µg) or vehicle (*Sal*) (n = 5). Data represent the mean ± SEM. Mann and Whitney test: \*,  $P < 0.05$  versus i.c.v. vehicle-injected animals.

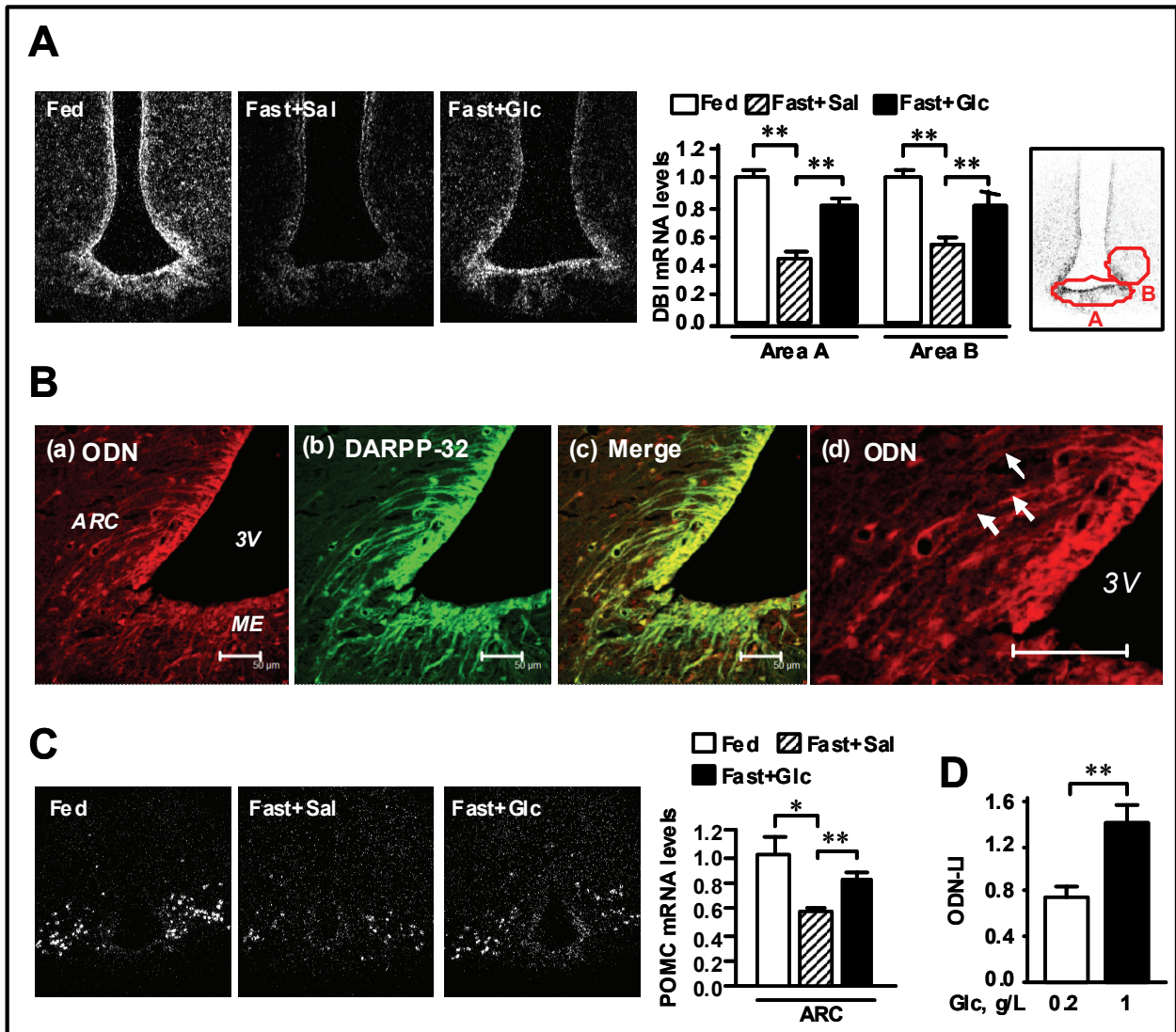


Figure 1



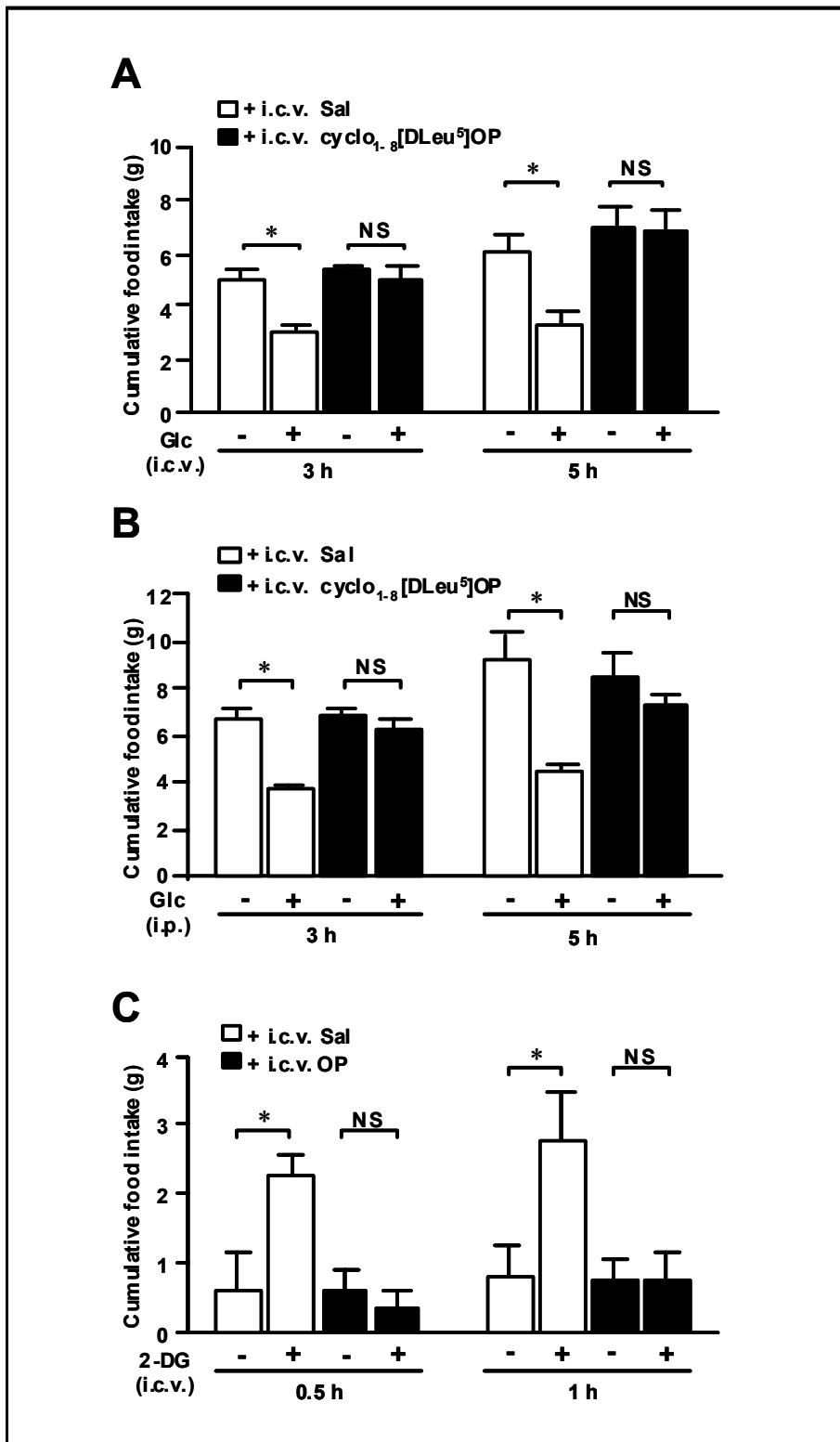


Figure 2

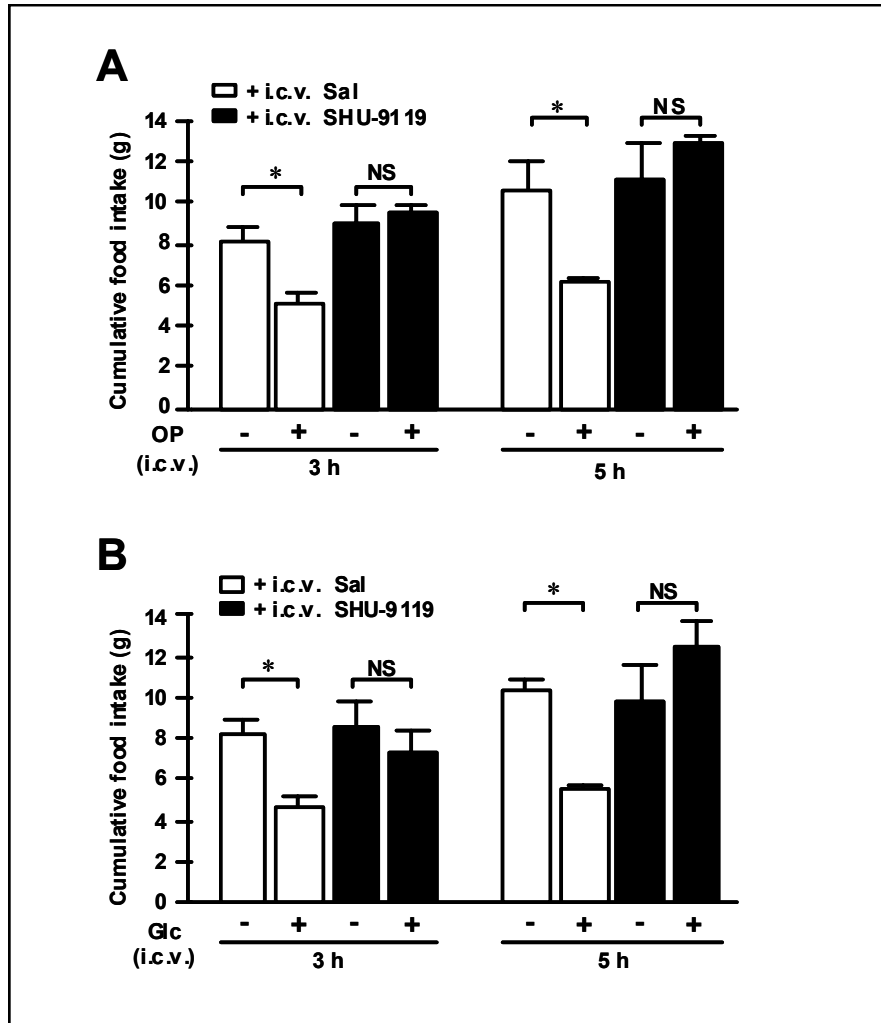


Figure 3

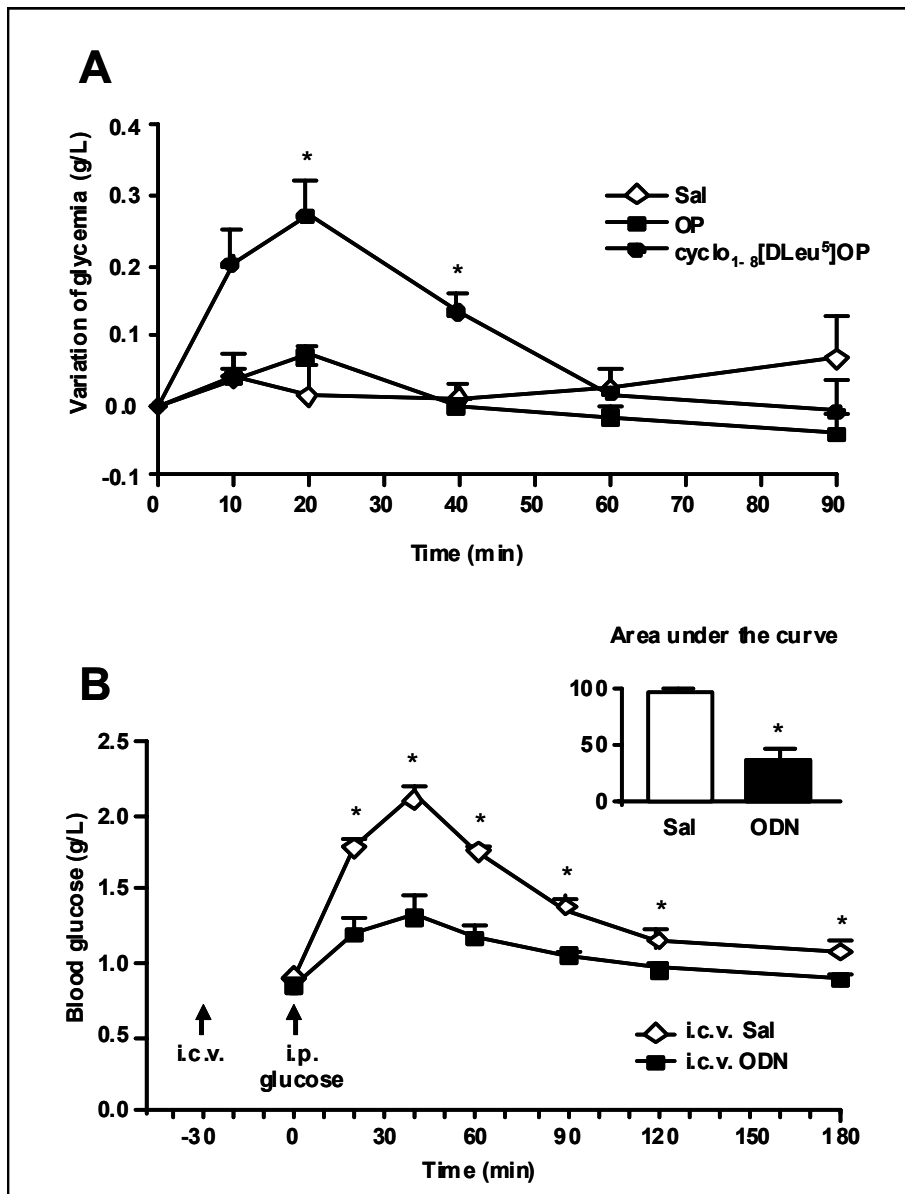
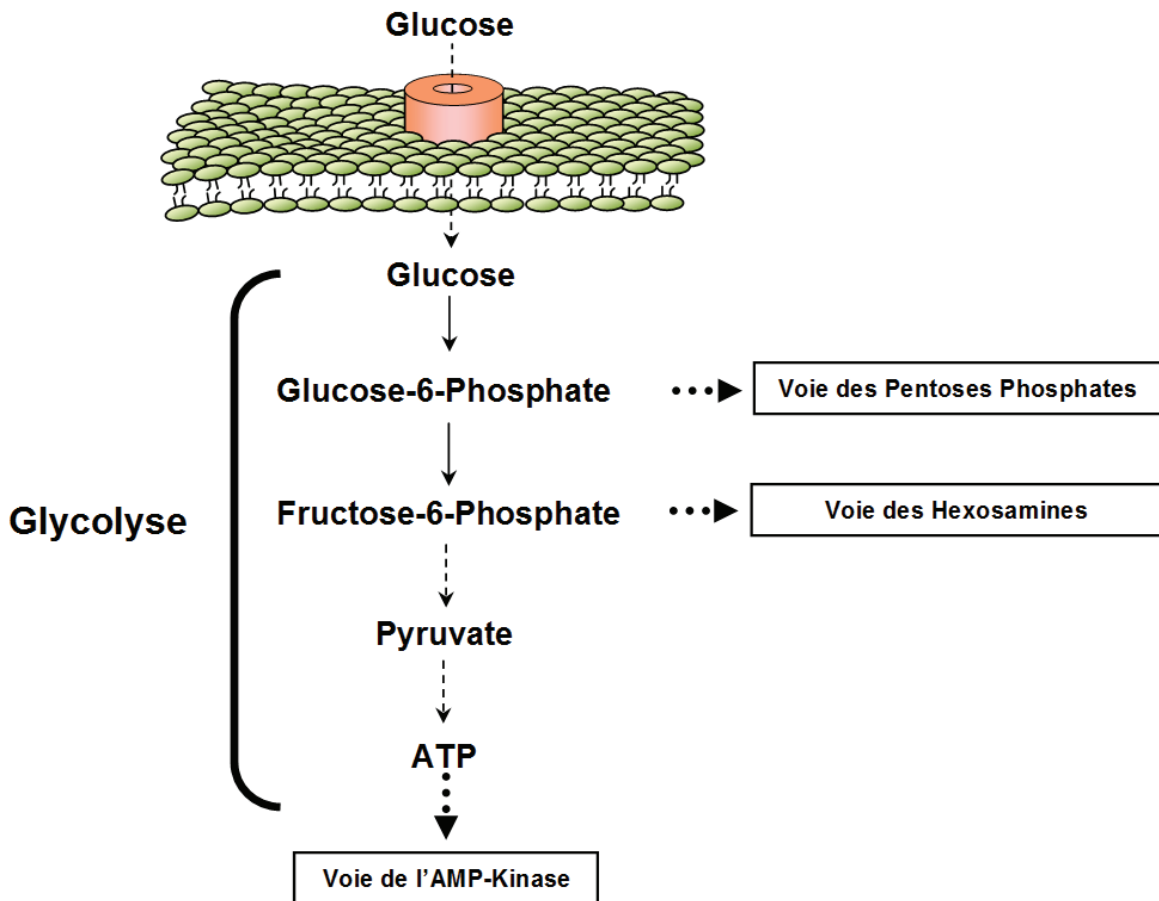


Figure 4





**Figure 10 :** Représentation schématique des différentes voies métaboliques pouvant relayer les effets du glucose sur l'expression de gènes cibles.

## Mécanismes intracellulaires relayant les effets du glucose sur l'expression du DBI

### Résultats préliminaires

Nous avons montré dans le chapitre précédent que l'injection centrale de glucose augmente le taux des ARNm codant le DBI dans les cellules astrogliales hypothalamiques, suggérant que le glucose pourrait stimuler l'expression du gène DBI. Les effets du glucose sur l'activité transcriptionnelle de gènes cibles peuvent être relayés par plusieurs voies métaboliques (Fig. 10).

L'augmentation de la concentration intracellulaire de glucose conduit à une stimulation de la glycolyse, une augmentation de la production d'ATP, et finalement une inhibition de l'*AMP-activated protein kinase* (AMPK), une enzyme ubiquiste dont l'activité est inversement proportionnelle à la concentration d'ATP intracellulaire (Minokoshi *et al.*, 2004). Parallèlement à cette voie, le glucose peut emprunter deux voies annexes, prenant en charge des intermédiaires de la glycolyse, qui permettent le « sensing » du glucose et la régulation de gènes d'intérêt : la voie des pentoses phosphates, utilisant le glucose-6-phosphate et la voie des hexosamines, utilisant le fructose-6-phosphate. La première est une voie enzymatique dont l'un des produits, le xylulose-5-phosphate, interagit avec le *carbohydrate response element-binding protein*, un facteur de transcription capable de lier notamment les séquences consensus de type *carbohydrate response element*, présentes dans la région promotrice des gènes cibles (Meugnier *et al.*, 2007). La voie des hexosamines, quant à elle, est une voie pluri-enzymatique, particulièrement bien caractérisée dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques. L'enzyme limitante de cette voie, la glucose-6-phosphate amidotransférase (GFAT), utilise de 3 à 5 % du fructose-6-phosphate produit par la glycolyse et le convertit en glucosamine-6-phosphate. Celui-ci est ensuite converti en UDP-N-acétylglucosamine, qui est le principal substrat de l'O-glycosylation de plusieurs protéines, dont certains facteurs de transcription.

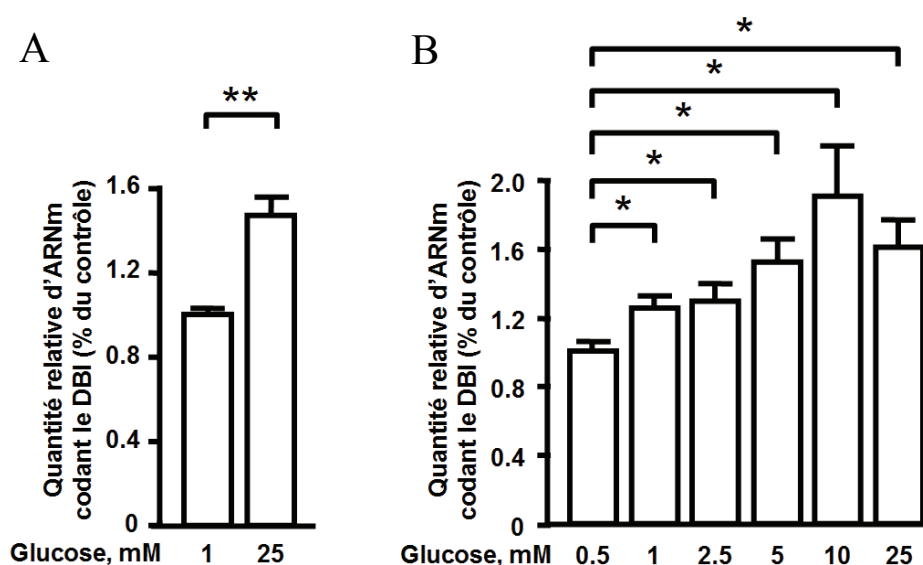
L'ensemble de ces éléments nous a conduits à nous poser les questions suivantes :

- 1) L'effet stimulateur du glucose sur les taux d'ARNm codant le DBI est-il la conséquence de l'activation du promoteur du gène ?
- 2) Quelle est la voie métabolique relayant ces effets ?

## 1. Le glucose stimule l'activité transcriptionnelle du gène codant le DBI

### 1.1 Effet du glucose sur les quantités d'ARNm codant le DBI dans des astrocytes natifs de rat en culture et des cellules de la lignée C6

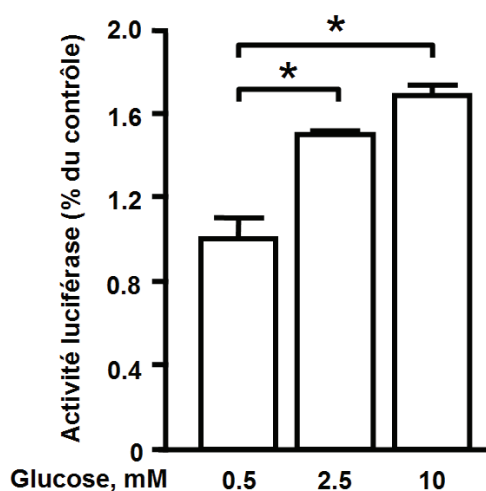
Nous avons démontré, par la technique de RT-PCR-quantitative, qu'une augmentation de la concentration extracellulaire de glucose s'accompagne d'une augmentation des taux d'ARNm codant le DBI dans des astrocytes de rat en culture (Fig. 11A). Parallèlement, nous démontrons que le glucose induit une augmentation dose-dépendante de la quantité de transcrits dans les cellules C6 (Fig. 11B), indiquant que cette lignée constitue un bon modèle pouvant se substituer aux astrocytes natifs dans la suite de nos travaux.



**Figure 11 : Effet du glucose sur les quantités d'ARNm codant le DBI dans les astrocytes de rat en culture secondaire et dans les cellules C6.** Les astrocytes en culture secondaire (A) ou les cellules C6 (B) sont incubés pendant 6 h dans des milieux de culture contenant les concentrations de glucose indiquées. Au terme de l'incubation, les ARN totaux sont extraits et la quantité relative d'ARNm codant le DBI (ratio DBI/ $\beta$ -actine) est mesurée par la technique de RT-PCR-quantitative n=3 ; Test de Kruskal et Wallis : \*, P<0,05.

## 1.2. Analyse promoteur/rapporteur

Nous avons également entrepris, à l'aide de la stratégie « promoteur/rapporteur », l'identification des régions du promoteur DBI relayant les effets du glucose. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps amplifié, à l'aide d'une préparation d'ADN génomique de cerveau de rat, un fragment PCR de 851 paires de bases (pb) correspondant à la région promotrice proximale du gène. Ce fragment a été cloné dans le vecteur pGluc, en amont du gène rapporteur luciférase. Nous avons montré, par transfection transitoire de ce construit dans la lignée astrocytaire C6, que le glucose induit une augmentation de l'activité luciférase (Fig. 12), indiquant qu'un élément de réponse au glucose est présent dans cette région.



**Figure 12 : Effet du glucose sur l'activité transcriptionnelle du promoteur proximale du DBI de rat.** Les cellules de la lignée C6 ont été transfectées avec le construit pGLuc-DBI [-851/-1] contenant la région promotrice proximale du gène DBI placée en amont d'un gène rapporteur, la luciférase, puis incubées durant 20 h dans du DMEM contenant 5mM de glucose. Les cellules ont ensuite été incubées durant 3 h, en présence des concentrations de glucose indiquées. A la fin de l'expérience, l'activité luciférase a été mesurée dans le milieu de culture. n=3 ; Test de Kruskal et Wallis : \*, P<0,05.

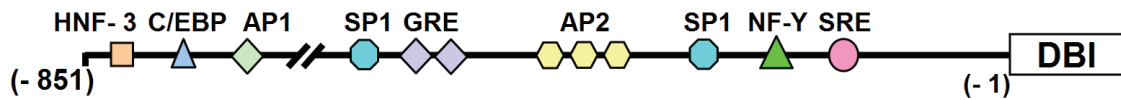
## 2. Voies de signalisation relayant l'effet du glucose sur l'expression du gène DBI chez le rat

### 2.1. Identification d'éléments de régulation potentiels sur le promoteur proximal du gène DBI de rat

L'analyse de la région promotrice proximale du gène codant le DBI chez le rat révèle la présence de plusieurs éléments cis-régulateurs, dont certains sont fonctionnels (Elholm *et al.*, 1996; Helledie *et al.*, 2002; Neess *et al.*, 2006) (Fig. 13).



L'existence d'éléments cis-régulateurs de type SRE et SP1, deux facteurs dont l'activité promotrice est dépendante de leur O-glycosylation, nous a conduits à suspecter l'implication de la voie des hexosamines dans les effets stimulateurs du glucose.



**Figure 13 : Représentation schématique de la structure du promoteur du gène codant le DBI chez le rat.** Les régions régulatrices de la transcription et leur position respective par rapport au site d'initiation de la transcription sont indiquées.

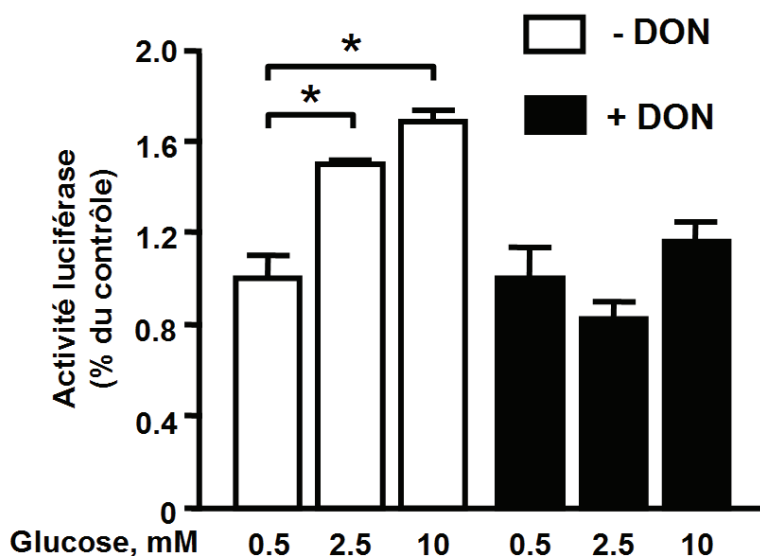
### 2.1. Implication de la voie des hexosamines (résultats préliminaires)

L'absence d'effet d'un activateur pharmacologique de l'AMPK et du pyruvate sur l'expression du gène DBI (résultats non illustrés) suggère que les effets du glucose mettent en jeu un métabolite intermédiaire de la glycolyse, situé plus en amont. Ces résultats, ainsi que l'analyse du promoteur proximal décrite ci-dessus, nous ont donc conduits à tester l'implication de la voie des hexosamines.

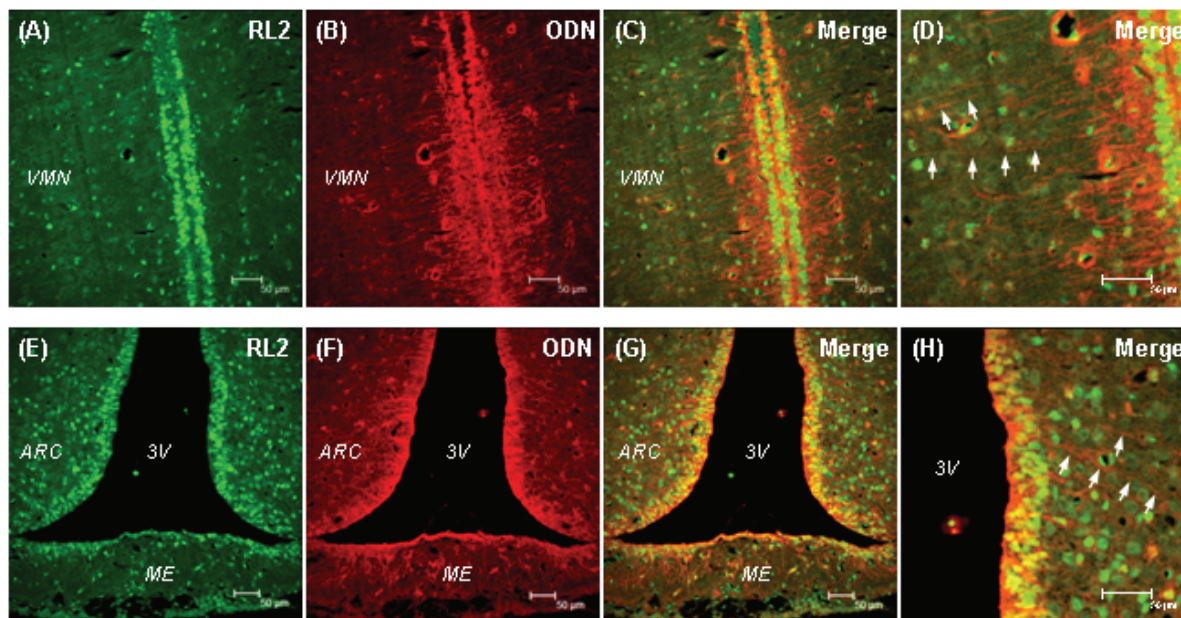
Suite à la transfection transitoire du construit pGLuc-DBI[-851/-1] dans la lignée C6, nous montrons que l'effet stimulateur du glucose sur l'activité du promoteur DBI est bloqué par le 6-diazo-5-oxo-1-norleucine (DON), un inhibiteur pharmacologique de la GFAT, l'enzyme limitante de la voie des hexosamines (Fig. 14).

Le produit final de la voie des hexosamines, le UDP-*N*-acétylglucosamine est le substrat principal de la O-GlcNAc transferase, l'enzyme responsable de la O-glycosylation des protéines. Afin d'évaluer l'activité de la voie des hexosamines dans l'hypothalamus de rat, nous avons entrepris d'examiner l'abondance des protéines O-glycosylées dans cette structure par une analyse immunohistochimique (Fig. 15). L'utilisation d'un anticorps dirigé contre les résidus O-glycosylés (RL2) sur des coupes frontales hypothalamiques met en évidence un marquage intense au niveau des corps cellulaires (tanocytes/cellules épendymaires) bordant le troisième ventricule. L'utilisation, sur les mêmes coupes, d'un anticorps dirigé contre l'ODN révèle un fort co-marquage dans cette région. De façon intéressante, l'immunoréactivité ODN est également très marquée dans les prolongements tanocytaires s'enfonçant profondément dans le parenchyme nerveux. Ces résultats préliminaires suggèrent

donc que la voie des hexosamines est particulièrement active dans les tancytes/cellules épendymaires bordant le troisième ventricule, et qu'elle pourrait donc relayer les effets stimulateurs du glucose observés *in vitro*.



**Figure 14 : Implication de la voie des hexosamines dans l'effet du glucose sur l'expression du DBI.** Les cellules de la lignée C6, transfectées avec le construit pGLuc- DBI [-851/-1], ont été pré-incubées durant 1 h avec le 6-diazo-5-oxo-l-norleucine (DON), un inhibiteur spécifique de la GFAT. Les cellules ont ensuite été incubées, durant 3 h, en présence des concentrations de glucose indiquées, puis l'activité luciférase a été mesurée dans le milieu de culture. n=3 ; test de Kruskal et Wallis : \*, P<0,05.



**Figure 15 : Immunolocalisation des protéines O-glycosylés et du DBI dans l'hypothalamus de rat.** Des coupes frontales d'hypothalamus de rat ont été co-marquées à l'aide d'anticorps commerciaux dirigés contre les résidus O-Glycosylés (RL2) (A, E) et d'anticorps dirigés contre l'ODN de rat (B, F). (C, G) Superposition des marquages obtenus avec les deux anticorps. (D, H) Agrandissements réalisés à partir des images présentées en C et G. 3V, troisième ventricule; ARC, noyau arqué; ME, éminence médiane; VMN, noyau ventromédian.



# **Discussion**



Le *diazepam-binding inhibitor* et ses dérivés, dont l'octadécaneuropeptide (ODN, DBI<sub>33-50</sub>), sont généralement désignés sous le terme d'endozépines en raison de leur capacité à inhiber la liaison des benzodiazépines (Guidotti *et al.*, 1983; Ferrero *et al.*, 1984; Slobodyansky *et al.*, 1989). Plus récemment, des travaux effectués dans le laboratoire ont montré que l'ODN est également capable d'interagir avec un récepteur de type RCPG (Patte *et al.*, 1995; Gandolfo *et al.*, 1997) pour lequel un antagoniste a été développé (Leprince *et al.*, 2001). Les endozépines, qui sont largement distribuées dans le SNC, sont presque exclusivement exprimées par les cellules gliales chez les mammifères (Tonon *et al.*, 1990; Alho *et al.*, 1991; Malagon *et al.*, 1993; Vidnyanszky *et al.*, 1994). Des travaux ont montré que l'injection centrale d'ODN s'accompagne d'une diminution de la prise de nourriture et du poids chez le rongeur (Garcia de Mateos-Verchere *et al.*, 2001; Do Rego *et al.*, 2007), indiquant que ce peptide est impliqué dans la régulation du comportement alimentaire. Une approche pharmacologique a permis de déterminer que l'effet satiétogène de l'ODN est relayé par son récepteur métabotropique (Do Rego *et al.*, 2007). Enfin, des études effectuées au sein du laboratoire ont montré que l'injection centrale d'ODN s'accompagne d'une augmentation de l'expression de la POMC et d'une diminution de l'expression du NPY au niveau du NA (Compère *et al.*, 2003, 2005), suggérant que les effets de l'ODN sont relayés par les populations neuronales de premier ordre.

Dans ce contexte, nous avons dans un premier temps recherché l'influence du statut énergétique sur l'expression du DBI au niveau de l'hypothalamus. Nous nous sommes ensuite intéressés aux facteurs circulants capables de moduler l'expression centrale du DBI. Enfin, nous avons recherché les voies neuronales et les mécanismes cellulaires relayant les effets du système endozépinergique sur l'homéostasie énergétique.

### ***Influence du statut énergétique sur l'expression hypothalamique des endozépines, rôle de la leptine et de l'insuline.***

Nos travaux montrent pour la première fois qu'un jeûne aigu de 18 h s'accompagne d'une diminution des quantités d'ARNm codant le DBI dans plusieurs régions de l'hypothalamus médio-basal chez le rongeur. Cet effet est observé dans les astrocytes du parenchyme du NA et les cellules de la zone périventriculaire de l'hypothalamus. Plusieurs données de la littérature indiquent qu'en fonction du statut

énergétique de l'organisme, l'activité des voies neuronales hypothalamiques est modulée positivement ou négativement. Ainsi, par exemple, Lauzurica et collaborateurs démontrent qu'une diminution de la nourriture stimule l'expression du NPY, facteur orexigène, et inversement réduit celle de la POMC, précurseur de l' $\alpha$ -MSH, peptide anorexigène (Lauzurica *et al.*, 2010). Une diminution des taux d'ARNm codant le DBI est donc en accord avec l'activité anorexigène de l'ODN précédemment décrite, et renforce l'hypothèse d'un rôle des endozépine hypothalamiques dans le contrôle de la prise alimentaire. Etant donné que l'endozépine ODN exerce une action opposée sur les populations neuronales du NA (Compère *et al.*, 2003, 2005), nos travaux suggèrent que l'action du jeûne sur l'activité de ces neurones peut être en partie due à une réduction de l'effet stimulateur des endozépine endogènes sur les cellules exprimant la POMC et/ou une levée d'inhibition sur celles produisant le NPY.

Nous avons ensuite recherché les facteurs circulants satiétogènes susceptibles de stimuler l'expression du DBI au niveau de l'hypothalamus et donc de réverser l'effet du jeûne. Notre choix s'est porté sur l'insuline et la leptine, deux hormones dont les concentrations plasmatiques reflètent à tout moment le statut énergétique de l'organisme, et dont les niveaux sont réduits en condition de jeûne (Bi *et al.*, 2003). Il est admis que les neurones à POMC/CART et à NPY/AgRP expriment des récepteurs pour l'insuline et la leptine, et que ces deux hormones exercent des effets opposés sur leur activité (Schwartz *et al.*, 2000, pour revue). La présence de récepteurs de la leptine sur les populations astrogliales hypothalamiques n'est pas clairement établie (Cheunsuang et Morris, 2005) et celle des récepteurs de l'insuline n'a été démontrée que sur des astrocytes normaux ou tumoraux *in vitro* (Grunberger *et al.*, 1986; Schechter et Yanovitch, 1999). La localisation de ces deux récepteurs sur les cellules exprimant le DBI, recherchée par immunohistochimie (récepteur insuline et récepteur leptine) et hybridation *in situ* (DBI) sur des coupes consécutives d'hypothalamus, révèle que les cellules DBI positives bordant les ventricules présentent les récepteurs pour ces deux hormones, et donc que ces cellules pourraient être sensibles aux variations des taux circulants de leptine et d'insuline. L'injection périphérique de l'une ou l'autre de ces hormones est sans effet sur la réduction de la quantité de transcrits codant le DBI induite par le jeûne au niveau de l'hypothalamus. Ces résultats suggèrent donc que la diminution des taux circulants de ces deux hormones ne relaie pas l'effet du jeûne sur l'expression hypothalamique du DBI, et que les cellules

astrogliales de l'hypothalamus seraient sensibles à d'autres facteurs circulants. Il convient de noter que les cellules épendymaires bordant le ventricule latéral, qui expriment également le DBI, répondent à l'injection d'insuline par une augmentation rapide et transitoire du taux d'ARNm codant cette protéine. Des travaux récents montrent que le septum latéral, et notamment la zone bordant le ventricule latéral, participe à la régulation du comportement alimentaire (Pankey *et al.*, 2008; Scopinho *et al.*, 2008) et qu'une restriction alimentaire chez l'animal provoque une diminution de l'expression du NPY dans cette zone (Kovacs *et al.*, 2007). Un éventuel effet de l'ODN sur ces neurones NPYergiques, comme cela a été démontré pour ceux du NA, reste à démontrer.

### ***Effet du glucose sur la production et la libération d'endorzépines au niveau de l'hypothalamus***

Plusieurs études réalisées chez le rongeur suggèrent que les cellules astrogliales et plus particulièrement les tanocytes sont des éléments essentiels à l'intégration centrale des variations de la glycémie. Les tanocytes expriment GLUT2 ainsi que la glucokinase (Garcia *et al.*, 2003; Millàn *et al.*, 2010), deux enzymes essentielles à l'intégration des variations de la glycémie par les cellules  $\beta$ -pancréatiques. Leur destruction sélective s'accompagne d'une perte de la contre-réponse métabolique induite par l'injection centrale de 2-DG (Sanders *et al.*, 2004). La contre-réponse métabolique, perdue chez les animaux déficients pour le gène codant GLUT2, est rétablie lorsque celui-ci est spécifiquement ré-exprimé par transgénèse dans les astrocytes (Marty *et al.*, 2005). Néanmoins, le rôle exact des cellules astrogliales dans ce processus est mal connu. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle la réponse de ces cellules aux variations de glucose conduirait à une libération d'endorzépines, au niveau de l'hypothalamus.

Nous avons montré, par hybridation *in situ*, que l'injection centrale de glucose chez des rats préalablement affamés augmente la quantité de transcrits codant le DBI au niveau de la zone périventriculaire de l'hypothalamus. A l'aide d'anticorps dirigés contre l'ODN et la DARPP-32, nous montrons que l'expression hypothalamique des endorzépines est principalement confinée aux corps cellulaires et prolongements cytoplasmiques des tanocytes bordant le troisième ventricule.



La restauration des niveaux des ARNm 3 h après l'injection icv de glucose est particulièrement marquée au niveau des cellules de la zone périventriculaire. Ces cellules correspondraient aux tanocytes de types  $\beta_1$  et  $\beta_2$  (Rodriguez *et al.*, 2005), et leur sensibilité au glucose est en accord avec la localisation de GLUT-2 dans cette zone de l'hypothalamus (Garcia *et al.*, 2003). De manière surprenante, dans nos conditions expérimentales, l'expression du DBI n'est pas stimulée par une injection de glucose dans les tanocytes de type  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ , qui expriment également les transporteurs GLUT-2 (Garcia *et al.*, 2003). Finalement, des expériences réalisées sur des explants hypothalamiques de rat démontrent que le glucose stimule la libération de composés immunologiquement apparentés à l'ODN. L'ensemble de ces résultats nous a conduits à envisager que les effets centraux du glucose pourraient être en partie relayés par une augmentation de la sécrétion d'endorépins au niveau de l'hypothalamus.

### ***Implication des endorépins dans l'intégration centrale des variations de la glycémie***

L'effet anorexigène de l'ODN est aboli par le cyclo<sub>1-8</sub>[DLeu<sup>5</sup>]OP et mimé par l'OP (Do Rego *et al.*, 2007), deux analogues de l'ODN ayant respectivement des propriétés antagoniste et agoniste vis à vis du récepteur métabotrope (Leprince *et al.*, 2001). Afin d'évaluer le rôle des endorépins dans la gluco-sensibilité cérébrale, nous avons recherché l'effet de ces deux composés sur les modifications du comportement alimentaire induites par une injection de glucose ou de 2-DG. Nos travaux montrent que l'effet anorexigène d'une injection centrale ou périphérique de glucose, chez des rats préalablement privés de nourriture, est bloqué par l'injection icv de cyclo<sub>1-8</sub>[DLeu<sup>5</sup>]OP. De même, l'effet oréxigène d'une injection centrale de 2-DG chez des rats normalement nourris est aboli par la co-injection d'OP.

L'ensemble de ces données suggère que les endorépins produites par les cellules astrogliales, et plus particulièrement par les tanocytes, constituent un relais essentiel dans l'intégration hypothalamique des variations de la glycémie, *via* l'activation du récepteur métabotrope de l'ODN.

### ***Populations neuronales relayant les effets anorexigènes du glucose et de l'ODN***

Des travaux antérieurs réalisés dans le laboratoire montrent que l'injection centrale d'ODN stimule l'expression de la POMC et inhibe celle du NPY au niveau du NA (Compère *et al.*, 2003). La présence de composés immunologiquement apparentés à l'ODN dans les prolongements tanycytaires localisés dans le parenchyme du NA indique que les endozépines pourraient être libérées dans le microenvironnement des neurones de cette structure. A l'appui de cette hypothèse, l'augmentation des quantités de transcrits codant le DBI induite par l'injection centrale de glucose, chez des rats préalablement privés de nourriture, s'accompagne d'une stimulation de l'expression de la POMC dans le NA. La réponse des neurones à POMC au glucose est en accord avec une étude réalisée par Bady et collaborateurs (Bady *et al.*, 2006). L'ensemble de ces données nous a conduits à évaluer l'implication du système mélanocortinique dans les effets anorexigènes d'une injection centrale de glucose ou d'OP chez le rat.

La réponse au glucose est abolie par la co-injection d'un antagoniste des récepteurs MCR3/4, le SHU-9119, démontrant pour la première fois que les neurones à POMC relaient l'effet anorexigène du glucose. Par ailleurs, le SHU-9119 bloque également l'effet anorexigène d'une injection centrale d'OP, démontrant que l'activité satiétogène des endozépines met en jeu la stimulation du système mélanocortinique. L'ensemble de nos données expérimentales suggère que l'effet satiétogène du glucose est relayé par l'activation des neurones à POMC *via* le système endozépinergique.

L'effet des endozépines sur les neurones à POMC pourrait s'exercer directement, ou indirectement, par une inhibition des neurones à NPY. Ceux-ci se projettent en effet sur les neurones à POMC, et sont capables de moduler leur activité via la libération de GABA et de NPY (Cowley *et al.*, 2001; Roseberry *et al.*, 2004; Tong *et al.*, 2008). Ainsi, une levée de l'inhibition exercée par les neurones à NPY sur les neurones à POMC permettrait la libération du neuropeptide  $\alpha$ -MSH. De même, les endozépines pourraient bloquer la libération d'AgRP, un antagoniste naturel des récepteurs de type MC3/4R colocalisé avec le NPY au niveau du NA (Broberger *et al.*, 1998). L'ensemble de ces données démontre pour la première fois que l'activité anorexigène de l'ODN est exclusivement relayée par une activation du système mélanocortinique chez le rat et souligne l'importance du couplage tanycyte-neurone dans l'adaptation du comportement alimentaire aux variations de la glycémie.

### ***Implication des endozépines dans la régulation de la glycémie périphérique***

L'hypothalamus, en plus de son rôle bien caractérisé dans la régulation du comportement alimentaire, participe au contrôle de la glycémie périphérique (Blouet et Schwartz, 2010). Il a notamment été démontré que les tanycytes de cette région jouent un rôle clé dans la glucosensibilité de l'hypothalamus (Leloup *et al.*, 1998; Sanders *et al.*, 2004). Ces données nous ont conduits à évaluer l'implication du système endozépinergique dans la régulation de la glycémie périphérique. Nos travaux montrent que l'injection centrale du cyclo<sub>1-8</sub>[DLeu<sup>5</sup>]OP, chez des rats normalement nourris, augmente la glycémie, indiquant que les endozépines produites centralement exercent un tonus inhibiteur sur la glycémie périphérique. Cette hypothèse est renforcée par des études comportementales démontrant que les endozépines exercent également un tonus inhibiteur sur la prise alimentaire (Do Rego *et al.*, 2007). L'absence d'effet de l'OP, injecté au début de la phase diurne, sur la concentration plasmatique de glucose, suggère que le tonus inhibiteur exercé par les endozépines endogènes est élevé dans nos conditions expérimentales et ne peut pas être renforcé par l'administration exogène de l'agoniste. Nous avons toutefois pu observer un effet marqué de l'ODN sur la tolérance au glucose chez des rats affamés durant la nuit, condition dans laquelle l'expression hypothalamique du DBI est réduite. Il sera particulièrement intéressant de rechercher les mécanismes centraux et périphériques relayant l'effet hypoglycémiant des endozépines. Il convient de s'interroger sur l'implication potentielle des neurones à POMC du NA dans ces effets puisque une étude réalisée chez le rat montre que cette population cellulaire intervient également dans la régulation de l'homéostasie glucidique (Parton *et al.*, 2007). Par ailleurs, la présence de composés immunologiquement apparentés à l'ODN dans les cellules astrogliales du tronc cérébral suggère que les endozépines de cette région pourraient également participer à la régulation de la glycémie périphérique (Pr Jean-Denis Troadec, communication personnelle). L'obstruction de l'aqueduc de Sylvius associée à et des injections localisées dans le 3<sup>ème</sup> ou le 4<sup>ème</sup> ventricule permettra de répondre à ces interrogations. Enfin, la mesure des concentrations d'insuline, de glucagon et de la production hépatique de glucose, suite à l'injection centrale d'ODN, pourrait permettre d'identifier les voies de régulations périphériques impliquées dans les effets hypoglycémiantes des endozépines.

### ***Mécanismes cellulaires relayant les effets du glucose sur l'expression du DBI***

Au cours de notre étude, nous avons montré que l'effet stimulateur du glucose sur les quantités de transcrits codant le DBI est également observé, *in vitro*, dans deux modèles d'études, des astrocytes de rat en culture secondaire et les cellules de la lignée astrogliale C6. Nous avons également montré, grâce à la technique promoteur/rapporteur, que l'effet du glucose sur les quantités d'ARNm codant le DBI est relayé par une augmentation de l'activité transcriptionnelle du gène, suggérant que les effets observés *in vivo* sont également induits par ce mécanisme.

Une approche pharmacologique menée sur les cellules C6 nous a permis de préciser que l'activation du promoteur DBI par le glucose met en jeu la voie des hexosamines. Cette voie métabolique, annexe de la glycolyse, permet l'addition de N-acétylglucosamine sur le groupement hydroxyl d'une sérine ou d'une thréonine. Cette modification post-traductionnelle réversible, régule, de façon analogue à la phosphorylation, l'activité, la localisation ou la stabilité des protéines en fonction de la disponibilité du glucose (Ozcan *et al.*, 2010). Plusieurs facteurs de transcription sont la cible de la voie des hexosamines. Leur O-glycosylation permet ainsi de contrôler l'activité transcriptionnelle d'un panel de gènes cibles. La régulation de l'activité du facteur de transcription SP1 par O-glycosylation est à l'heure actuelle l'une des plus étudiées, et permet notamment la régulation de l'expression de la leptine dans les adipocytes (Moreno-Aliaga *et al.*, 2007). De façon intéressante, la séquence promotrice proximale du gène DBI contient une séquence cis-régulatrice de type SP1 fonctionnelle chez le rat (Sandberg *et al.*, 2005; Neess *et al.*, 2006), qui est parfaitement conservée chez la souris et l'homme. Ces données suggèrent que l'effet stimulateur du glucose pourrait être relayé par l'activation par O-glycosylation du facteur de transcription SP1. La mutagénèse dirigée de cet élément cis-régulateur est actuellement en cours de réalisation et permettra de répondre à ces interrogations.



# **Conclusions & Perspectives**



L'ensemble des résultats présentés dans ce mémoire suggère que les endozépinines sont des gliotransmetteurs essentiels à l'intégration centrale des variations de la glycémie. Les principaux résultats expérimentaux appuyant cette hypothèse sont les suivants :

- L'expression hypothalamique des endozépinines est modulée par le statut énergétique
- L'administration centrale de glucose stimule l'expression des endozépinines dans les tanocytes bordant le 3<sup>ème</sup> ventricule.
- Le glucose stimule la sécrétion d'endozépinines sur des cultures d'explants hypothalamiques
- L'utilisation d'un antagoniste ou d'un agoniste du récepteur métabotropique de l'ODN bloque, respectivement, l'effet d'une administration centrale de glucose ou de 2-DG sur la prise alimentaire.
- Les effets anorexigènes des endozépinines et du glucose sont relayés par une activation des neurones à POMC
- Les endozépinines d'origine centrale ont une action hypoglycémisante

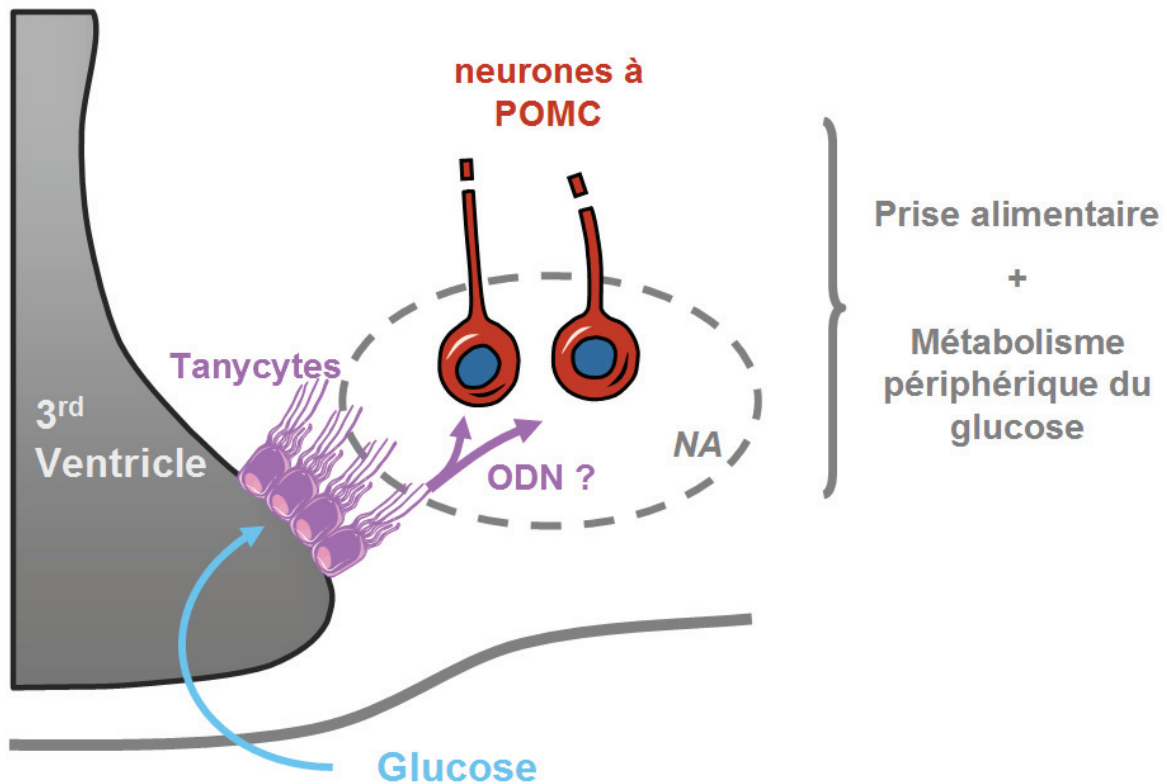
L'ensemble de ces résultats nous permet de proposer un modèle de travail (fig. 16) résumant le rôle potentiel des endozépinines dans la perception centrale du glucose et la régulation de l'homéostasie glucidique.

Les résultats expérimentaux présentés dans ce mémoire, s'ils permettent de mieux appréhender le rôle du système endozépinergique dans l'intégration centrale des variations de la glycémie, soulèvent des interrogations auxquelles il serait intéressant de répondre :

*Les endozépinines d'origine centrale participent-elles à la contre-réponse métabolique?*

Une glucopénie centrale, mimée par l'injection d'analogues non métabolisables du glucose comme le 2-DG ou le 5-TG, s'accompagne de la libération périphérique de glucagon et de catécholamines (Pénicaud *et al.*, 1990; Marty *et al.*, 2005). L'augmentation des concentrations circulantes de ces deux hormones conduit à une contre-réponse métabolique destinée à rétablir une glycémie physiologique, *via* la production de glucose par le foie (Borg *et al.*, 1995).





**Figure 16 : Modèle précisant le rôle potentiel des endozépines dans l'intégration centrale des variations de la glycémie.** L'augmentation centrale des variations de la glycémie induit une augmentation de la libération d'endozépines par les cellules astrogliales hypothalamiques, qui s'accompagne d'une augmentation de l'activité transcriptionnelle du gène DBI dans ces mêmes cellules. L'ODN induit à son tour une stimulation des neurones à POMC et par voie de conséquence, une inhibition de la prise de nourriture ainsi qu'une augmentation du stockage du glucose en périphérie.

Des travaux réalisés par Sanders et collaborateurs indiquent que les tanycytes constituent un élément essentiel à la mise en place de la contre-réponse induite par une glucopénie centrale (Sanders *et al.*, 2004). En effet, ces auteurs ont montré que la destruction sélective des tanycytes, par l'alloxane, abolit la contre-réponse métabolique induite par l'injection centrale de 2-DG. Par ailleurs, dans cette même étude, les auteurs ont constaté que la sensibilité centrale à l'injection de 2-DG est rétablie suite à la réapparition des tanycytes (Sanders *et al.*, 2004), confirmant que ces cellules sont essentielles à la mise en place de la contre-réponse métabolique.

Au cours de notre étude, nous avons montré que l'injection centrale d'OP bloque l'effet oréxigène d'une injection centrale de 2-DG, suggérant qu'une la glucopénie centrale s'accompagne d'une levée du tonus satiétogène exercé par le système endozépinergique. Dans ce contexte, il convient de s'interroger sur l'implication

potentielle du système endozépinergique dans la mise en place de la contre-réponse métabolique. Il sera intéressant d'évaluer l'effet potentiellement inhibiteur de l'ODN sur la sécrétion périphérique de glucagon et de catécholamines consécutive à l'injection centrale de 2-DG.

Les épisodes hypoglycémiques, qu'ils soient légers ou sévères, constituent la complication la plus fréquente du diabète de type I. Les hypoglycémies mineures répétées diminuent le seuil de déclenchement de la contre-réponse métabolique et favorisent ainsi l'apparition d'hypoglycémies sévères chez le patient. L'hypothalamus semble être impliqué dans cette désensibilisation, puisque des travaux réalisés chez le rongeur indiquent que l'amplitude de la contre-réponse métabolique est fortement diminuée par une injection préalable de 5-TG dans le 3<sup>ème</sup> ventricule (Sanders *et al.*, 2007).

Afin d'évaluer l'implication potentielle du système endozépinergique dans la désensibilisation centrale aux épisodes hypoglycémiques, il conviendra dans un premier temps de tester les effets d'injections centrales répétées de 2-DG sur l'expression et la libération hypothalamique d'endozépines. Il sera également très intéressant d'évaluer si l'injection centrale de l'antagoniste de l'ODN permet d'induire une contre réponse métabolique chez des animaux préalablement désensibilisés aux épisodes hypoglycémiques.

*Les endozépines d'origine centrale sont-elles impliquées dans la mise en place de désordres métaboliques ?*

Plusieurs études indiquent que le développement de désordres métaboliques, tels que l'obésité et le diabète de type 2, pourrait s'accompagner d'un dysfonctionnement de la détection centrale du glucose. Ainsi, chez le rat Zucker, obèse et insulino-résistant, ce dysfonctionnement se traduit par une hypersensibilité centrale au glucose et une altération de la sécrétion d'insuline (Colombani *et al.*, 2009). Les travaux de Parton et collaborateurs ont permis de montrer que l'activité des neurones à POMC du NA n'est plus modulée par le glucose chez des souris rendues obèses par un régime hypercalorique (Parton *et al.*, 2007). Enfin, une étude menée chez l'homme indique que la modulation de l'activité hypothalamique, consécutive à l'ingestion de glucose, est perdue chez des patients atteints de diabète de type 2 (Vidarsdottir *et al.*, 2007).

De façon intéressante, de récents travaux ont démontré l'existence, chez l'homme, d'une corrélation entre l'apparition du diabète de type 2 et un polymorphisme localisé sur le promoteur du gène DBI (Fisher *et al.*, 2007). L'ensemble des données de la littérature ainsi que nos résultats nous conduisent à suggérer qu'une altération de la production centrale d'endozépines pourrait être à l'origine de désordres métaboliques, tels que l'obésité et le diabète, et soulignent la nécessité de caractériser les mécanismes par lesquels les endozépines exercent leurs effets sur l'homéostasie glucidique.

# **Bibliographie**

- Aakerlund L, Gether U, Fuhlendorff J, Schwartz TW, Thastrup O (1990) Y1 receptors for neuropeptide Y are coupled to mobilization of intracellular calcium and inhibition of adenylate cyclase. *FEBS Lett* 260:73-78.
- Abbott CR, Rossi M, Wren AM, Murphy KG, Kennedy AR, Stanley SA, Zollner AN, Morgan DG, Morgan I, Ghatei MA, Small CJ, Bloom SR (2001) Evidence of an orexigenic role for cocaine- and amphetamine-regulated transcript after administration into discrete hypothalamic nuclei. *Endocrinology* 142:3457-3463.
- Acheson KJ, Ravussin E, Wahren J, Jequier E (1984) Thermic effect of glucose in man. Obligatory and facultative thermogenesis. *J Clin Invest* 74:1572-1580.
- Agerberth B, Boman A, Andersson M, Jornvall H, Mutt V, Boman HG (1993) Isolation of three antibacterial peptides from pig intestine: gastric inhibitory polypeptide (7-42), diazepam-binding inhibitor (32-86) and a novel factor, peptide 3910. *Eur J Biochem* 216:623-629.
- Ahima RS, Osei SY (2004) Leptin signaling. *Physiol Behav* 81:223-241.
- Akinci MK, Schofield PR (1999) Widespread expression of GABA(A) receptor subunits in peripheral tissues. *Neurosci Res* 35:145-153.
- Alho H, Varga V, Krueger KE (1994) Expression of mitochondrial benzodiazepine receptor and its putative endogenous ligand diazepam binding inhibitor in cultured primary astrocytes and C-6 cells: relation to cell growth. *Cell Growth Differ* 5:1005-1014.
- Alho H, Kolmer M, Harjuntausta T, Helen P (1995) Increased expression of diazepam binding inhibitor in human brain tumors. *Cell Growth Differ* 6:309-314.
- Alho H, Harjuntausta T, Schultz R, Pelto-Huikko M, Bovolin P (1991) Immunohistochemistry of diazepam binding inhibitor (DBI) in the central nervous system and peripheral organs: its possible role as an endogenous regulator of different types of benzodiazepine receptors. *Neuropharmacology* 30:1381-1386.
- Alho H, Costa E, Ferrero P, Fujimoto M, Cosenza-Murphy D, Guidotti A (1985) Diazepam-binding inhibitor: a neuropeptide located in selected neuronal populations of rat brain. *Science* 229:179-182.
- Alho H, Fremeau RT, Jr., Tiedge H, Wilcox J, Bovolin P, Brosius J, Roberts JL, Costa E (1988) Diazepam binding inhibitor gene expression: location in brain and peripheral tissues of rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:7018-7022.
- Amin J, Weiss DS (1993) GABAA receptor needs two homologous domains of the beta-subunit for activation by GABA but not by pentobarbital. *Nature* 366:565-569.
- Amin J, Brooks-Kayal A, Weiss DS (1997) Two tyrosine residues on the alpha subunit are crucial for benzodiazepine binding and allosteric modulation of gamma-aminobutyric acidA receptors. *Mol Pharmacol* 51:833-841.
- Anand BK, Chhina GS, Sharma KN, Dua S, Singh B (1964) Activity of Single Neurons in the Hypothalamic Feeding Centers: Effect of Glucose. *Am J Physiol* 207:1146-1154.
- Andersen KV, Ludvigsen S, Mandrup S, Knudsen J, Poulsen FM (1991) The secondary structure in solution of acyl-coenzyme A binding protein from bovine liver using <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 30:10654-10663.
- Anholt RR, Murphy KM, Mack GE, Snyder SH (1984) Peripheral-type benzodiazepine receptors in the central nervous system: localization to olfactory nerves. *J Neurosci* 4:593-603.
- Anholt RR, De Souza EB, Oster-Granite ML, Snyder SH (1985) Peripheral-type benzodiazepine receptors: autoradiographic localization in whole-body sections of neonatal rats. *J Pharmacol Exp Ther* 233:517-526.
- Anholt RR, Pedersen PL, De Souza EB, Snyder SH (1986) The peripheral-type benzodiazepine receptor. Localization to the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 261:576-583.
- Antkiewicz-Michaluk L, Guidotti A, Krueger KE (1988) Molecular characterization and mitochondrial density of a recognition site for peripheral-type benzodiazepine ligands. *Mol Pharmacol* 34:272-278.

- Apfel R, Lottspeich F, Hoppe J, Behl C, Durr G, Bogdahn U (1992) Purification and analysis of growth regulating proteins secreted by a human melanoma cell line. *Melanoma Res* 2:327-336.
- Arluison M, Quignon M, Nguyen P, Thorens B, Leloup C, Penicaud L (2004) Distribution and anatomical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain--an immunohistochemical study. *J Chem Neuroanat* 28:117-136.
- Aronica E, Gorter JA, Ijlst-Keizers H, Rozemuller AJ, Yankaya B, Leenstra S, Troost D (2003) Expression and functional role of mGluR3 and mGluR5 in human astrocytes and glioma cells: opposite regulation of glutamate transporter proteins. *Eur J Neurosci* 17:2106-2118.
- Ashur-Fabian O, Giladi E, Brenneman DE, Gozes I (1997) Identification of VIP/PACAP receptors on rat astrocytes using antisense oligodeoxynucleotides. *J Mol Neurosci* 9:211-222.
- Badami VM, Rice CD, Lois JH, Madrecha J, Yates BJ (2010) Distribution of hypothalamic neurons with orexin (hypocretin) or melanin concentrating hormone (MCH) immunoreactivity and multisynaptic connections with diaphragm motoneurons. *Brain Res*.
- Bady I, Marty N, Dallaporta M, Emery M, Gyger J, Tarussio D, Foretz M, Thorens B (2006) Evidence from glut2-null mice that glucose is a critical physiological regulator of feeding. *Diabetes* 55:988-995.
- Ball JA, Burnet PW, Fountain BA, Ghatei MA, Bloom SR (1986) Octadecaneuropeptide, benzodiazepine ligand, -like immunoreactivity in rat central nervous system, plasma and peripheral tissues. *Neurosci Lett* 72:183-188.
- Ball JA, Ghatei MA, Sekiya K, Krausz T, Bloom SR (1989) Diazepam binding inhibitor-like immunoreactivity(51-70): distribution in human brain, spinal cord and peripheral tissues. *Brain Res* 479:300-305.
- Baltrons MA, Pedraza CE, Heneka MT, Garcia A (2002) Beta-amyloid peptides decrease soluble guanylyl cyclase expression in astroglial cells. *Neurobiol Dis* 10:139-149.
- Barbaccia ML, Costa E, Ferrero P, Guidotti A, Roy A, Sunderland T, Pickar D, Paul SM, Goodwin FK (1986) Diazepam-binding inhibitor. A brain neuropeptide present in human spinal fluid: studies in depression, schizophrenia, and Alzheimer's disease. *Arch Gen Psychiatry* 43:1143-1147.
- Basile AS, Klein DC, Skolnick P (1986) Characterization of benzodiazepine receptors in the bovine pineal gland: evidence for the presence of an atypical binding site. *Brain Res* 387:127-135.
- Bates SH, Myers MG, Jr. (2003) The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function. *Trends Endocrinol Metab* 14:447-452.
- Benavides J, Peny B, Durand A, Arbilla S, Scatton B (1992) Comparative in vivo and in vitro regional selectivity of central omega (benzodiazepine) site ligands in inhibiting [3H]flumazenil binding in the rat central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther* 263:884-896.
- Benavides J, Quarteronet D, Imbault F, Malgouris C, Uzan A, Renault C, Dubroeuq MC, Gueremy C, Le Fur G (1983) Labelling of "peripheral-type" benzodiazepine binding sites in the rat brain by using [3H]PK 11195, an isoquinoline carboxamide derivative: kinetic studies and autoradiographic localization. *J Neurochem* 41:1744-1750.
- Benoit SC, Air EL, Coolen LM, Strauss R, Jackman A, Clegg DJ, Seeley RJ, Woods SC (2002) The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci* 22:9048-9052.
- Berman JA, Roberts JL, Pritchett DB (1994) Molecular and pharmacological characterization of GABAA receptors in the rat pituitary. *J Neurochem* 63:1948-1954.
- Bernassau JM, Reversat JL, Ferrara P, Caput D, Lefur G (1993) A 3D model of the peripheral benzodiazepine receptor and its implication in intra mitochondrial cholesterol transport. *J Mol Graph* 11:236-244, 235.

- Berthoud HR, Mogenson GJ (1977) Ingestive behavior after intracerebral and intracerebroventricular infusions of glucose and 2-deoxy-D-glucose. *Am J Physiol* 233:R127-133.
- Besman MJ, Yanagibashi K, Lee TD, Kawamura M, Hall PF, Shively JE (1989) Identification of des-(Gly-Ile)-endozepine as an effector of corticotropin-dependent adrenal steroidogenesis: stimulation of cholesterol delivery is mediated by the peripheral benzodiazepine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:4897-4901.
- Bi S, Robinson BM, Moran TH (2003) Acute food deprivation and chronic food restriction differentially affect hypothalamic NPY mRNA expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R1030-1036.
- Biber K, Klotz KN, Berger M, Gebicke-Harter PJ, van Calker D (1997) Adenosine A1 receptor-mediated activation of phospholipase C in cultured astrocytes depends on the level of receptor expression. *J Neurosci* 17:4956-4964.
- Bignami A, Eng LF, Dahl D, Uyeda CT (1972) Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res* 43:429-435.
- Bjorklund H, Bignami A, Dahl D (1985) Immunohistochemical demonstration of glial fibrillary acidic protein in normal rat Muller glia and retinal astrocytes. *Neurosci Lett* 54:363-368.
- Blevins JE, Eakin TJ, Murphy JA, Schwartz MW, Baskin DG (2003) Oxytocin innervation of caudal brainstem nuclei activated by cholecystokinin. *Brain Res* 993:30-41.
- Blouet C, Schwartz GJ (2010) Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behav Brain Res* 209:1-12.
- Blouet C, Jo YH, Li X, Schwartz GJ (2009) Mediobasal hypothalamic leucine sensing regulates food intake through activation of a hypothalamus-brainstem circuit. *J Neurosci* 29:8302-8311.
- Bodega G, Suarez I, Rubio M, Fernandez B (1994) Ependyma: phylogenetic evolution of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin expression in vertebrate spinal cord. *Histochemistry* 102:113-122.
- Bonnert TP, McKernan RM, Farrar S, le Bourdelles B, Heavens RP, Smith DW, Hewson L, Rigby MR, Sirinathsinghji DJ, Brown et al (1999) theta, a novel gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 96:9891-9896.
- Booher J, Sensenbrenner M (1972) Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology* 2:97-105.
- Borboni P, Condorelli L, De Stefanis P, Sesti G, Lauro R (1991) Modulation of insulin secretion by diazepam binding inhibitor and its processing products. *Neuropharmacology* 30:1399-1403.
- Borg WP, Sherwin RS, During MJ, Borg MA, Shulman GI (1995) Local ventromedial hypothalamus glucopenia triggers counterregulatory hormone release. *Diabetes* 44:180-184.
- Bormann J (1991) Electrophysiological characterization of diazepam binding inhibitor (DBI) on GABAA receptors. *Neuropharmacology* 30:1387-1389.
- Bormann J, Clapham DE (1985) gamma-Aminobutyric acid receptor channels in adrenal chromaffin cells: a patch-clamp study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:2168-2172.
- Boujrad N, Hudson JR, Jr., Papadopoulos V (1993) Inhibition of hormone-stimulated steroidogenesis in cultured Leydig tumor cells by a cholesterol-linked phosphorothioate oligodeoxynucleotide antisense to diazepam-binding inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5728-5731.
- Bovolin P, Schlichting J, Miyata M, Ferrarese C, Guidotti A, Alho H (1990) Distribution and characterization of diazepam binding inhibitor (DBI) in peripheral tissues of rat. *Regul Pept* 29:267-281.

- Braestrup C, Squires RF (1977) Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H)diazepam binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:3805-3809.
- Brand-Schieber E, Werner P (2003) AMPA/kainate receptors in mouse spinal cord cell-specific display of receptor subunits by oligodendrocytes and astrocytes and at the nodes of Ranvier. *Glia* 42:12-24.
- Briski KP (1998) Glucoprivic induction of Fos immunoreactivity in hypothalamic dopaminergic neurons. *Neuroreport* 9:289-295.
- Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hokfelt T (1998) The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15043-15048.
- Brown AS, Hall PF (1991) Stimulation by endozepine of the side-chain cleavage of cholesterol in a reconstituted enzyme system. *Biochem Biophys Res Commun* 180:609-614.
- Brown DR, Mohn CM (1999) Astrocytic glutamate uptake and prion protein expression. *Glia* 25:282-292.
- Brunet JF, Allaman I, Magistretti PJ, Pellerin L (2009) Glycogen metabolism as a marker of astrocyte differentiation. *J Cereb Blood Flow Metab.*
- Bullock R, Maxwell WL, Graham DI, Teasdale GM, Adams JH (1991) Glial swelling following human cerebral contusion: an ultrastructural study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 54:427-434.
- Bureau M, Laschet J, Bureau-Heeren M, Hennuy B, Minet A, Wins P, Grisar T (1995) Astroglial cells express large amounts of GABAA receptor proteins in mature brain. *J Neurochem* 65:2006-2015.
- Burgi B, Lichtensteiger W, Lauber ME, Schlumpf M (1999) Ontogeny of diazepam binding inhibitor/acyl-CoA binding protein mRNA and peripheral benzodiazepine receptor mRNA expression in the rat. *J Neuroendocrinol* 11:85-100.
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* 22:183-192.
- Campbell NA, Reece JB (2007) *Biologie, 7e éd. Edition.* Paris: Pearson education France.
- Campfield LA, Brandon P, Smith FJ (1985) On-line continuous measurement of blood glucose and meal pattern in free-feeding rats: the role of glucose in meal initiation. *Brain Res Bull* 14:605-616.
- Canteras NS, Simerly RB, Swanson LW (1994) Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol* 348:41-79.
- Castel H, Diallo M, Chatenet D, Leprince J, Desrues L, Schouft MT, Fontaine M, Dubessy C, Lihmann I, Scalbert E, Malagon M, Vaudry H, Tonon MC, Gandolfo P (2006) Biochemical and functional characterization of high-affinity urotensin II receptors in rat cortical astrocytes. *J Neurochem* 99:582-595.
- Catlin MC, Kavanagh TJ, Costa LG (2000) Muscarinic receptor-induced calcium responses in astroglia. *Cytometry* 41:123-132.
- Cavallaro S, Korneyev A, Guidotti A, Costa E (1992) Diazepam-binding inhibitor (DBI)-processing products, acting at the mitochondrial DBI receptor, mediate adrenocorticotrophic hormone-induced steroidogenesis in rat adrenal gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10598-10602.
- Cha SH, Wolfgang M, Tokutake Y, Chohnan S, Lane MD (2008) Differential effects of central fructose and glucose on hypothalamic malonyl-CoA and food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16871-16875.
- Chakravarthy MV, Zhu Y, Lopez M, Yin L, Wozniak DF, Coleman T, Hu Z, Wolfgang M, Vidal-Puig A, Lane MD, Semenkovich CF (2007) Brain fatty acid synthase activates PPARalpha to maintain energy homeostasis. *J Clin Invest* 117:2539-2552.
- Challis BG, Coll AP, Yeo GS, Pinnock SB, Dickson SL, Thresher RR, Dixon J, Zahn D, Rochford JJ, White A, Oliver RL, Millington G, Aparicio SA, Colledge WH, Russ



- AP, Carlton MB, O'Rahilly S (2004) Mice lacking pro-opiomelanocortin are sensitive to high-fat feeding but respond normally to the acute anorectic effects of peptide-Y<sub>Y</sub>(3-36). *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4695-4700.
- Charles KJ, Deuchars J, Davies CH, Pangalos MN (2003) GABA B receptor subunit expression in glia. *Mol Cell Neurosci* 24:214-223.
- Chatton JY, Pellerin L, Magistretti PJ (2003) GABA uptake into astrocytes is not associated with significant metabolic cost: implications for brain imaging of inhibitory transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12456-12461.
- Chen MK, Guilarte TR (2008) Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacol Ther* 118:1-17.
- Chen Y, Rathbone MP, Hertz L (2001) Guanosine-induced increase in free cytosolic calcium concentration in mouse astrocytes in primary cultures: does it act on an A<sub>3</sub> adenosine receptor? *J Neurosci Res* 65:184-189.
- Chen ZW, Bergman T, Jornvall H, Bonetto V, Norberg A, Mutt V, Longone P, Costa E, Efendic S, Ostenson CG (1997) Full-length and N-terminally truncated chicken intestinal diazepam-binding inhibitor. Purification, structural characterization and influence on insulin release. *Regul Pept* 69:63-68.
- Cheunsuang O, Morris R (2005) Astrocytes in the arcuate nucleus and median eminence that take up a fluorescent dye from the circulation express leptin receptors and neuropeptide Y Y<sub>1</sub> receptors. *Glia* 52:228-233.
- Cheverud JM, Ehrich TH, Hrbek T, Kenney JP, Pletscher LS, Semenkovich CF (2004) Quantitative trait loci for obesity- and diabetes-related traits and their dietary responses to high-fat feeding in LGXSM recombinant inbred mouse strains. *Diabetes* 53:3328-3336.
- Cinone N, Hotje HD, Carotti A (2000) Development of a unique 3D interaction model of endogenous and synthetic peripheral benzodiazepine receptor ligands.[In Process Citation]. *J Comput Aided Mol Des* 14:753-768.
- Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP (1984) Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology* 115:427-429.
- Clausen T (1992) Potassium and sodium transport and pH regulation. *Can J Physiol Pharmacol* 70 Suppl:S219-222.
- Cohen-Kashi Malina K, Cooper I, Teichberg VI (2009) Closing the gap between the in-vivo and in-vitro blood-brain barrier tightness. *Brain Res* 1284:12-21.
- Cohen Z, Bouchelet I, Olivier A, Villemure JG, Ball R, Stanimirovic DB, Hamel E (1999) Multiple microvascular and astroglial 5-hydroxytryptamine receptor subtypes in human brain: molecular and pharmacologic characterization. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:908-917.
- Colombani AL, Carneiro L, Benani A, Galinier A, Jaillard T, Duparc T, Offer G, Lorsignol A, Magnan C, Casteilla L, Penicaud L, Leloup C (2009) Enhanced hypothalamic glucose sensing in obesity: alteration of redox signaling. *Diabetes* 58:2189-2197.
- Compère V, Li S, Leprince J, Tonon MC, Vaudry H, Pelletier G (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* 15:197-203.
- Compère V, Li S, Leprince J, Tonon MC, Vaudry H, Pelletier G (2004) In vivo action of a new octadecaneuropeptide (ODN) antagonist on gonadotropin-releasing hormone gene expression in the male rat brain. *Neuroscience* 125:411-415.
- Compère V, Li S, Leprince J, Tonon MC, Vaudry H, Pelletier G (2005) In vivo action of a new octadecaneuropeptide antagonist on neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone mRNA levels in rat. *Mol Brain Res* 141:156-160.
- Compère V, Lanfray D, Castel H, Morin F, Leprince J, Dureuil B, Vaudry H, Pelletier G, Tonon MC (2010) Acute food deprivation reduces expression of diazepam-binding

- inhibitor, the precursor of the anorexigenic octadecaneuropeptide ODN, in mouse glial cells. *J Mol Endocrinol* 44:295-299.
- Cosentino M, Marino F, Cattaneo S, Di Grazia L, Francioli C, Fietta AM, Lecchini S, Frigo G (2000) Diazepam-binding inhibitor-derived peptides induce intracellular calcium changes and modulate human neutrophil function. *J Leukoc Biol* 67:637-643.
- Costa E, Corda MG, Guidotti A (1983) On a brain polypeptide functioning as a putative effector for the recognition sites of benzodiazepine and beta-carboline derivatives. *Neuropharmacology* 22:1481-1492.
- Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, Seeley RJ (2006) Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* 312:927-930.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411:480-484.
- Currie PJ, Chang N, Luo S, Anderson GH (1995) Microdialysis as a tool to measure dietary and regional effects on the complete profile of extracellular amino acids in the hypothalamus of rats. *Life Sci* 57:1911-1923.
- D'Hulst C, Attack JR, Kooy RF (2009) The complexity of the GABAA receptor shapes unique pharmacological profiles. *Drug Discov Today* 14:866-875.
- Dallaporta M, Himmi T, Perrin J, Orsini JC (1999) Solitary tract nucleus sensitivity to moderate changes in glucose level. *Neuroreport* 10:2657-2660.
- Dallaporta M, Pecchi E, Pio J, Jean A, Horner KC, Troadec JD (2009) Expression of leptin receptor by glial cells of the nucleus tractus solitarius: possible involvement in energy homeostasis. *J Neuroendocrinol* 21:57-67.
- De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998) The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:322-327.
- De Mateos-Verchere JG, Leprince J, Tonon MC, Vaudry H, Costentin J (1998) The octadecaneuropeptide ODN induces anxiety in rodents: possible involvement of a shorter biologically active fragment. *Peptides* 19:841-848.
- De Mateos-Verchere JG, Leprince J, Tonon MC, Vaudry H, Costentin J (2001) The octadecaneuropeptide [diazepam-binding inhibitor (33-50)] exerts potent anorexigenic effects in rodents. *Eur J Pharmacol* 414:225-231.
- De Souza EB, Anholt RR, Murphy KM, Snyder SH, Kuhar MJ (1985) Peripheral-type benzodiazepine receptors in endocrine organs: autoradiographic localization in rat pituitary, adrenal, and testis. *Endocrinology* 116:567-573.
- De Stefanis P, Impagnatiello F, Berkovich A, Guidotti A (1995) Inhibitory effect of ODN, a naturally occurring processing product of diazepam binding inhibitor, on secretagogues-induced insulin secretion. *Regul Pept* 56:153-165.
- Debeir T, Gueugnon J, Vige X, Benavides J (1996) Transduction mechanisms involved in thrombin receptor-induced nerve growth factor secretion and cell division in primary cultures of astrocytes. *J Neurochem* 66:2320-2328.
- DeBernardi MA, Crowe RR, Mocchetti I, Shows TB, Eddy RL, Costa E (1988) Chromosomal localization of the human diazepam binding inhibitor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6561-6565.
- Deitmer JW, Rose CR (1996) pH regulation and proton signalling by glial cells. *Prog Neurobiol* 48:73-103.
- Desagher S, Cordier J, Glowinski J, Tence M (1997) Endothelin stimulates phospholipase D in striatal astrocytes. *J Neurochem* 68:78-87.
- Deschepper CF (1998) Peptide receptors on astrocytes. *Front Neuroendocrinol* 19:20-46.
- Di Scala-Guenot D, Mougnot D, Strosser MT (1994) Increase of intracellular calcium induced by oxytocin in hypothalamic cultured astrocytes. *Glia* 11:269-276.

- Diallo M, Jarry M, Desrues L, Castel H, Chatenet D, Leprince J, Vaudry H, Tonon MC, Gandolfo P (2008) [Orn5]URP acts as a pure antagonist of urotensinergic receptors in rat cortical astrocytes. *Peptides* 29:813-819.
- Do Rego JC, Orta MH, Leprince J, Tonon MC, Vaudry H, Costentin J (2007) Pharmacological characterization of the receptor mediating the anorexigenic action of the octadecaneuropeptide: evidence for an endozepinergic tone regulating food intake. *Neuropsychopharmacology* 32:1641-1648.
- Dong E, Matsumoto K, Tohda M, Watanabe H (1999) Involvement of diazepam binding inhibitor and its fragment octadecaneuropeptide in social isolation stress-induced decrease in pentobarbital sleep in mice. *Life Sci* 64:1779-1784.
- Dowell P, Hu Z, Lane MD (2005) Monitoring energy balance: metabolites of fatty acid synthesis as hypothalamic sensors. *Annu Rev Biochem* 74:515-534.
- Dringen R, Gebhardt R, Hamprecht B (1993) Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Res* 623:208-214.
- Duan X, Kang E, Liu CY, Ming GL, Song H (2008) Development of neural stem cell in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol* 18:108-115.
- Dunbar J, Lapanowski K, Barnes M, Rafols J (2005) Hypothalamic agouti-related protein immunoreactivity in food-restricted, obese, and insulin-treated animals: evidence for glia cell localization. *Exp Neurol* 191:184-192.
- Duparc C, Lefebvre H, Tonon M-C, Vaudry H, Kuhn J-M (2003) Characterization of endozepines in the human testicular tissue: effect of triakontatetrapeptide on testosterone secretion. *The Journal Of Clinical Endocrinology And Metabolism* 88:5521-5528.
- Elholm M, Bjerking G, Knudsen J, Kristiansen K, Mandrup S (1996) Regulatory elements in the promoter region of the rat gene encoding the acyl-CoA-binding protein. *Gene* 173:233-238.
- Elholm M, Garras A, Neve S, Tornehave D, Lund TB, Skorve J, Flatmark T, Kristiansen K, Berge RK (2000) Long-chain acyl-CoA esters and acyl-CoA binding protein are present in the nucleus of rat liver cells. *J Lipid Res* 41:538-545.
- Elhousseiny A, Cohen Z, Olivier A, Stanimirovic DB, Hamel E (1999) Functional acetylcholine muscarinic receptor subtypes in human brain microcirculation: identification and cellular localization. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:794-802.
- Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR, Kuhar MJ, Saper CB, Elmquist JK (1998) Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 21:1375-1385.
- Elmquist JK (2001) Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin. *Physiol Behav* 74:703-708.
- Eng LF, Ghimikar RS, Lee YL (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 25:1439-1451.
- Enkvist MO, Hamalainen H, Jansson CC, Kukkonen JP, Hautala R, Courtney MJ, Akerman KE (1996) Coupling of astroglial alpha 2-adrenoreceptors to second messenger pathways. *J Neurochem* 66:2394-2401.
- Eriksson PS, Hansson E, Ronnback L (1990) Delta and kappa opiate receptors in primary astroglial cultures from rat cerebral cortex. *Neurochem Res* 15:1123-1126.
- Faergeman NJ, Knudsen J (2002) Acyl-CoA binding protein is an essential protein in mammalian cell lines. *Biochem J* 368:679-682.
- Faergeman NJ, Sigurskjold BW, Kragelund BB, Andersen KV, Knudsen J (1996) Thermodynamics of ligand binding to acyl-coenzyme A binding protein studied by titration calorimetry. *Biochemistry* 35:14118-14126.
- Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hrubby VJ, Cone RD (1997) Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385:165-168.

- Fatatis A, Holtzclaw LA, Avidor R, Brenneman DE, Russell JT (1994) Vasoactive intestinal peptide increases intracellular calcium in astroglia: synergism with alpha-adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2036-2040.
- Feindt J, Becker I, Blomer U, Hugo HH, Mehdorn HM, Krisch B, Mentlein R (1995) Expression of somatostatin receptor subtypes in cultured astrocytes and gliomas. *J Neurochem* 65:1997-2005.
- Ferner H (1951) [The insular alpha and beta cells as the source of the antagonistic principles glucagon and insulin.]. *Mikroskopie* 6:1-8.
- Ferrarese C, Vaccarino F, Alho H, Mellstrom B, Costa E, Guidotti A (1987) Subcellular location and neuronal release of diazepam binding inhibitor. *J Neurochem* 48:1093-1102.
- Ferrarese C, Appollonio I, Frigo M, Piolti R, Tamma F, Frattola L (1989a) Distribution of a putative endogenous modulator of the GABAergic system in human brain. *Neurology* 39:443-445.
- Ferrarese C, Appollonio I, Frigo M, Gaini SM, Piolti R, Frattola L (1989b) Benzodiazepine receptors and diazepam-binding inhibitor in human cerebral tumors. *Ann Neurol* 26:564-568.
- Ferrarese C, Appollonio I, Frigo M, Meregalli S, Piolti R, Tamma F, Frattola L (1990) Cerebrospinal fluid levels of diazepam-binding inhibitor in neurodegenerative disorders with dementia. *Neurology* 40:632-635.
- Ferrero P, Guidotti A, Conti-Tronconi B, Costa E (1984) A brain octadecaneuropeptide generated by tryptic digestion of DBI (diazepam binding inhibitor) functions as a proconflict ligand of benzodiazepine recognition sites. *Neuropharmacology* 23:1359-1362.
- Ferrero P, Santi MR, Conti-Tronconi B, Costa E, Guidotti A (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* 83:827-831.
- Ferrero P, Benna P, Costa P, Tarenzi L, Baggio G, Bergamasco B, Bergamini L (1988) Diazepam binding inhibitor-like immunoreactivity (DBI-LI) in human CSF. Correlations with neurological disorders. *J Neurol Sci* 87:327-349.
- Fisher E, Nitz I, Gieger C, Grallert H, Gohlke H, Lindner I, Dahm S, Boeing H, Burwinkel B, Rathmann W, Wichmann HE, Schrezenmeir J, Illig T, Doring F (2007) Association of acyl-CoA-binding protein (ACBP) single nucleotide polymorphisms and type 2 diabetes in two German study populations. *Mol Nutr Food Res* 51:178-184.
- Finkbeiner SM (1993) Glial calcium. *Glia* 9:83-104.
- Fioramonti X, Lorsignol A, Taupignon A, Penicaud L (2004) A new ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel-independent mechanism is involved in glucose-excited neurons of mouse arcuate nucleus. *Diabetes* 53:2767-2775.
- Fogarty DJ, Sanchez-Gomez MV, Matute C (2002) Multiple angiotensin receptor subtypes in normal and tumor astrocytes in vitro. *Glia* 39:304-313.
- Fraser DD, Mudrick-Donnon LA, MacVicar BA (1994) Astrocytic GABA receptors. *Glia* 11:83-93.
- Fraser DD, Duffy S, Angelides KJ, Perez-Velazquez JL, Kettenmann H, MacVicar BA (1995) GABAA/benzodiazepine receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 15:2720-2732.
- Friedman JM, Halaas JL (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395:763-770.
- Fukui H, Inagaki N, Ito S, Kubo A, Kondoh H, Yamatodani A, Wada H (1991) Histamine H1-receptors on astrocytes in primary cultures: a possible target for histaminergic neurones. *Agents Actions Suppl* 33:161-180.
- Fumagalli M, Brambilla R, D'Ambrosi N, Volonte C, Matteoli M, Verderio C, Abbracchio MP (2003) Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors. *Glia* 43:218-203.

- Funahashi H, Yamada S, Kageyama H, Takenoya F, Guan JL, Shioda S (2003) Co-existence of leptin- and orexin-receptors in feeding-regulating neurons in the hypothalamic arcuate nucleus-a triple labeling study. *Peptides* 24:687-694.
- Galiegue S, Jbilo O, Combes T, Bribes E, Carayon P, Le Fur G, Casellas P (1999) Cloning and characterization of PRAX-1. A new protein that specifically interacts with the peripheral benzodiazepine receptor. *J Biol Chem* 274:2938-2952.
- Gallager DW, Mallorga P, Oertel W, Henneberry R, Tallman J (1981) [3H]Diazepam binding in mammalian central nervous system: a pharmacological characterization. *J Neurosci* 1:218-225.
- Gallagher CJ, Salter MW (2003) Differential properties of astrocyte calcium waves mediated by P2Y1 and P2Y2 receptors. *J Neurosci* 23:6728-6739.
- Gandolfo P, Patte C, Leprince J, Thoumas JL, Vaudry H, Tonon MC (1997) The stimulatory effect of the octadecaneuropeptide (ODN) on cytosolic Ca<sup>2+</sup> in rat astrocytes is not mediated through classical benzodiazepine receptors. *Eur J Pharmacol* 322:275-281.
- Gandolfo P, Patte C, Thoumas JL, Leprince J, Vaudry H, Tonon MC (1999) The endozeptine ODN stimulates [3H]thymidine incorporation in cultured rat astrocytes. *Neuropharmacology* 38:725-732.
- Gandolfo P, Patte C, Leprince J, Do-Rego JL, Mensah-Nyagan AG, Vaudry H, Tonon MC (2000) The triakontatetrapeptide (TTN) stimulates thymidine incorporation in rat astrocytes through peripheral-type benzodiazepine receptors. *J Neurochem* 75:701-707.
- Gandolfo P, Louiset E, Patte C, Leprince J, Masmoudi O, Malagon M, Gracia-Navarro F, Vaudry H, Tonon MC (2001) The triakontatetrapeptide TTN increases [CA<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in rat astrocytes through activation of peripheral-type benzodiazepine receptors. *Glia* 35:90-100.
- Gao S, Lane MD (2003) Effect of the anorectic fatty acid synthase inhibitor C75 on neuronal activity in the hypothalamus and brainstem. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5628-5633.
- Gao S, Kinzig KP, Aja S, Scott KA, Keung W, Kelly S, Strynadka K, Chohnan S, Smith WW, Tamashiro KL, Ladenheim EE, Ronnett GV, Tu Y, Birnbaum MJ, Lopaschuk GD, Moran TH (2007) Leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase to inhibit food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17358-17363.
- Garcia de Mateos-Verchere J, Leprince J, Tonon M, Vaudry H, Costentin J (2001) The octadecaneuropeptide [diazepam-binding inhibitor (33-50)] exerts potent anorexigenic effects in rodents. *Eur J Pharmacol* 414:225-231.
- Garcia MA, Millan C, Balmaceda-Aguilera C, Castro T, Pastor P, Montecinos H, Reinicke K, Zuniga F, Vera JC, Onate SA, Nualart F (2003) Hypothalamic ependymal-glia cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *J Neurochem* 86:709-724.
- Garcia MC, Kim KY, Hough C, Kim HY (1997) Effects of chronic ethanol on the mobilization of arachidonate and docosahexaenoate stimulated by the type 2A serotonin receptor agonist (+/-)-2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine hydrochloride in C6 glioma cells. *Alcohol Clin Exp Res* 21:1465-1470.
- Garnier M, Boujrad N, Ogwuegbu SO, Hudson JR, Jr., Papadopoulos V (1994a) The polypeptide diazepam-binding inhibitor and a higher affinity mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor sustain constitutive steroidogenesis in the R2C Leydig tumor cell line. *J Biol Chem* 269:22105-22112.
- Garnier M, Dimchev AB, Boujrad N, Price JM, Musto NA, Papadopoulos V (1994b) In vitro reconstitution of a functional peripheral-type benzodiazepine receptor from mouse Leydig tumor cells. *Mol Pharmacol* 45:201-211.
- Garnier M, Boujrad N, Oke BO, Brown AS, Riond J, Ferrara P, Shoyab M, Suarez-Quian CA, Papadopoulos V (1993) Diazepam binding inhibitor is a paracrine/autocrine regulator of Leydig cell proliferation and steroidogenesis: action via peripheral-type benzodiazepine receptor and independent mechanisms. *Endocrinology* 132:444-458.

- Gebke E, Muller AR, Jurzak M, Gerstberger R (1998) Angiotensin II-induced calcium signalling in neurons and astrocytes of rat circumventricular organs. *Neuroscience* 85:509-520.
- Gerald C, Walker MW, Criscione L, Gustafson EL, Batzl-Hartmann C, Smith KE, Vaysse P, Durkin MM, Laz TM, Linemeyer DL, Schaffhauser AO, Whitebread S, Hofbauer KG, Taber RI, Branchek TA, Weinshank RL (1996) A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake. *Nature* 382:168-171.
- Gersuk VH, Rose TM, Todaro GJ (1995) Molecular cloning and chromosomal localization of a pseudogene related to the human acyl-CoA binding protein/diazepam binding inhibitor. *Genomics* 25:469-476.
- Ghandour MS, Langley OK, Labourdette G, Vincendon G, Gombos G (1981) Specific and artefactual cellular localizations of S 100 protein: an astrocyte marker in rat cerebellum. *Dev Neurosci* 4:66-78.
- Gimpl G, Kirchhoff F, Lang RE, Kettenmann H (1993) Identification of neuropeptide Y receptors in cultured astrocytes from neonatal rat brain. *J Neurosci Res* 34:198-205.
- Giraud SQ, Billington CJ, Levine AS (1998) Feeding effects of hypothalamic injection of melanocortin 4 receptor ligands. *Brain Res* 809:302-306.
- Givalois L, Li S, Pelletier G (1998) Role of glucocorticoids in the modulation of corticotropin-releasing hormone mRNA level by the endogenous benzodiazepine receptor ligand octadecaneuropeptide in rat brain. *Neuroendocrinology* 68:98-104.
- Graham A, Court JA, Martin-Ruiz CM, Jaros E, Perry R, Volsen SG, Bose S, Evans N, Ince P, Kuryatov A, Lindstrom J, Gotti C, Perry EK (2002) Immunohistochemical localisation of nicotinic acetylcholine receptor subunits in human cerebellum. *Neuroscience* 113:493-507.
- Gray PW (1987) Molecular biology of diazepam binding inhibitor. *Neuropharmacology* 26:863-865.
- Gray PW, Glaister D, Seeburg PH, Guidotti A, Costa E (1986) Cloning and expression of cDNA for human diazepam binding inhibitor, a natural ligand of an allosteric regulatory site of the gamma-aminobutyric acid type A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:7547-7551.
- Grill HJ, Ginsberg AB, Seeley RJ, Kaplan JM (1998) Brainstem application of melanocortin receptor ligands produces long-lasting effects on feeding and body weight. *J Neurosci* 18:10128-10135.
- Grimaldi M, Florio T, Schettini G (1997) Somatostatin inhibits interleukin 6 release from rat cortical type I astrocytes via the inhibition of adenylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* 235:242-248.
- Grunberger G, Lowe WL, Jr., McElduff A, Glick RP (1986) Insulin receptor of human cerebral gliomas. Structure and function. *J Clin Invest* 77:997-1005.
- Guidotti A, Forchetti CM, Corda MG, Konkel D, Bennett CD, 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.
- Guidotti A, Alho H, Berkovich A, Cox DH, Ferrarese C, Slobodyansky E, Santi MR, Wambebe C (1989) DBI processing : allosteric modulation at different GABA/benzodiazepine receptor subtypes. In: *Allosteric Modulation of Amino Acid Receptors : Therapeutic Implications* (Barnard EA, Costa E, eds), pp 109-123. New York: Raven Press, Ltd.
- Guillod-Maximin E, Lorsignol A, Alquier T, Penicaud L (2004) Acute intracarotid glucose injection towards the brain induces specific c-fos activation in hypothalamic nuclei: involvement of astrocytes in cerebral glucose-sensing in rats. *J Neuroendocrinol* 16:464-471.
- Gustavsson L, Lundqvist C, Hansson E (1993) Receptor-mediated phospholipase D activity in primary astroglial cultures. *Glia* 8:249-255.

- Haas CA, Reddington M, Kreutzberg GW (1991) Calcitonin Gene-related Peptide Stimulates the Induction of c-fos Gene Expression in Rat Astrocyte Cultures. *Eur J Neurosci* 3:708-712.
- Hadingham KL, Garrett EM, Wafford KA, Bain C, Heavens RP, Sirinathsinghji DJ, Whiting PJ (1996) Cloning of cDNAs encoding the human gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha 6 subunit and characterization of the pharmacology of alpha 6-containing receptors. *Mol Pharmacol* 49:253-259.
- Hagan MM, Rushing PA, Pritchard LM, Schwartz MW, Strack AM, Van Der Ploeg LH, Woods SC, Seeley RJ (2000) Long-term orexigenic effects of AgRP-(83---132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R47-52.
- Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW (1998) Coexpression of *Agrp* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* 1:271-272.
- Hakansson ML, Brown H, Ghilardi N, Skoda RC, Meister B (1998) Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J Neurosci* 18:559-572.
- Hanada R, Nakazato M, Matsukura S, Murakami N, Yoshimatsu H, Sakata T (2000) Differential regulation of melanin-concentrating hormone and orexin genes in the agouti-related protein/melanocortin-4 receptor system. *Biochem Biophys Res Commun* 268:88-91.
- Hardwick M, Fertikh D, Culty M, Li H, Vidic B, Papadopoulos V (1999) Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in human breast cancer: correlation of breast cancer cell aggressive phenotype with PBR expression, nuclear localization, and PBR-mediated cell proliferation and nuclear transport of cholesterol. *Cancer Res* 59:831-842.
- Harper AE, Peters JC (1989) Protein intake, brain amino acid and serotonin concentrations and protein self-selection. *J Nutr* 119:677-689.
- Hassinger TD, Atkinson PB, Strecker GJ, Whalen LR, Dudek FE, Kossel AH, Kater SB (1995) Evidence for glutamate-mediated activation of hippocampal neurons by glial calcium waves. *J Neurobiol* 28:159-170.
- Hawrylak N, Fleming JC, Salm AK (1998) Dehydration and rehydration selectively and reversibly alter glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the rat supraoptic nucleus and subjacent glial limitans. *Glia* 22:260-271.
- Haynes AC, Jackson B, Overend P, Buckingham RE, Wilson S, Tadayyon M, Arch JR (1999) Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides* 20:1099-1105.
- He W, Lam TK, Obici S, Rossetti L (2006) Molecular disruption of hypothalamic nutrient sensing induces obesity. *Nat Neurosci* 9:227-233.
- He Y, Hakvoort TB, Vermeulen JL, Labruyere WT, De Waart DR, Van Der Hel WS, Ruijter JM, Uylings HB, Lamers WH (2010) Glutamine synthetase deficiency in murine astrocytes results in neonatal death. *Glia* 58:741-754.
- Helledie T, Grontved L, Jensen SS, Kiilerich P, Rietveld L, Albrektsen T, Boysen MS, Nohr J, Larsen LK, Fleckner J, Stunnenberg HG, Kristiansen K, Mandrup S (2002) The gene encoding the Acyl-CoA-binding protein is activated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma through an intronic response element functionally conserved between humans and rodents. *J Biol Chem* 277:26821-26830.
- Henneberger C, Papouin T, Olier SH, Rusakov DA (2010) Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 463:232-236.
- Hervieu G (2003) Melanin-concentrating hormone functions in the nervous system: food intake and stress. *Expert Opin Ther Targets* 7:495-511.
- Herzig KH, Wilgus C, Schon I, Tatemoto K, Folsch UR (1998) Regulation of the action of the novel cholecystokinin-releasing peptide diazepam binding inhibitor by inhibitory hormones and taurocholate. *Regul Pept* 74:193-198.

- Herzig KH, Schon I, Tatemoto K, Ohe Y, Li Y, Folsch UR, Owyang C (1996) Diazepam binding inhibitor is a potent cholecystokinin-releasing peptide in the intestine [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1996 Nov 26;93(24):14214]. Proc Natl Acad Sci U S A 93:7927-7932.
- Hevers W, Luddens H (1998) The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. Mol Neurobiol 18:35-86.
- Hirst WD, Cheung NY, Rattray M, Price GW, Wilkin GP (1998) Cultured astrocytes express messenger RNA for multiple serotonin receptor subtypes, without functional coupling of 5-HT1 receptor subtypes to adenylyl cyclase. Brain Res Mol Brain Res 61:90-99.
- Hosli E, Hosli L (1994) Binding of cholecystokinin, bombesin and muscarine to neurons and astrocytes in explant cultures of rat central nervous system: autoradiographic and immunohistochemical studies. Neuroscience 61:63-72.
- Hosli E, Jurasin K, Ruhl W, Luthy R, Hosli L (2001) Colocalization of androgen, estrogen and cholinergic receptors on cultured astrocytes of rat central nervous system. Int J Dev Neurosci 19:11-19.
- Hsuchou H, Pan W, Barnes MJ, Kastin AJ (2009a) Leptin receptor mRNA in rat brain astrocytes. Peptides 30:2275-2280.
- Hsuchou H, He Y, Kastin AJ, Tu H, Markadakis EN, Rogers RC, Fossier PB, Pan W (2009b) Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus. Brain 132:889-902.
- Hu Y, Bloomquist BT, Cornfield LJ, DeCarr LB, Flores-Riveros JR, Friedman L, Jiang P, Lewis-Higgins L, Sadlowski Y, Schaefer J, Velazquez N, McCaleb ML (1996) Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor associated with feeding behavior. J Biol Chem 271:26315-26319.
- Hu Z, Dai Y, Prentki M, Chohnan S, Lane MD (2005) A role for hypothalamic malonyl-CoA in the control of food intake. J Biol Chem 280:39681-39683.
- Ikeda Y, Ueno A, Naraba H, Matsuki N, Oh-Ishi S (2000) Intracellular Ca<sup>2+</sup> increase in neuro-2A cells and rat astrocytes following stimulation of bradykinin B2 receptor. Jpn J Pharmacol 84:140-145.
- Inagaki N, Wada H (1994) Histamine and prostanoid receptors on glial cells. Glia 11:102-109.
- Inazu M, Takeda H, Matsumiya T (2003) Expression and functional characterization of the extraneuronal monoamine transporter in normal human astrocytes. J Neurochem 84:43-52.
- Inhoff T, Stengel A, Peter L, Goebel M, Tache Y, Bannert N, Wiedenmann B, Klapp BF, Monnikes H, Kobelt P (2010) Novel insight in distribution of nesfatin-1 and phospho-mTOR in the arcuate nucleus of the hypothalamus of rats. Peptides 31:257-262.
- Itzhak Y, Baker L, Norenberg MD (1993) Characterization of the peripheral-type benzodiazepine receptors in cultured astrocytes: evidence for multiplicity. Glia 9:211-218.
- Jeftinija SD, Jeftinija KV, Stefanovic G, Liu F (1996) Neuroligand-evoked calcium-dependent release of excitatory amino acids from cultured astrocytes. J Neurochem 66:676-684.
- Jiang G, Zhang BB (2003) Glucagon and regulation of glucose metabolism. Am J Physiol Endocrinol Metab 284:E671-678.
- Joseph-Liauzun E, Delmas P, Shire D, Ferrara P (1998) Topological analysis of the peripheral benzodiazepine receptor in yeast mitochondrial membranes supports a five-transmembrane structure. J Biol Chem 273:2146-2152.
- Kacem K, Lacombe P, Seylaz J, Bonvento G (1998) Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. Glia 23:1-10.



- Kah O, Trudeau VL, Sloley BD, Chang JP, Dubourg P, Yu KL, Peter RE (1992) Influence of GABA on gonadotrophin release in the goldfish. *Neuroendocrinology* 55:396-404.
- Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS (1999) Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrine Reviews* 20:68-100.
- Kanatani A, Hata M, Mashiko S, Ishihara A, Okamoto O, Haga Y, Ohe T, Kanno T, Murai N, Ishii Y, Fukuroda T, Fukami T, Ihara M (2001) A typical Y1 receptor regulates feeding behaviors: effects of a potent and selective Y1 antagonist, J-115814. *Mol Pharmacol* 59:501-505.
- Kang L, Routh VH, Kuzhikandathil EV, Gaspers LD, Levin BE (2004) Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons. *Diabetes* 53:549-559.
- Kang L, Dunn-Meynell AA, Routh VH, Gaspers LD, Nagata Yh, Nishimura T, Eiki J, Zhang BB, Levin BE (2006) Glucokinase is a critical regulator of ventromedial hypothalamic neuronal glucosensing. *Diabetes* 55:412-420.
- Kash TL, Dizon MJ, Trudell JR, Harrison NL (2004) Charged residues in the beta2 subunit involved in GABAA receptor activation. *J Biol Chem* 279:4887-4893.
- Katayama Y, Becker DP, Tamura T, Ikezaki K (1990) Early cellular swelling in experimental traumatic brain injury: a phenomenon mediated by excitatory amino acids. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 51:271-273.
- Katsura K, Kristian T, Nair R, Siesjo BK (1994) Regulation of intra- and extracellular pH in the rat brain in acute hypercapnia: a re-appraisal. *Brain Res* 651:47-56.
- Kavaliers M, Hirst M (1986) An octadecaneuropeptide (ODN) derived from diazepam binding inhibitor increases aggressive interactions in mice. *Brain Res* 383:343-349.
- Kennedy GC (1953) The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 140:578-596.
- Khan ZU, Gutierrez A, De Blas AL (1996) The alpha 1 and alpha 6 subunits can coexist in the same cerebellar GABAA receptor maintaining their individual benzodiazepine-binding specificities. *J Neurochem* 66:685-691.
- Kirchgessner AL (2002) Orexins in the brain-gut axis. *Endocr Rev* 23:1-15.
- Kirischuk S, Tuschick S, Verkhatsky A, Kettenmann H (1996) Calcium signalling in mouse Bergmann glial cells mediated by alpha1-adrenoreceptors and H1 histamine receptors. *Eur J Neurosci* 8:1198-1208.
- Knudsen J (1991) Acyl-CoA-binding and transport, an alternative function for diazepam binding inhibitor (DBI), which is identical with acyl-CoA-binding protein. *Neuropharmacology* 30:1405-1410.
- Knudsen J, Hojrup P, Hansen HO, Hansen HF, Roepstorff P (1989) Acyl-CoA-binding protein in the rat. Purification, binding characteristics, tissue concentrations and amino acid sequence. *Biochem J* 262:513-519.
- Knudsen J, Mandrup S, Rasmussen JT, Andreasen PH, Poulsen F, Kristiansen K (1993) The function of acyl-CoA-binding protein (ACBP)/diazepam binding inhibitor (DBI). *Mol Cell Biochem* 123:129-138.
- Kolmer M, Rovio A, Alho H (1995) The characterization of two diazepam binding inhibitor (DBI) transcripts in humans. *Biochem J* 306 ( Pt 2):327-330.
- Kolmer M, Alho H, Costa E, Pani L (1993) Cloning and tissue-specific functional characterization of the promoter of the rat diazepam binding inhibitor, a peptide with multiple biological actions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8439-8443.
- Kolmer M, Roos C, Tirronen M, Myohanen S, Alho H (1994) Tissue-specific expression of the diazepam-binding inhibitor in *Drosophila melanogaster*: cloning, structure, and localization of the gene. *Mol Cell Biol* 14:6983-6995.
- Kondou H, Inagaki N, Fukui H (1994) Formation of inositol phosphates mediated by M3 muscarinic receptors in type-1 and type-2 astrocytes from neonatal rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 180:131-134.

- Kondou H, Inagaki N, Fukui H, Koyama Y, Kanamura A, Wada H (1991) Histamine-induced inositol phosphate accumulation in type-2 astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 177:734-738.
- Kotter K, Klein J (1999) Adrenergic modulation of astroglial phospholipase D activity and cell proliferation. *Brain Res* 830:138-145.
- Kovacs EG, Szalay F, Racz B, Halasy K (2007) Chronic fasting-induced changes of neuropeptide Y immunoreactivity in the lateral septum of intact and ovariectomized female rats. *Brain Res* 1153:103-110.
- Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ, Hastrup S (1998) Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393:72-76.
- Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A (1998) Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* 19:155-157.
- Krueger KE, Papadopoulos V (1990) Peripheral-type benzodiazepine receptors mediate translocation of cholesterol from outer to inner mitochondrial membranes in adrenocortical cells. *J Biol Chem* 265:15015-15022.
- Kubo A, Fukui H, Inagaki N, Kanamura A, Wada H (1991) Histamine-induced cyclic AMP accumulation in type-1 and type-2 astrocytes in primary culture. *Eur J Pharmacol* 208:249-253.
- Kuhlmann AC, Guilarte TR (2000) Cellular and subcellular localization of peripheral benzodiazepine receptors after trimethyltin neurotoxicity. *J Neurochem* 74:1694-1704.
- Kum W, Zhu SQ, Ho SK, Young JD, Cockram CS (1992) Effect of insulin on glucose and glycogen metabolism and leucine incorporation into protein in cultured mouse astrocytes. *Glia* 6:264-268.
- Kumar MV, Shimokawa T, Nagy TR, Lane MD (2002) Differential effects of a centrally acting fatty acid synthase inhibitor in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1921-1925.
- Kurata K, Fujimoto K, Sakata T, Etou H, Fukagawa K (1986) D-glucose suppression of eating after intra-third ventricle infusion in rat. *Physiol Behav* 37:615-620.
- Kuriyama K, Hirouchi M, Nakayasu H (1993) Structure and function of cerebral GABAA and GABAB receptors. *Neurosci Res* 17:91-99.
- Kurumaji A, Toru M (1996) Postnatal development of peripheral-type benzodiazepine receptors in rat brain and peripheral tissues. *Brain Res Dev Brain Res* 97:148-151.
- Lacapère J-J, Papadopoulos V (2003) Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids* 68:569-585.
- Lacor P, Benavides J, Ferzaz B (1996) Enhanced expression of the peripheral benzodiazepine receptor (PBR) and its endogenous ligand octadecaneuropeptide (ODN) in the regenerating adult rat sciatic nerve. *Neurosci Lett* 220:61-65.
- Lacor P, Gandolfo P, Tonon MC, Brault E, Dalibert I, Schumacher M, Benavides J, Ferzaz B (1999) Regulation of the expression of peripheral benzodiazepine receptors and their endogenous ligands during rat sciatic nerve degeneration and regeneration: a role for PBR in neurosteroidogenesis. *Brain Res* 815:70-80.
- Lam TK, Gutierrez-Juarez R, Pocai A, Rossetti L (2005) Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. *Science* 309:943-947.
- Lamacz M, Tonon MC, Smih-Rouet F, Patte C, Gasque P, Fontaine M, Vaudry H (1996) The endogenous benzodiazepine receptor ligand ODN increases cytosolic calcium in cultured rat astrocytes. *Mol Brain Res* 37:290-296.
- Lambert PD, Couceyro PR, McGirr KM, Dall Vechia SE, Smith Y, Kuhar MJ (1998) CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse* 29:293-298.

- Landgraf R, Malkinson T, Horn T, Veale WL, Lederis K, Pittman QJ (1990) Release of vasopressin and oxytocin by paraventricular stimulation in rats. *Am J Physiol* 258:R155-159.
- Lane MD, Hu Z, Cha SH, Dai Y, Wolfgang M, Sidhaye A (2005) Role of malonyl-CoA in the hypothalamic control of food intake and energy expenditure. *Biochem Soc Trans* 33:1063-1067.
- Langle SL, Poulain DA, Theodosis DT (2002) Neuronal-glia remodeling: a structural basis for neuronal-glia interactions in the adult hypothalamus. *J Physiol Paris* 96:169-175.
- Laron Z (2009) Insulin and the brain. *Arch Physiol Biochem* 115:112-116.
- Lauzurica N, Garcia-Garcia L, Pinto S, Fuentes JA, Delgado M (2010) Changes in NPY and POMC, but not serotonin transporter, following a restricted feeding/repletion protocol in rats. *Brain Res* 1313:103-112.
- Legradi G, Lechan RM (1998) The arcuate nucleus is the major source for neuropeptide Y-innervation of thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 139:3262-3270.
- Leloup C, Orosco M, Serradas P, Nicolaidis S, Penicaud L (1998) Specific inhibition of GLUT2 in arcuate nucleus by antisense oligonucleotides suppresses nervous control of insulin secretion. *Brain Res Mol Brain Res* 57:275-280.
- Leloup C, Arluison M, Lepetit N, Cartier N, Marfaing-Jallat P, Ferre P, Penicaud L (1994) Glucose transporter 2 (GLUT 2): expression in specific brain nuclei. *Brain Res* 638:221-226.
- Leprince J, Gandolfo P, Thoumas JL, Patte C, Fauchere JL, Vaudry H, Tonon MC (1998) Structure-activity relationships of a series of analogues of the octadecaneuropeptide ODN on calcium mobilization in rat astrocytes. *J Med Chem* 41:4433-4438.
- Leprince J, Oulyadi H, Vaudry D, Masmoudi O, Gandolfo P, Patte C, Costentin J, Fauchere JL, Davoust D, Vaudry H, Tonon MC (2001) Synthesis, conformational analysis and biological activity of cyclic analogs of the octadecaneuropeptide ODN. Design of a potent endozepine antagonist. *Eur J Biochem* 268:6045-6057.
- Lesouhaitier O, Feuilloley M, Vaudry H (1998) Effect of the triakontatetrapeptide (TTN) on corticosteroid secretion by the frog adrenal gland. *J Mol Endocrinol* 20:45-53.
- Lesouhaitier O, Kodjo MK, Cartier F, Contesse V, Yon L, Delarue C, Vaudry H (2000) The effect of the endozepine triakontatetrapeptide on corticosteroid secretion by the frog adrenal gland is mediated by activation of adenylyl cyclase and calcium influx through T-type calcium channels. *Endocrinology* 141:197-207.
- Levi G, Wilkin GP, Ciotti MT, Johnstone S (1983) Enrichment of differentiated, stellate astrocytes in cerebellar interneuron cultures as studied by GFAP immunofluorescence and autoradiographic uptake patterns with [<sup>3</sup>H]D-aspartate and [<sup>3</sup>H]GABA. *Brain Res* 312:227-241.
- Levin BE (2002) Glucosensing neurons: the metabolic sensors of the brain? *Diabetes Nutr Metab* 15:274-280; discussion 281.
- Levin BE, Sullivan AC (1987a) Glucose, insulin and sympathoadrenal activation. *J Auton Nerv Syst* 20:233-242.
- Levin BE, Sullivan AC (1987b) Glucose-induced norepinephrine levels and obesity resistance. *Am J Physiol* 253:R475-481.
- Levison SW, Goldman JE (1997) Multipotential and lineage restricted precursors coexist in the mammalian perinatal subventricular zone. *J Neurosci Res* 48:83-94.
- Li H, Degenhardt B, Tobin D, Yao ZX, Tasken K, Papadopoulos V (2001) Identification, localization, and function in steroidogenesis of PAP7: a peripheral-type benzodiazepine receptor- and PKA (RI $\alpha$ )-associated protein. *Mol Endocrinol* 15:2211-2228.

- Li S, Pelletier G (1995) Inhibitory effect of the potential endogenous benzodiazepine receptor ligand, octadecaneuropeptide (ODN), on gonadotropin-releasing hormone gene expression in the male rat brain. *Neuroreport* 6:1354-1356.
- Li Y, Hao Y, Owyang C (2000) Diazepam-binding inhibitor mediates feedback regulation of pancreatic secretion and postprandial release of cholecystokinin. *J Clin Invest* 105:351-359.
- Lihmann I, Plaquevent JC, Tostivint H, Rajmakers R, Tonon MC, Conlon JM, Vaudry H (1994) Frog diazepam-binding inhibitor: peptide sequence, cDNA cloning, and expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6899-6903.
- Lin WW, Chuang DM (1992) Regulation of bradykinin-induced phosphoinositide turnover in cultured cerebellar astrocytes: possible role of protein kinase C. *Neurochem Int* 21:573-579.
- Liu J, Li H, Papadopoulos V (2003) PAP7, a PBR/PKA-R1alpha-associated protein: a new element in the relay of the hormonal induction of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85:275-283.
- Liu QY, Schaffner A, Chang YH, Maric D, Barker JL (1998) Amyloid beta-protein impairs astrocyte-mediated differentiation of hippocampal neurons. *Neuroreport* 9:3059-3063.
- Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, Townsend CA, Ronnett GV, Lane MD, Kuhajda FP (2000) Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors [In Process Citation]. *Science* 288:2379-2381.
- Loo DT, Althoen MC, Cotman CW (1995) Differentiation of serum-free mouse embryo cells into astrocytes is accompanied by induction of glutamine synthetase activity. *J Neurosci Res* 42:184-191.
- Lopez M, Lelliott CJ, Tovar S, Kimber W, Gallego R, Virtue S, Blount M, Vazquez MJ, Finer N, Powles TJ, O'Rahilly S, Saha AK, Dieguez C, Vidal-Puig AJ (2006) Tamoxifen-induced anorexia is associated with fatty acid synthase inhibition in the ventromedial nucleus of the hypothalamus and accumulation of malonyl-CoA. *Diabetes* 55:1327-1336.
- Louis-Sylvestre J, Le Magnen J (1980) Fall in blood glucose level precedes meal onset in free-feeding rats. *Neurosci Biobehav Rev* 4 Suppl 1:13-15.
- Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luther M, Chen W, Woychik RP, Wilkison WO, et al. (1994) Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 371:799-802.
- Lyons WE, Mamounas LA, Ricaurte GA, Coppola V, Reid SW, Bora SH, Wihler C, Koliatsos VE, Tessarollo L (1999) Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:15239-15244.
- Maejima Y, Sedbazar U, Suyama S, Kohno D, Onaka T, Takano E, Yoshida N, Koike M, Uchiyama Y, Fujiwara K, Yashiro T, Horvath TL, Dietrich MO, Tanaka S, Dezaki K, Oh IS, Hashimoto K, Shimizu H, Nakata M, Mori M, Yada T (2009) Nesfatin-1-regulated oxytocinergic signaling in the paraventricular nucleus causes anorexia through a leptin-independent melanocortin pathway. *Cell Metab* 10:355-365.
- McGarry JD, Brown NF (1997) The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 244:1-14.
- Malagon M, Vaudry H, Van Strien F, Pelletier G, Gracia-Navarro F, Tonon MC (1993) Ontogeny of diazepam-binding inhibitor-related peptides (endozepines) in the rat brain. *Neuroscience* 57:777-786.
- Manabe Y, Toyoda T, Kuroda K, Imaizumi M, Yamamoto T, Fushiki T (2001) Effect of diazepam binding inhibitor (DBI) on the fluid intake, preference and the taste reactivity in mice. *Behav Brain Res* 126:197-204.
- Mandrup S, Lane MD (1997) Regulating adipogenesis. *J Biol Chem* 272:5367-5370.

- Mandrup S, Hummel R, Ravn S, Jensen G, Andreasen PH, Gregersen N, Knudsen J, Kristiansen K (1992) Acyl-CoA-binding protein/diazepam-binding inhibitor gene and pseudogenes. A typical housekeeping gene family. *J Mol Biol* 228:1011-1022.
- Mandrup S, Sorensen RV, Helledie T, Nohr J, Baldursson T, Gram C, Knudsen J, Kristiansen K (1998) Inhibition of 3T3-L1 adipocyte differentiation by expression of acyl-CoA-binding protein antisense RNA. *J Biol Chem* 273:23897-23903.
- Marin P, Delumeau JC, Tence M, Cordier J, Glowinski J, Premont J (1991a) Somatostatin potentiates the alpha 1-adrenergic activation of phospholipase C in striatal astrocytes through a mechanism involving arachidonic acid and glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:9016-9020.
- Marin P, Delumeau JC, Durieu-Trautmann O, Le Nguyen D, Premont J, Strosberg AD, Couraud PO (1991b) Are several G proteins involved in the different effects of endothelin-1 in mouse striatal astrocytes? *J Neurochem* 56:1270-1275.
- Marino F, Cosentino M, Fietta AM, Ferrari M, Cattaneo S, Frigo G, Lecchini S, Frigo GM (2003) Interleukin-8 production induced by the endozepine triakontatetrapeptide in human neutrophils: role of calcium and pharmacological investigation of signal transduction pathways. *Cell Signal* 15:511-517.
- Marsh DJ, Miura GI, Yagaloff KA, Schwartz MW, Barsh GS, Palmiter RD (1999) Effects of neuropeptide Y deficiency on hypothalamic agouti-related protein expression and responsiveness to melanocortin analogues. *Brain Res* 848:66-77.
- Martin JL, Feinstein DL, Yu N, Sorg O, Rossier C, Magistretti PJ (1992) VIP receptor subtypes in mouse cerebral cortex: evidence for a differential localization in astrocytes, microvessels and synaptosomal membranes. *Brain Res* 587:1-12.
- Marty N, Dallaporta M, Foretz M, Emery M, Tarussio D, Bady I, Binnert C, Beermann F, Thorens B (2005) Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors. *J Clin Invest* 115:3545-3553.
- Martynska L, Wolinska-Witort E, Chmielowska M, Bik W, Baranowska B (2005) The physiological role of orexins. *Neuro Endocrinol Lett* 26:289-292.
- Masmoudi-Kouki O, Gandolfo P, Leprince J, Vaudry D, Pelletier G, Fournier A, Vaudry H, Tonon MC (2006) PACAP stimulates biosynthesis and release of endozepines from rat astrocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1070:411-416.
- Masmoudi O, Gandolfo P, Tokay T, Leprince J, Ravni A, Vaudry H, Tonon MC (2005) Somatostatin down-regulates the expression and release of endozepines from cultured rat astrocytes via distinct receptor subtypes. *J Neurochem* 94:561-571.
- Masmoudi O, Gandolfo P, Leprince J, Vaudry D, Fournier A, Patte-Mensah C, Vaudry H, Tonon MC (2003) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates endozepine release from cultured rat astrocytes via a PKA-dependent mechanism. *Faseb J* 17:17-27.
- Mason S, Smart D, Marshall IC, McKnight A, Skepper JN, McNulty S (2002) Identification and characterisation of functional bombesin receptors in human astrocytes. *Eur J Pharmacol* 438:25-34.
- Matsuda K, Wada K, Miura T, Maruyama K, Shimakura SI, Uchiyama M, Leprince J, Tonon MC, Vaudry H (2007) Effect of the diazepam-binding inhibitor-derived peptide, octadecaneuropeptide, on food intake in goldfish. *Neuroscience* 150:425-432.
- Maxishima M, Shiga T, Shutoh F, Hamada S, Maeshima T, Okado N (2001) Serotonin 2A receptor-like immunoreactivity is detected in astrocytes but not in oligodendrocytes of rat spinal cord. *Brain Res* 889:270-273.
- McClellan KM, Parker KL, Tobet S (2006) Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Front Neuroendocrinol* 27:193-209.
- McEneaney MW, Snowman AM, Trifiletti RR, Snyder SH (1992) Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3170-3174.

- McMinn JE, Wilkinson CW, Havel PJ, Woods SC, Schwartz MW (2000) Effect of intracerebroventricular alpha-MSH on food intake, adiposity, c-Fos induction, and neuropeptide expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R695-703.
- Mehta AK, Ticku MK (1989) Benzodiazepine and beta-carboline interactions with GABA<sub>A</sub> receptor-gated chloride channels in mammalian cultured spinal cord neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 249:418-423.
- Meier SD, Kafitz KW, Rose CR (2008) Developmental profile and mechanisms of GABA-induced calcium signaling in hippocampal astrocytes. *Glia* 56:1127-1137.
- Mellinkoff SM, Frankland M, Boyle D, Greipel M (1956) Relationship between serum amino acid concentration and fluctuations in appetite. *J Appl Physiol* 8:535-538.
- Meugnier E, Rome S, Vidal H (2007) Regulation of gene expression by glucose. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10:518-522.
- Miettinen H, Kononen J, Haapasalo H, Helen P, Sallinen P, Harjuntausta T, Helin H, Alho H (1995) Expression of peripheral-type benzodiazepine receptor and diazepam binding inhibitor in human astrocytomas: relationship to cell proliferation. *Cancer Res* 55:2691-2695.
- Millán C, Martínez F, Cortés-Campos C, Lizama I, Yañez MJ, Llanos P, Reinicke K, Rodríguez F, Peruzzo B, Nualart F, García MA (2010) Glial glucokinase expression in adult and post-natal development of the hypothalamic region. *ASN Neuro* (in press).
- Ming GL, Song H (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28:223-250.
- Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, Mu J, Fofelle F, Ferre P, Birnbaum MJ, Stuck BJ, Kahn BB (2004) AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428:569-574.
- Miyata M, Mocchetti I, Ferrarese C, Guidotti A, Costa E (1987) Protracted treatment with diazepam increases the turnover of putative endogenous ligands for the benzodiazepine/beta-carboline recognition site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:1444-1448.
- Mizuno Y, Oomura Y (1984) Glucose responding neurons in the nucleus tractus solitarius of the rat: in vitro study. *Brain Res* 307:109-116.
- Mocchetti I (1990) Molecular biology of diazepam binding inhibitor peptide. *Neurochem Res* 15:125-130.
- Mocchetti I, Einstein R, Brosius J (1986) Putative diazepam binding inhibitor peptide: cDNA clones from rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:7221-7225.
- Mogensen IB, Schulenberg H, Hansen HO, Spener F, Knudsen J (1987) A novel acyl-CoA-binding protein from bovine liver. Effect on fatty acid synthesis. *Biochem J* 241:189-192.
- Mohler H, Okada T (1977) Benzodiazepine receptor: demonstration in the central nervous system. *Science* 198:849-851.
- Moldrich RX, Aprico K, Diwakarla S, O'Shea RD, Beart PM (2002) Astrocyte mGlu(2/3)-mediated cAMP potentiation is calcium sensitive: studies in murine neuronal and astrocyte cultures. *Neuropharmacology* 43:189-203.
- Moran O, Phillip M (2003) Leptin: obesity, diabetes and other peripheral effects--a review. *Pediatr Diabetes* 4:101-109.
- Morara S, Wimalawansa SJ, Rosina A (1998) Monoclonal antibodies reveal expression of the CGRP receptor in Purkinje cells, interneurons and astrocytes of rat cerebellar cortex. *Neuroreport* 9:3755-3759.
- Moreno MJ, Cohen Z, Stanimirovic DB, Hamel E (1999) Functional calcitonin gene-related peptide type 1 and adrenomedullin receptors in human trigeminal ganglia, brain vessels, and cerebrovascular or astroglial cells in culture. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:1270-1278.

- Moreno-Aliaga MJ, Swarbrick MM, Lorente-Cebrian S, Stanhope KL, Havel PJ, Martinez JA (2007) Sp1-mediated transcription is involved in the induction of leptin by insulin-stimulated glucose metabolism. *J Mol Endocrinol* 38:537-546.
- Morgello S, Uson RR, Schwartz EJ, Haber RS (1995) The human blood-brain barrier glucose transporter (GLUT1) is a glucose transporter of gray matter astrocytes. *Glia* 14:43-54.
- Moriguchi T, Sakurai T, Nambu T, Yanagisawa M, Goto K (1999) Neurons containing orexin in the lateral hypothalamic area of the adult rat brain are activated by insulin-induced acute hypoglycemia. *Neurosci Lett* 264:101-104.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443:289-295.
- Mothet JP, Pollegioni L, Ouanounou G, Martineau M, Fossier P, Baux G (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* 102:5606-5611.
- Mounien L, Marty N, Tarussio D, Metref S, Genoux D, Preitner F, Foretz M, Thorens B (2010) Glut2-dependent glucose-sensing controls thermoregulation by enhancing the leptin sensitivity of NPY and POMC neurons. *Faseb J* 24:1747-1758.
- Moynagh PN, Schousboe A, Williams DC (1994) The peripheral-type benzodiazepine receptor is present in astrocytes but is not a primary site of action for convulsants/anticonvulsants. *J Neurochem* 62:673-679.
- Mudrick-Donnon LA, Williams PJ, Pittman QJ, MacVicar BA (1993) Postsynaptic potentials mediated by GABA and dopamine evoked in stellate glial cells of the pituitary pars intermedia. *J Neurosci* 13:4660-4668.
- Muller EE, Panerai A, Cocchi D, Frohman LA, Mantegazza P (1973) Central glucoprivation: some physiological effects induced by the intraventricular administration of 2-deoxy-d-glucose. *Experientia* 29:874-876.
- Muller W, Heinemann U, Berlin K (1997) Cholecystokinin activates CCKB-receptor-mediated Ca-signaling in hippocampal astrocytes. *J Neurophysiol* 78:1997-2001.
- Munzberg H, Bjornholm M, Bates SH, Myers MG, Jr. (2005) Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance. *Cell Mol Life Sci* 62:642-652.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26:523-530.
- Neess D, Kiilerich P, Sandberg MB, Helledie T, Nielsen R, Mandrup S (2006) ACBP--a PPAR and SREBP modulated housekeeping gene. *Mol Cell Biochem* 284:149-157.
- Newman EA (1999) Sodium-bicarbonate cotransport in retinal astrocytes and Muller cells of the rat. *Glia* 26:302-308.
- Nicholson LF, Faull RL, Waldvogel HJ, Dragunow M (1992) The regional, cellular and subcellular localization of GABAA/benzodiazepine receptors in the substantia nigra of the rat. *Neuroscience* 50:355-370.
- Nitz I, Doring F, Schrezenmeier J, Burwinkel B (2005) Identification of new acyl-CoA binding protein transcripts in human and mouse. *Int J Biochem Cell Biol* 37:2395-2405.
- Nouel D, Sarret P, Vincent JP, Mazella J, Beaudet A (1999) Pharmacological, molecular and functional characterization of glial neurotensin receptors. *Neuroscience* 94:1189-1197.
- Obici S, Feng Z, Karkanas G, Baskin DG, Rossetti L (2002a) Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci* 5:566-572.
- Obici S, Feng Z, Morgan K, Stein D, Karkanas G, Rossetti L (2002b) Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* 51:271-275.
- Obici S, Feng Z, Arduini A, Conti R, Rossetti L (2003) Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. *Nat Med* 9:756-761.
- Oke BO, Suarez-Quian CA, Riond J, Ferrara P, Papadopoulos V (1992) Cell surface localization of the peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol* 87:R1-6.

- Oliva AM, Bas N, Garcia A (1997) Differences in the stimulation of the phosphoinositide cycle by amine neurotransmitters in cultured rat forebrain neurones and astrocytes. *Biochem Pharmacol* 54:1243-1251.
- Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, Barsh GS (1997) Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278:135-138.
- Olsen RW, Tobin AJ (1990) Molecular biology of GABAA receptors. *Faseb J* 4:1469-1480.
- Olsen RW, Sieghart W (2008) International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev* 60:243-260.
- Olsen RW, Yang JS, Ransom RW (1988) GABA-stimulated <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> flux in brain slices as an assay for modulation by CNS depressant drugs. *Adv Biochem Psychopharmacol* 45:125-133.
- Ostenson CG, Ahren B, Karlsson S, Knudsen J, Efendic S (1994) Inhibition by rat diazepam-binding inhibitor/acyl-CoA-binding protein of glucose-induced insulin secretion in the rat. *Eur J Endocrinol* 131:201-204.
- Osundiji MA, Hurst P, Moore SP, Markkula SP, Yueh CY, Swamy A, Hoashi S, Shaw JS, Riches CH, Heisler LK, Evans ML (2010) Recurrent hypoglycemia increases hypothalamic glucose phosphorylation activity in rats. *Metabolism*.
- Owens GP, Sinha AK, Sikela JM, Hahn WE (1989) Sequence and expression of the murine diazepam binding inhibitor. *Brain Res Mol Brain Res* 6:101-108.
- Ozcan S, Andrali SS, Cantrell JE (2010) Modulation of transcription factor function by O-GlcNAc modification. *Biochim Biophys Acta* 1799:353-364.
- Palkovits M (1999) Interconnections between the neuroendocrine hypothalamus and the central autonomic system. Geoffrey Harris Memorial Lecture, Kitakyushu, Japan, October 1998. *Front Neuroendocrinol* 20:270-295.
- Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, Oliet SH (2006) Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 125:775-784.
- Pani L, Quian XB, Clevidence D, Costa RH (1992) The restricted promoter activity of the liver transcription factor hepatocyte nuclear factor 3 beta involves a cell-specific factor and positive autoactivation. *Mol Cell Biol* 12:552-562.
- Pankey EA, Shurley MR, King BM (2008) A re-examination of septal lesion-induced weight gain in female rats. *Physiol Behav* 93:8-12.
- Papadopoulos V, Mukhin AG, Costa E, Krueger KE (1990) The peripheral-type benzodiazepine receptor is functionally linked to Leydig cell steroidogenesis. *J Biol Chem* 265:3772-3779.
- Papadopoulos V, Berkovich A, Krueger KE (1991a) The role of diazepam binding inhibitor and its processing products at mitochondrial benzodiazepine receptors: regulation of steroid biosynthesis. *Neuropharmacology* 30:1417-1423.
- Papadopoulos V, Berkovich A, Krueger KE, Costa E, Guidotti A (1991b) Diazepam binding inhibitor and its processing products stimulate mitochondrial steroid biosynthesis via an interaction with mitochondrial benzodiazepine receptors. *Endocrinology* 129:1481-1488.
- Papadopoulos V, Guarneri P, Krueger KE, Guidotti A, Costa E (1992) Pregnenolone biosynthesis in C6-2B glioma cell mitochondria: regulation by a mitochondrial diazepam binding inhibitor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5113-5117.
- Parola AL, Stump DG, Pepperl DJ, Krueger KE, Regan JW, Laird HEd (1991) Cloning and expression of a pharmacologically unique bovine peripheral-type benzodiazepine receptor isoquinoline binding protein. *J Biol Chem* 266:14082-14087.
- Parpura V, Zorec R (2010) Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Res Rev* 63:83-92.



- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369:744-747.
- Parramon M, Oset-Gasque MJ, Gonzalez MP, Stephenson FA (1994) Identification of GABAA receptor subunits expressed in bovine adrenal medulla. *Neurosci Lett* 168:243-246.
- Parri HR, Gould TM, Crunelli V (2001) Spontaneous astrocytic Ca<sup>2+</sup> oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci* 4:803-812.
- Parton LE, Ye CP, Coppari R, Enriori PJ, Choi B, Zhang CY, Xu C, Vianna CR, Balthasar N, Lee CE, Elmquist JK, Cowley MA, Lowell BB (2007) Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 449:228-232.
- Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G (1997) Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci* 17:7817-7830.
- Patte C, Vaudry H, Desrues L, Gandolfo P, Strijdsveen I, Lamacz M, Tonon MC (1995) The endozepine ODN stimulates polyphosphoinositide metabolism in rat astrocytes. *FEBS Lett* 362:106-110.
- Patte C, Gandolfo P, Leprince J, Thoumas JL, Fontaine M, Vaudry H, Tonon MC (1999) GABA inhibits endozepine release from cultured rat astrocytes. *Glia* 25:404-411.
- Peakman MC, Hill SJ (1994) Adenosine A<sub>2B</sub>-receptor-mediated cyclic AMP accumulation in primary rat astrocytes. *Br J Pharmacol* 111:191-198.
- Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, Serres S, Merle M, Costalat R, Magistretti PJ (2007) Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 55:1251-1262.
- Pénicaud L, Pajot MT, Thompson DA (1990) Evidence that receptors controlling growth hormone and hyperglycemic responses to glucoprivation are located in the hindbrain. *Endocr Res* 16:461-475.
- Perea G, Araque A (2007) Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317:1083-1086.
- Peters JC, Harper AE (1987) Acute effects of dietary protein on food intake, tissue amino acids, and brain serotonin. *Am J Physiol* 252:R902-914.
- Petrescu AD, Payne HR, Boedecker A, Chao H, Hertz R, Bar-Tana J, Schroeder F, Kier AB (2003) Physical and functional interaction of Acyl-CoA-binding protein with hepatocyte nuclear factor-4 alpha. *J Biol Chem* 278:51813-51824.
- Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G (2000) GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 101:815-850.
- Poggioli R, Vergoni AV, Bertolini A (1986) ACTH-(1-24) and alpha-MSH antagonize feeding behavior stimulated by kappa opiate agonists. *Peptides* 7:843-848.
- Porter JT, McCarthy KD (1997) Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog Neurobiol* 51:439-455.
- Priller J, Haas CA, Reddington M, Kreutzberg GW (1998) Cultured astrocytes express functional receptors for galanin. *Glia* 24:323-328.
- Pritchard LE, Turnbull AV, White A (2002) Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. *J Endocrinol* 172:411-421.
- Pritchett DB, Seeburg PH (1990) Gamma-aminobutyric acidA receptor alpha 5-subunit creates novel type II benzodiazepine receptor pharmacology. *J Neurochem* 54:1802-1804.
- Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przyspek R, Kanarek R, Maratos-Flier E (1996) A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380:243-247.

- Rafols JA, Goshgarian HG (1985) Spinal tanycytes in the adult rat: a correlative Golgi gold-toning study. *Anat Rec* 211:75-86.
- Rago L, Adojaan A, Masso R (1990) [<sup>3</sup>H]Ro 5-4864 binding sites in the nucleus of rat lymphocytes. *Eur J Pharmacol* 187:561-562.
- Rakic P (2003) Elusive radial glial cells: historical and evolutionary perspective. *Glia* 43:19-32.
- Rasmussen JT, Rosendal J, Knudsen J (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.
- Rasmussen JT, Faergeman NJ, Kristiansen K, Knudsen J (1994) Acyl-CoA-binding protein (ACBP) can mediate intermembrane acyl-CoA transport and donate acyl-CoA for beta-oxidation and glycerolipid synthesis. *Biochem J* 299:165-170.
- Redecker P (1989) Immunogold electron microscopic localization of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in neurohypophyseal pituicytes and tanycytes of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Histochemistry* 91:333-337.
- Redecker P, Fechner J (1989) Immunohistochemical study of cells positive for glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the human pituitary gland, with special reference to folliculostellate cells. *Histochemistry* 91:227-234.
- Rheaume E, Tonon MC, Smih F, Simard J, Desy L, Vaudry H, Pelletier G (1990) Localization of the endogenous benzodiazepine ligand octadecaneuropeptide in the rat testis. *Endocrinology* 127:1986-1994.
- Ricardo JA, Koh ET (1978) Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res* 153:1-26.
- Riond J, Vita N, Le Fur G, Ferrara P (1989) Characterization of a peripheral-type benzodiazepine-binding site in the mitochondria of Chinese hamster ovary cells. *FEBS Lett* 245:238-244.
- Riond J, Mattei MG, Kaghad M, Dumont X, Guillemot JC, Le Fur G, Caput D, Ferrara P (1991) Molecular cloning and chromosomal localization of a human peripheral-type benzodiazepine receptor. *Eur J Biochem* 195:305-311.
- Rios M, Fan G, Fekete C, Kelly J, Bates B, Kuehn R, Lechan RM, Jaenisch R (2001) Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol* 15:1748-1757.
- Ritter RC, Slusser PG, Stone S (1981) Glucoreceptors controlling feeding and blood glucose: location in the hindbrain. *Science* 213:451-452.
- Rodriguez EM, Blazquez JL, Pastor FE, Pelaez B, Pena P, Peruzzo B, Amat P (2005) Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. *Int Rev Cytol* 247:89-164.
- Rogers CJ, Twyman RE, Macdonald RL (1994) Benzodiazepine and beta-carboline regulation of single GABAA receptor channels of mouse spinal neurones in culture. *J Physiol* 475:69-82.
- Rone MB, Fan J, Papadopoulos V (2009) Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states. *Biochim Biophys Acta* 1791:646-658.
- Rose CR, Ransom BR (1997) Gap junctions equalize intracellular Na<sup>+</sup> concentration in astrocytes. *Glia* 20:299-307.
- Rose TM, Schultz ER, Todaro GJ (1992) Molecular cloning of the gene for the yeast homolog (ACB) of diazepam binding inhibitor/endozepine/acyl-CoA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11287-11291.
- Roseberry AG, Liu H, Jackson AC, Cai X, Friedman JM (2004) Neuropeptide Y-mediated inhibition of proopiomelanocortin neurons in the arcuate nucleus shows enhanced desensitization in ob/ob mice. *Neuron* 41:711-722.

- Rosendal J, Ertbjerg P, Knudsen J (1993) Characterization of ligand binding to acyl-CoA-binding protein. *Biochem J* 290:321-326.
- Rossi M, Kim MS, Morgan DG, Small CJ, Edwards CM, Sunter D, Abusnana S, Goldstone AP, Russell SH, Stanley SA, Smith DM, Yagaloff K, Ghatei MA, Bloom SR (1998) A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 139:4428-4431.
- Rouet-Smith F, Tonon MC, Pelletier G, Vaudry H (1992) Characterization of endozepine-related peptides in the central nervous system and in peripheral tissues of the rat. *Peptides* 13:1219-1225.
- Roy A (1991) Cerebrospinal fluid diazepam binding inhibitor in depressed patients and normal controls. *Neuropharmacology* 30:1441-1444.
- Roy A, Pickar D, Gold P, Barbaccia M, Guidotti A, Costa E, Linnoila M (1989) Diazepam-binding inhibitor and corticotropin-releasing hormone in cerebrospinal fluid. *Acta Psychiatr Scand* 80:287-291.
- Ruano D, Araujo F, Machado A, de Blas AL, Vitorica J (1994) Molecular characterization of type I GABAA receptor complex from rat cerebral cortex and hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 25:225-233.
- Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brunig I, Benson JA, Fritschy JM, Martin JR, Bluethmann H, Mohler H (1999) Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature* 401:796-800.
- Sadzot B, Frost JJ, Wagner HN, Jr. (1989) In vivo labeling of central benzodiazepine receptors with the partial inverse agonist [3H]Ro 15-4513. *Brain Res* 491:128-135.
- Sahu A (2003) Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front Neuroendocrinol* 24:225-253.
- Sahu A, Kalra PS, Kalra SP (1988) Food deprivation and ingestion induce reciprocal changes in neuropeptide Y concentrations in the paraventricular nucleus. *Peptides* 9:83-86.
- Salomon Y, Zohar M, Dejordy JO, Eshel Y, Shafir I, Leiba H, Garty NB, Schmidt-Sole J, Azrad A, Shai E, et al. (1993) Signaling mechanisms controlled by melanocortins in melanoma, lacrimal, and brain astroglial cells. *Ann N Y Acad Sci* 680:364-380.
- Sanacora G, Kershaw M, Finkelstein JA, White JD (1990) Increased hypothalamic content of preproneuropeptide Y messenger ribonucleic acid in genetically obese Zucker rats and its regulation by food deprivation. *Endocrinology* 127:730-737.
- Sandberg MB, Bloksgaard M, Duran-Sandoval D, Duval C, Staels B, Mandrup S (2005) The gene encoding acyl-CoA-binding protein is subject to metabolic regulation by both sterol regulatory element-binding protein and peroxisome proliferator-activated receptor alpha in hepatocytes. *J Biol Chem* 280:5258-5266.
- Sanden N, Thorlin T, Blomstrand F, Persson PA, Hansson E (2000) 5-Hydroxytryptamine<sub>2B</sub> receptors stimulate Ca<sup>2+</sup> increases in cultured astrocytes from three different brain regions. *Neurochem Int* 36:427-434.
- Sanders NM, Dunn-Meynell AA, Levin BE (2004) Third ventricular alloxan reversibly impairs glucose counterregulatory responses. *Diabetes* 53:1230-1236.
- Sanders NM, Taborsky GJ, Jr., Wilkinson CW, Daumen W, Figlewicz DP (2007) Antecedent hindbrain glucoprivation does not impair the counterregulatory response to hypoglycemia. *Diabetes* 56:217-223.
- Sasaki Y, Takimoto M, Oda K, Fruh T, Takai M, Okada T, Hori S (1997) Endothelin evokes efflux of glutamate in cultures of rat astrocytes. *J Neurochem* 68:2194-2200.
- Sawchenko PE (1987) Evidence for differential regulation of corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivities in parvocellular neurosecretory and autonomic-related projections of the paraventricular nucleus. *Brain Res* 437:253-263.
- Schalin-Jantti C, Valli-Jaakola K, Oksanen L, Martelin E, Laitinen K, Krusius T, Mustajoki P, Heikinheimo M, Kontula K (2003) Melanocortin-3-receptor gene variants in morbid obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27:70-74.

- Schechter R, Yanovitch T (1999) Insulin effects on extracellular signal regulated kinase cascade in fetal rat astrocyte cell cultures. *Neurosci Lett* 268:1-4.
- Scheurink AJ, Nolan LJ (1996) Food intake, fuel homeostasis, and the autonomic nervous system. *Appetite* 26:304.
- Schinelli S, Zanassi P, Paolillo M, Wang H, Feliciello A, Gallo V (2001) Stimulation of endothelin B receptors in astrocytes induces cAMP response element-binding protein phosphorylation and c-fos expression via multiple mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Neurosci* 21:8842-8853.
- Schipke CG, Ohlemeyer C, Matyash M, Nolte C, Kettenmann H, Kirchhoff F (2001) Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. *FASEB J* 15:1270-1272.
- Schjerling CK, Hummel R, Hansen JK, Borsting C, Mikkelsen JM, Kristiansen K, Knudsen J (1996) Disruption of the gene encoding the acyl-CoA-binding protein (ACB1) perturbs acyl-CoA metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271:22514-22521.
- Schoemaker H, Boles RG, Horst WD, Yamamura HI (1983) Specific high-affinity binding sites for [<sup>3</sup>H]Ro 5-4864 in rat brain and kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 225:61-69.
- Schousboe A (2003) Role of astrocytes in the maintenance and modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neurochem Res* 28:347-352.
- Schuit FC, Huypens P, Heimberg H, Pipeleers DG (2001) Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. *Diabetes* 50:1-11.
- Schultz R, Pelto-Huikko M, Alho H (1992) Expression of diazepam binding inhibitor-like immunoreactivity in rat testis is dependent on pituitary hormones. *Endocrinology* 130:3200-3206.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661-671.
- Sclafani A, Berner CN, Maul G (1975) Multiple knife cuts between the medial and lateral hypothalamus in the rat: a reevaluation of hypothalamic feeding circuitry. *J Comp Physiol Psychol* 88:201-207.
- Scopinho AA, Resstel LB, Correa FM (2008) alpha(1)-Adrenoceptors in the lateral septal area modulate food intake behaviour in rats. *Br J Pharmacol* 155:752-756.
- Seeley RJ, van Dijk G, Campfield LA, Smith FJ, Burn P, Nelligan JA, Bell SM, Baskin DG, Woods SC, Schwartz MW (1996) Intraventricular leptin reduces food intake and body weight of lean rats but not obese Zucker rats. *Horm Metab Res* 28:664-668.
- Seifert G, Weber M, Schramm J, Steinhauser C (2003) Changes in splice variant expression and subunit assembly of AMPA receptors during maturation of hippocampal astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 22:248-258.
- Selkirk JV, Nottebaum LM, Lee J, Yang W, Foster AC, Lechner SM (2007) Identification of differential melanocortin 4 receptor agonist profiles at natively expressed receptors in rat cortical astrocytes and recombinantly expressed receptors in human embryonic kidney cells. *Neuropharmacology* 52:459-466.
- Sergeyev V, Broberger C, Gorbatyuk O, Hokfelt T (2000) Effect of 2-mercaptoacetate and 2-deoxy-D-glucose administration on the expression of NPY, AGRP, POMC, MCH and hypocretin/orexin in the rat hypothalamus. *Neuroreport* 11:117-121.
- Servitja JM, Masgrau R, Pardo R, Sarri E, von Eichel-Streiber C, Gutkind JS, Picatoste F (2003) Metabotropic glutamate receptors activate phospholipase D in astrocytes through a protein kinase C-dependent and Rho-independent pathway. *Neuropharmacology* 44:171-180.
- Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E (1998) Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* 396:670-674.
- Sieghart W (2000) Unraveling the function of GABA(A) receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 21:411-413.

- Sieghart W, Moehler H (1982) [3H]clonazepam, like [3H]flunitrazepam, is a photoaffinity label for the central type of benzodiazepine receptors. *Eur J Pharmacol* 81:171-173.
- Sigel E (2002) Mapping of the benzodiazepine recognition site on GABA(A) receptors. *Curr Top Med Chem* 2:833-839.
- Silver IA, Erecinska M (1997) Energetic demands of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase in mammalian astrocytes. *Glia* 21:35-45.
- Simard M, Arcuino G, Takano T, Liu QS, Nedergaard M (2003) Signaling at the gliovascular interface. *J Neurosci* 23:9254-9262.
- Slezak M, Pfrieger FW (2003) New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci* 26:531-535.
- Slobodyansky E, Kurriger G, Kultas-Ilinsky K (1992) Diazepam binding inhibitor processing in the rhesus monkey brain: an immunocytochemical study. *J Chem Neuroanat* 5:169-180.
- Slobodyansky E, Guidotti A, Wambebe C, Berkovich A, Costa E (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* 53:1276-1284.
- Snyder MJ, Van Antwerpen R (1998) Evidence for a diazepam-binding inhibitor (DBI) benzodiazepine receptor-like mechanism in ecdysteroidogenesis by the insect prothoracic gland. *Cell Tissue Res* 294:161-168.
- Snyder SH, Verma A, Trifiletti RR (1987) The peripheral-type benzodiazepine receptor: a protein of mitochondrial outer membranes utilizing porphyrins as endogenous ligands. *Faseb J* 1:282-288.
- Sontheimer H, Kettenmann H, Backus KH, Schachner M (1988) Glutamate opens Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> channels in cultured astrocytes. *Glia* 1:328-336.
- Sprengel R, Werner P, Seeburg PH, Mukhin AG, Santi MR, Grayson DR, Guidotti A, Krueger KE (1989) Molecular cloning and expression of cDNA encoding a peripheral-type benzodiazepine receptor. *J Biol Chem* 264:20415-20421.
- Squires RF, Brastrup C (1977) Benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature* 266:732-734.
- St-Pierre JA, Nouel D, Dumont Y, Beudet A, Quirion R (2000) Sub-population of cultured hippocampal astrocytes expresses neuropeptide Y Y(1) receptors. *Glia* 30:82-91.
- Stanimirovic DB, Ball R, Mealing G, Morley P, Durkin JP (1995) The role of intracellular calcium and protein kinase C in endothelin-stimulated proliferation of rat type I astrocytes. *Glia* 15:119-130.
- Stanley BG, Leibowitz SF (1984) Neuropeptide Y: stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. *Life Sci* 35:2635-2642.
- Stanley BG, Leibowitz SF (1985) Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:3940-3943.
- Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S, Leibowitz SF (1986) Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 7:1189-1192.
- Steiner J, Bernstein HG, Biela H, Berndt A, Brisch R, Mawrin C, Keilhoff G, Bogerts B (2007) Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. *BMC Neurosci* 8:2.
- Stepien H, Agro A, Crossley J, Padol I, Richards C, Stanisz A (1993) Immunomodulatory properties of diazepam-binding inhibitor: effect on human interleukin-6 secretion, lymphocyte proliferation and natural killer cell activity in vitro. *Neuropeptides* 25:207-211.
- Sternson SM, Shepherd GM, Friedman JM (2005) Topographic mapping of VMH --> arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nat Neurosci* 8:1356-1363.
- Steyaert H, Tonon MC, Tong Y, Smihrouet F, Testart J, Pelletier G, Vaudry H (1991) Distribution and characterization of endogenous benzodiazepine receptor ligand

- (endozepine)-like peptides in the rat gastrointestinal tract. *Endocrinology* 129:2101-2109.
- Stiene-Martin A, Knapp PE, Martin K, Gurwell JA, Ryan S, Thornton SR, Smith FL, Hauser KF (2001) Opioid system diversity in developing neurons, astroglia, and oligodendroglia in the subventricular zone and striatum: impact on gliogenesis in vivo. *Glia* 36:78-88.
- Stix B, Reiser G (1998) Beta-amyloid peptide 25-35 regulates basal and hormone-stimulated Ca<sup>2+</sup> levels in cultured rat astrocytes. *Neurosci Lett* 243:121-124.
- Suda T, Tozawa F, Dobashi I, Horiba N, Ohmori N, Yamakado M, Yamada M, Demura H (1993) Corticotropin-releasing hormone, proopiomelanocortin, and glucocorticoid receptor gene expression in adrenocorticotropin-producing tumors in vitro. *J Clin Invest* 92:2790-2795.
- Summers C, Tang W, Paulding W, Raizada MK (1994) Peptide receptors in astroglia: focus on angiotensin II and atrial natriuretic peptide. *Glia* 11:110-116.
- Sur C, Wafford KA, Reynolds DS, Hadingham KL, Bromidge F, Macaulay A, Collinson N, O'Meara G, Howell O, Newman R, Myers J, Atack JR, Dawson GR, McKernan RM, Whiting PJ, Rosahl TW (2001) Loss of the major GABA(A) receptor subtype in the brain is not lethal in mice. *J Neurosci* 21:3409-3418.
- Swart I, Jahng JW, Overton JM, Hout TA (2002) Hypothalamic NPY, AGRP, and POMC mRNA responses to leptin and refeeding in mice. *Am J Physiol* 283:R1020-1026.
- Swinnen JV, Alen P, Heyns W, Verhoeven G (1998) Identification of diazepam-binding Inhibitor/Acyl-CoA-binding protein as a sterol regulatory element-binding protein-responsive gene. *J Biol Chem* 273:19938-19944.
- Swinnen JV, Esquenet M, Rosseels J, Claessens F, Rombauts W, Heyns W, Verhoeven G (1996) A human gene encoding diazepam-binding inhibitor/acyl-CoA-binding protein: transcription and hormonal regulation in the androgen-sensitive human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *DNA Cell Biol* 15:197-208.
- Szekely M, Petervari E, Balasko M, Hernadi I, Uzsoki B (2002) Effects of orexins on energy balance and thermoregulation. *Regul Pept* 104:47-53.
- Tatsuno I, Arimura A (1994) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mobilizes intracellular free calcium in cultured rat type-2, but not type-1, astrocytes. *Brain Res* 662:1-10.
- Tatsuno I, Morio H, Tanaka T, Hirai A, Tamura Y, Saito Y, Arimura A (1996) Astrocytes are one of the main target cells for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the central nervous system. Astrocytes are very heterogeneous regarding both basal movement of intracellular free calcium ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) and the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> response to PACAP at a single cell level. *Ann N Y Acad Sci* 805:613-619.
- Taupin V, Herbelin A, Descamps-Latscha B, Zavala F (1991) Endogenous anxiogenic peptide, ODN-diazepam-binding inhibitor, and benzodiazepines enhance the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human monocytes. *Lymphokine Cytokine Res* 10:7-13.
- Taupin V, Gogusev J, Descamps-Latscha B, Zavala F (1993a) Modulation of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1  $\beta$ , interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor expression in human monocytes by an endogenous anxiogenic benzodiazepine ligand, triakontatetrapeptide: evidence for a role of prostaglandins. *Mol Pharmacol* 43:64-69.
- Taupin V, Toulmond S, Serrano A, Benavides J, Zavala F (1993b) Increase in IL-6, IL-1 and TNF levels in rat brain following traumatic lesion. Influence of pre- and post-traumatic treatment with Ro5 4864, a peripheral-type (p site) benzodiazepine ligand. *J Neuroimmunol* 42:177-1785.
- Tence M, Cordier J, Glowinski J, Premont J (1992) Endothelin-evoked Release of Arachidonic Acid from Mouse Astrocytes in Primary Culture. *Eur J Neurosci* 4:993-999.

- Ter Horst GJ, de Boer P, Luiten PG, van Willigen JD (1989) Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A Phaseolus vulgaris lectin tracing study in the rat. *Neuroscience* 31:785-797.
- Thorens B (2001) GLUT2 in pancreatic and extra-pancreatic gluco-detection (review). *Mol Membr Biol* 18:265-273.
- Thorlin T, Eriksson PS, Persson PA, Aberg ND, Hansson E, Ronnback L (1998) Delta-opioid receptors on astroglial cells in primary culture: mobilization of intracellular free calcium via a pertussis sensitive G protein. *Neuropharmacology* 37:299-311.
- Thorsell A, Heilig M (2002) Diverse functions of neuropeptide Y revealed using genetically modified animals. *Neuropeptides* 36:182-193.
- Tietz EI, Kapur J, Macdonald RL (1999) Functional GABAA receptor heterogeneity of acutely dissociated hippocampal CA1 pyramidal cells. *J Neurophysiol* 81:1575-1586.
- Todd S, Naylor SL (1992) New chromosomal mapping assignments for argininosuccinate synthetase pseudogene 1, interferon-beta 3 gene, and the diazepam binding inhibitor gene. *Somat Cell Mol Genet* 18:381-385.
- Tokay T, Masmoudi O, Gandolfo P, Leprince J, Pelletier G, Vaudry H, Tonon MC (2005) Beta-amyloid peptides stimulate endozepine biosynthesis in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 94:607-616.
- Tokay T, Hachem R, Masmoudi-Kouki O, Gandolfo P, Desrues L, Leprince J, Castel H, Diallo M, Amri M, Vaudry H, Tonon MC (2008) Beta-amyloid peptide stimulates endozepine release in cultured rat astrocytes through activation of N-formyl peptide receptors. *Glia* 56:1380-1389.
- Tong Q, Ye CP, Jones JE, Elmquist JK, Lowell BB (2008) Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. *Nat Neurosci*.
- Tong Y, Pelletier G (1990) Ontogeny of proopiomelanocortin (POMC) gene expression in the intermediate lobe of the rat pituitary gland. *Neuropeptides* 16:173-179.
- Tong Y, Toranzo D, Pelletier G (1991) Localization of diazepam-binding inhibitor (DBI) mRNA in the rat brain by high resolution in situ hybridization. *Neuropeptides* 20:33-40.
- Tong Y, Tonon MC, Désy L, Nicolas P, Vaudry H, Pelletier G (1990) Localization of the endogenous benzodiazepine receptor ligand octadecaneuropeptide and peripheral type benzodiazepine receptors in the rat pituitary. *J Neuroendocrinol* 2:189-192.
- Tonon MC, Désy L, Nicolas P, Vaudry H, Pelletier G (1990) Immunocytochemical localization of the endogenous benzodiazepine ligand octadecaneuropeptide (ODN) in the rat brain. *Neuropeptides* 15:17-24.
- Toranzo D, Tong Y, Tonon MC, Vaudry H, Pelletier G (1994) Localization of diazepam-binding inhibitor and peripheral type benzodiazepine binding sites in the rat ovary. *Anat Embryol (Berl)* 190:383-388.
- Trifiletti RR, Snyder SH (1985) Localization of type I benzodiazepine receptors to postsynaptic densities in bovine brain. *J Neurosci* 5:1049-1057.
- Trudeau LE (2000) Neurotensin regulates intracellular calcium in ventral tegmental area astrocytes: evidence for the involvement of multiple receptors. *Neuroscience* 97:293-302.
- Turpin FR, Potier B, Dulong JR, Sinet PM, Alliot J, Oliet SH, Dutar P, Epelbaum J, Mothet JP, Billard JM (2009) Reduced serine racemase expression contributes to age-related deficits in hippocampal cognitive function. *Neurobiol Aging*.
- Unger JW, Moss AM, Livingston JN (1991) Immunohistochemical localization of insulin receptors and phosphotyrosine in the brainstem of the adult rat. *Neuroscience* 42:853-861.
- Vaisse C, Clement K, Durand E, Hercberg S, Guy-Grand B, Froguel P (2000) Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest* 106:253-262.

- Van den Top M, Nolan MF, Lee K, Richardson PJ, Buijs RM, Davies CH, Spanswick D (2003) Orexins induce increased excitability and synchronisation of rat sympathetic preganglionic neurones. *J Physiol* 549:809-821.
- Van Der Kooy D, Koda LY, McGinty JF, Gerfen CR, Bloom FE (1984) The organization of projections from the cortex, amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat. *J Comp Neurol* 224:1-24.
- Venturini I, Zeneroli ML, Corsi L, Baraldi C, Ferrarese C, Pecora N, Frigo M, Alho H, Farina F, Baraldi M (1998a) Diazepam binding inhibitor and total cholesterol plasma levels in cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Regul Pept* 74:31-34.
- Venturini I, Alho H, Podkletnova I, Corsi L, Rybnikova E, Pellicci R, Baraldi M, Pelto-Huikko M, Helen P, Zeneroli ML (1999) Increased expression of peripheral benzodiazepine receptors and diazepam binding inhibitor in human tumors sited in the liver. *Life Sci* 65:2223-2231.
- Venturini I, Zeneroli ML, Corsi L, Avallone R, Farina F, Alho H, Baraldi C, Ferrarese C, Pecora N, Frigo M, Ardizzone G, Arrigo A, Pellicci R, Baraldi M (1998b) Up-regulation of peripheral benzodiazepine receptor system in hepatocellular carcinoma. *Life Sci* 63:1269-1280.
- Vidarsdottir S, Smeets PA, Eichelsheim DL, van Osch MJ, Viergever MA, Romijn JA, van der Grond J, Pijl H (2007) Glucose ingestion fails to inhibit hypothalamic neuronal activity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 56:2547-2550.
- Vidnyanszky Z, Gorcs TJ, Hamori J (1994) Diazepam binding inhibitor fragment 33-50 (octadecaneuropeptide) immunoreactivity in the cerebellar cortex is restricted to glial cells. *Glia* 10:132-141.
- Vitalis T, Fouquet C, Alvarez C, Seif I, Price D, Gaspar P, Cases O (2002) Developmental expression of monoamine oxidases A and B in the central and peripheral nervous systems of the mouse. *J Comp Neurol* 442:331-347.
- Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6:626-640.
- Wang H, Ubl JJ, Reiser G (2002a) Four subtypes of protease-activated receptors, co-expressed in rat astrocytes, evoke different physiological signaling. *Glia* 37:53-63.
- Wang H, Ubl JJ, Stricker R, Reiser G (2002b) Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C1351-1364.
- Wang R, Liu X, Hentges ST, Dunn-Meynell AA, Levin BE, Wang W, Routh VH (2004) The regulation of glucose-excited neurons in the hypothalamic arcuate nucleus by glucose and feeding-relevant peptides. *Diabetes* 53:1959-1965.
- Weigle DS, Bukowski TR, Foster DC, Holderman S, Kramer JM, Lasser G, Lofton-Day CE, Prunkard DE, Raymond C, Kuijper JL (1995) Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse. *J Clin Invest* 96:2065-2070.
- Westergaard N, Drejer J, Schousboe A, Sonnewald U (1996) Evaluation of the importance of transamination versus deamination in astrocytic metabolism of [U-13C]glutamate. *Glia* 17:160-168.
- White G, Gurley D (1995) Benzodiazepine site inverse agonists can selectively inhibit subtypes of the GABAA receptor. *Neuroreport* 6:1313-1316.
- Williams DL, Kaplan JM, Grill HJ (2000) The role of the dorsal vagal complex and the vagus nerve in feeding effects of melanocortin-3/4 receptor stimulation. *Endocrinology* 141:1332-1337.
- Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Yanagisawa M (2001) To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annu Rev Neurosci* 24:429-458.
- Wisden W, Herb A, Wieland H, Keinanen K, Luddens H, Seeburg PH (1991) Cloning, pharmacological characteristics and expression pattern of the rat GABAA receptor alpha 4 subunit. *FEBS Lett* 289:227-230.



- Wolff JR, Stuke K, Missler M, Tytko H, Schwarz P, Rohlmann A, Chao TI (1998) Autocellular coupling by gap junctions in cultured astrocytes: a new view on cellular autoregulation during process formation. *Glia* 24:121-140.
- Wolosker H, Blackshaw S, Snyder SH (1999) Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13409-13414.
- Woods MJ, Williams DC (1996) Multiple forms and locations for the peripheral-type benzodiazepine receptor. *Biochem Pharmacol* 52:1805-1814.
- Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D, Jr. (1979) Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 282:503-505.
- Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S (2005) Appetite control. *J Endocrinol* 184:291-318.
- Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR, Tecott LH, Reichardt LF (2003) Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci* 6:736-742.
- Yamagishi H, Kawaguchi M (1998) Characterization of central- and peripheral-type benzodiazepine receptors in rat salivary glands. *Biochem Pharmacol* 55:209-214.
- Yanagibashi K, Ohno Y, Kawamura M, Hall PF (1988) The regulation of intracellular transport of cholesterol in bovine adrenal cells: purification of a novel protein. *Endocrinology* 123:2075-2082.
- Yanagibashi K, Ohno Y, Nakamichi N, Matsui T, Hayashida K, Takamura M, Yamada K, Tou S, Kawamura M (1989) Peripheral-type benzodiazepine receptors are involved in the regulation of cholesterol side chain cleavage in adrenocortical mitochondria. *J Biochem (Tokyo)* 106:1026-1029.
- Yanase H, Shimizu H, Yamada K, Iwanaga T (2002) Cellular localization of the diazepam binding inhibitor in glial cells with special reference to its coexistence with brain-type fatty acid binding protein. *Arch Histol Cytol* 65:27-36.
- Yanase H, Shimizu H, Kanda T, Fujii H, Iwanaga T (2001) Cellular localization of the diazepam binding inhibitor (DBI) in the gastrointestinal tract of mice and its coexistence with the fatty acid binding protein (FABP). *Arch Histol Cytol* 64:449-460.
- Yang Y, Pritchard PH, Bhuiyan J, Secombe DW, Moghadasian MH (2001) Overexpression of acyl-coA binding protein and its effects on the flux of free fatty acids in McA-RH 7777 cells. *Lipids* 36:595-600.
- Yeo GS, Connie Hung CC, Rochford J, Keogh J, Gray J, Sivaramakrishnan S, O'Rahilly S, Farooqi IS (2004) A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. *Nat Neurosci* 7:1187-1189.
- Yettefti K, Orsini JC, el Ouazzani T, Himmi T, Boyer A, Perrin J (1995) Sensitivity of nucleus tractus solitarius neurons to induced moderate hyperglycemia, with special reference to catecholaminergic regions. *J Auton Nerv Syst* 51:191-197.
- Yeung VT, Ho SK, Tsang DS, Nicholls MG, Cockram CS (1996) Endothelin-3 attenuates the cyclic GMP responses to C-type natriuretic peptide in cultured mouse astrocytes. *J Neurosci Res* 46:686-696.
- Yoshida H, Tsunoda Y, Owyang C (1999) Diazepam-binding inhibitor33-50 elicits Ca<sup>2+</sup> oscillation and CCK secretion in STC-1 cells via L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Am J Physiol* 276:G694-702.
- Young JK (1994) Immunoreactivity for diazepam binding inhibitor in Gomori-positive astrocytes. *Regul Pept* 50:159-165.
- Young JK, Baker JH, Montes MI (2000) The brain response to 2-deoxy glucose is blocked by a glial drug. *Pharmacol Biochem Behav* 67:233-239.
- Young WS, 3rd, Kuhar MJ (1980) Radiohistochemical localization of benzodiazepine receptors in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 212:337-346.

- Yu S, Tooyama I, Ding WG, Kitasato H, Kimura H (1995) Immunohistochemical localization of glucose transporters (GLUT1 and GLUT3) in the rat hypothalamus. *Obes Res* 3 Suppl 5:753S-776S.
- Zarjevski N, Cusin I, Vettor R, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B (1993) Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology* 133:1753-1758.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432.
- Zhao L, Brinton RD (2002) Vasopressin-induced cytoplasmic and nuclear calcium signaling in cultured cortical astrocytes. *Brain Res* 943:117-131.
- Zhao L, Brinton RD (2003) Vasopressin-induced cytoplasmic and nuclear calcium signaling in embryonic cortical astrocytes: dynamics of calcium and calcium-dependent kinase translocation. *J Neurosci* 23:4228-4239.
- Zheng H, Patterson LM, Morrison C, Banfield BW, Randall JA, Browning KN, Travagli RA, Berthoud HR (2005) Melanin concentrating hormone innervation of caudal brainstem areas involved in gastrointestinal functions and energy balance. *Neuroscience* 135:611-625.
- Zhu SQ, Kum W, Ho SK, Young JD, Cockram CS (1990) Structure-function relationships of insulin receptor interactions in cultured mouse astrocytes. *Brain Res* 529:329-332.